Rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la physiopathologie de la cortico-surrénale

Annabel Berthon

▶ **To cite this version:**

Annabel Berthon. Rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la physiopathologie de la cortico-surrénale. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22280 . tel-00822820

HAL Id: tel-00822820

https://theses.hal.science/tel-00822820

Submitted on 15 May 2013

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.

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL **UNIVERSITÉ D'AUVERGNE**
N° D.U. 2280 **Année 2012**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 589

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire

(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement

par

Annabel BERTHON

le 15 octobre 2012

Rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la physiopathologie de la cortico-surrénale

---

Président : **Pr. Pierre VERRELLE,** Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand

Rapporteurs : **Dr. Andreas SCHEDL**, Institut Valrose Biologie, Nice
Pr. Constantine STRATAKIS, NICHD, Bethesda, Etats-Unis

Examinateur : **Dr. Maria-Christina ZENNARO,** Centre de recherche cardio-vasculaire, Paris

Directeur de thèse : **Dr. Pierre VAL**, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Laboratoire UMR GReD CNRS-INSERM-Clermont Université

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL **UNIVERSITÉ D'AUVERGNE**
N° D.U. 2280 **Année 2012**

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 589

Thèse

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

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire

(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement

par

Annabel BERTHON

le 15 octobre 2012

Rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la physiopathologie de la cortico-surrénale

---

Président : **Pr. Pierre VERRELLE,** Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand

Rapporteurs : **Dr. Andreas SCHEDL**, Institut Valrose Biologie, Nice
Pr. Constantine STRATAKIS, NICHD, Bethesda, Etats-Unis

Examinateur : **Dr. Maria-Christina ZENNARO,** Centre de recherche cardio-vasculaire, Paris

Directeur de thèse : **Dr. Pierre VAL**, UMR GReD, Clermont-Ferrand

Laboratoire UMR GReD CNRS-INSERM-Clermont Université

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a été effectué dans l'équipe « Tumeurs surrénaliennes et homéostasie du tissu adipeux » au sein du laboratoire Génétique, Reproduction et Développement (GReD) de Clermont Ferrand qui est une unité mixte de recherche CNRS 6293, INSERM U1103 et Clermont université.

Il a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Articles publiés ou en cours de publication dans des revues internationales à comité de lecture

Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P.

Constitutive ß-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development.

Hum Mol Genet. 2010 Feb 6. **(Article 1)**

Berthon A., Drelon C., Ragazzon B., Tissier F., Boulkroun S., Amar L., Samson-Couterie B., Zennaro M.-C., Plouin P.-F., Lefebvre H., Sahut-Barnola I., Batisse M., Lefrançois-Martinez A.-M., Bertherat J., Martinez A., Val P.

Constitutive Wnt/ß-catenin signaling causes the development of aldosterone producing adenomas.

En préparation **(Article 2)**

Drelon C, Berthon A., Ragazzon B., Tissier F., Bandiera R., Sahut-Barnola I., De Joussineau C., Batisse-Lignier M., Lefrançois-Martinez AM., Bertherat J., Martinez A., Val P.

Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models.

Plos One. 2012 Aug 28. **(Article 3)**

Les articles de revue suivants sont présentés en annexes :

Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P.

Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development.

Mol Cell Endocrinol. 2011 Sep 10. Review **(Article 4)**

Drelon C., Berthon A., Val P.

Adrenocortical cancer and IGF2: is the game over or our experimental models limited?

JCEM. 2012 Dec. Review **(Article 5)**

Communications orales ou affichées réalisées en congrès

Communication orale à des congrès ou conférence avec comité de lecture :

Réseau COMETE, Paris, décembre 2011 :
L'implication d'un mécanisme épigénétique dans la progression tumorale du cortex surrénalien.

Réseau CARNEY, Paris, novembre 2011 :
Genetic and epigenetic mechanisms of Conn's syndrome : from mouse to human.

28ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Clermont-Ferrand, octobre 2011 :
L'activation constitutive de la ßcaténine cause un hyperaldostéronisme primaire.

37th Meeting of the International Aldosterone Conference, Boston, juin 2011 :
Constitutive activation of ßcatenin causes primary hyperaldosteronism.

1ère Journée régionale en cancérologie, Clermont Ferrand, janvier 2011 :
Rôle de la ßcaténine dans le développement tumoral du cortex surrénalien.

Réseau COMETE, Paris, décembre 2010 :
L'activation de la ßcaténine induit un syndrome de Conn

Réseau COMETE, Paris, novembre 2009 :
L'activation de la ßcaténine induit une hyperplasie et favorise la progression tumorale dans le cortex surrénalien

Journée de l'IFR79, Clermont Ferrand, octobre 2009 :
Rôle de la ßcaténine dans le développement tumoral de la cortico-surrénale.

Communication affichée :

CLARA Rhône Alpes, Lyon, France, mars 2011 :
Constitutive activation of ßcatenin causes primary hyperaldosteronism.
Berthon A., Ragazzon B., Batisse M., Tissier F., Lefebvre H., Bertherat J., Martinez A. and Val P.

3rd International adrenal cancer symposium, Würsburg, Allemagne, février 2011 :
Constitutive activation of ßcatenin causes primary hyperaldosteronism.
Berthon A., Ragazzon B, Batisse M., Tissier F., Lefebvre H., Bertherat J., Martinez A. and Val P.

Adrenal cortex, San Diego, Etats-Unis, juin 2010 :
Adrenal carcinoma development is dependent on βcatenin and IGF-2 signaling.
Berthon A., Martinez A., Pierre Val.

CLARA Rhône Alpes, Lyon, France, avril 2010 :
ßcatenin activation induces hyperplasia and promotes adrenocortical carcinoma.
Berthon A., Martinez A., Pierre Val.

RÉSUMÉ

Les tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes et malignes sont associées à une morbidité élevée résultant de l'hypersécrétion des hormones cortico-surrénaliennes, retrouvée chez près de 60% des patients. Au delà des perturbations endocrines, les carcinomes cortico-surrénaliens (CCS) sont des tumeurs de mauvais pronostic avec 16 à 38% de survie à 5 ans. Cette agressivité résulte à la fois de la présence de métastases chez de nombreux patients, au moment du diagnostic (30 à 40% des cas) et de l'absence d'approches thérapeutiques, au delà de la résection chirurgicale de la tumeur primaire. Au début de ma thèse, les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des tumeurs bénignes et malignes de la cortico-surrénale, étaient largement méconnus. L'activation anormale de la voie de signalisation Wnt/ßcaténine dans 48% des tumeurs bénignes et 37% des tumeurs malignes, suggérait que cette voie pouvait, comme dans d'autres tissus, participer au développement tumoral dans la cortico-surrénale.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons développé et caractérisé un modèle de souris transgéniques dans lesquelles la ßcaténine est constitutivement activée, spécifiquement dans le cortex surrénalien (souris ΔCat).

Grâce à ces souris, nous avons démontré pour la première fois que la ßcaténine agit comme un oncogène dans la cortico-surrénale, mais que son activation constitutive ne suffit pas à déclencher systématiquement le développement de tumeurs malignes. Chez plus de 90% des patients, la formation des CCS est associée à la surexpression du facteur de croissance *IGF2*. Grâce à des modèles de souris transgéniques qui surexpriment *Igf2*, nous avons pu montrer que cette surexpression n'a que peu d'effet sur l'initiation ou la progression tumorale, suggérant que d'autres altérations sont requises pour favoriser la transition maligne. Des résultats préliminaires encourageants suggèrent que la surexpression de l'histone méthyl-transférase *EZH2* et les altérations épigénétiques résultantes, pourraient être la clé du développement des CCS.

Parallèlement, nous avons montré que l'activation constitutive de la ßcaténine conduit au développement d'un hyperaldostéronisme primaire chez les souris ΔCat, suggérant que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine pourrait participer à la formation d'adénomes surrénaliens producteurs d'aldostérone (APA) chez les patients. Effectivement, nous avons mis en évidence que l'activation constitutive de la ßcaténine est l'altération moléculaire la plus fréquente dans les APA, avec une prévalence de 68%. Des analyses *in vitro* m'ont permis de montrer que la ßcaténine stimule la production d'aldostérone en contrôlant directement et indirectement l'expression de deux enzymes clés de la synthèse d'aldostérone – *CYP21* et *CYP11B2* – et du récepteur à l'angiotensine II (le sécrétagogue naturel de l'aldostérone), *AT1R*. Nous avons par

ailleurs montré que la production excessive d'aldostérone chez les souris ΔCat, pouvait être maîtrisée par un régime enrichi en quercétine, un inhibiteur naturel de l'activité transcriptionnelle de la ßcaténine.

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de la voie Wnt/ßcaténine dans la tumorigenèse surrénalienne et dans l'hypersécrétion d'aldostérone ce qui fait d'elle une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

Mots clés : Voie Wnt/ßcaténine, IGF2, EZH2, carcinomes cortico-surrénaliens, hyperaldostéronisme primaire.

ABSTRACT

Benign and malignant adrenocortical tumours are associated with a high morbidity caused by the hypersecretion of adrenocortical hormones found in approximately 60% of patients. Moreover, adrenocortical carcinomas (ACC) have poor prognosis with a 5 years survival rate of 16 to 38%. This aggressiveness results from both the presence of metastases at diagnosis in most patients (30 to 40% of cases) and the absence of therapeutic approaches apart from surgical resection of primary tumours. At the start of my thesis, the molecular mechanisms involved in the development of benign and malignant adrenocortical tumours were largely unknown. Abnormal activation of the Wnt/ßcatenin pathway found in 48% of benign tumours and 37% of malignant tumours suggests that as in other tissues, this pathway could participate in tumour development in the adrenal cortex.

To confirm this hypothesis, we developed and characterized a transgenic mouse model with constitutive activation of ßcatenin, specifically in the adrenal cortex (ΔCat mice).

With this model, we demonstrated for the first time that ßcatenin acted as an adrenocortical oncogene but that this activation was insufficient to systematically induce the development of adrenocortical carcinomas. In almost 90% of patients, CCS formation is associated with the overexpression of the growth factor *IGF2*. However, the development of a model of *Igf2* overexpression in transgenic mice, allowed us to demonstrate that this overexpression could not initiate tumour formation and that it had a mild effect on tumour progression. This suggested that other alterations were necessary for malignant progression. Our encouraging preliminary results suggest that upregulation of the histone methyltransferase *EZH2* and the resulting epigenetic defects could be the cause of ACC development.

In parallel, we demonstrated that constitutive ßcatenin activation induced primary hyperaldosteronism development in ΔCat mice suggesting that aberrant activation of the Wnt pathway could be involved in formation of aldosterone-producing adenomas (APA) in patients. Indeed, we showed that constitutive activation of ßcatenin was the most frequent molecular alteration in APA with a prevalence of 68%. In vitro analysis allowed us to demonstrate that ßcatenin stimulates aldosterone production by controlling directly and indirectly the expression of two key enzymes of aldosterone synthesis –*CYP21* and *CYP11B2*- and of the angiotensin II receptor, *AT1R*. Furthermore, we showed that excessive aldosterone production in ΔCat mice could be controlled by a diet enriched in quercetin, a natural inhibitor of the transcriptional activity of ßcatenin.

Altogether these results demonstrate the essential role of the Wnt/ßcatenin pathway in adrenocortical tumorigenesis and aldosterone secretion. Consequently, this pathway could be a new potential therapeutic target for the treatment of most adrenal tumours.

Keys words: Wnt/ßcatenin pathway, IGF2, EZH2, adrenocortical carcinomas, primary hyperaldosteronism.

ABRÉVIATIONS

3ß-HSD	3ß-hydroxysteroid dehydrogenase
12-HETE	12-hydroxyeicosatetraenoic
18OHF	18-hydroxycortisol
18oxoF	18-oxocortisol
ACE	Angiotensine II conversion enzyme
ACS	Adénome Cortico-Surrénalien
ACTH	Adreno Cortico Trophic hormone
Ad4BP	Adrenal 4 binding protein
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	Acide DesoxyriboNucléique complémentaire
AF	Activating Function
AgT	Antigène T
AHC	Cyclic AMP-dependent transcription factor
AIMAH	ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia
AKR1B1	Aldo Keto Reductase 1B1
Akr1b7	Aldo Keto Reductase 1b7
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	Activator Protein 1
APA	Adénome Producteur d'Aldostérone
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APCC	Aldosterone Producing Cell Clustering
AR	Androgen Receptor
Arm	Armadillo
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ARR	Aldosterone Renin Ratio
AT1R	Angiotensin II Type 1 receptor
AT2R	Angiotensin II Type 2 receptor
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adénosine TriPhosphate
AVP	Arginine Vasopressine
BCL9	B Cell CLL/Lymphoma 9
Boc	Brother of Cdo/bilaregional Cdon-binding protein
BrdU	Bromodeoxyuridine
BW	syndrome de Beckwith-Wiedmann
Ca^{2+}	Calcium
CaM	Calmoduline
CaMK	Ca2+/Calmoduline dependent protein Kinase
CAH	Congenital lipoid Adrenal Hyperplasia
CBP	CREB-Binding Protein
CCS	Carcinome Cortico-Surrénalien
Cdo	Cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes
CK1	Casein Kinase 1
CPA	Carcinome Producteur d'Aldostérone
CRAC	recognition interaction amino acid consensus

CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response Element (CRE) Binding protein
CREM	CREmodulator
CRD	Cysteine Rich amino-terminal Domain
CRH	Corticotropin Realeasing Hormone
CRM1	Chromosome Maintenance protein 1
Cry	Cryptochrome
CT	Computed Tomography
CTCF	CCCTC binding factor
CVS	Cathétérisme Veineux Surrénalien
CYP11A1	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polyprotein 1
CYP11B1	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polyprotein 1
CYP11B2	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polyprotein 2
CYP21	Cytochrome P450, family 21
CYP17	Cytochrome P450, family 17
Dab2	Disabled homolog 2
DAG	1,2-diacylglycérol
DAX1	Dosage sensitive adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1
DBD	DNA-binding domain
DBI	Diazepam Binding Inhibitor
Dex	Dexaméthasone
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHEAS	Déhydroépiandrostérone sulfate
Dhh	Desert hedgehog
DHT	5æ-dihydrotestostérone
DKK	Dickkopf
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazole
DNMT	DNA methyltransferase
Dvl	Dishevelled
DZNeP	3-Deazaneplanocin A
EED	Embryonic Endoderm Development
ENaC	amiloride-sensitive épithélial Na channel
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumours
EZH2	Enhancer of Zeste 2
ERCC	Excision Repair Cross Complementation group 1
ERK	Extra-cellular-signal-Regulated Kinase
FoxM1	Forkhead-box
Fz	Frizzled
Gas1	Growth arrest specific
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosyl-PhosphatidylInositol
GR	Glucocorticoid Receptor
GSK3ß	Glycogen Synthase Kinase 3ß

GTP	Guanosine TriPhosphate
GTPase	enzyme de transfert de la liaison riche du GTP
H+	Hydrogène/proton
H2K119ub1	monoubiquitine de la lysine 119 de l'histone H2A
H3K27me3	triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3
HAS	Hypertension Artérielle Secondaire
HBI	Hyperplasie Bilatérale Idiopathique
HCA	Hyperplasie Congénitale cortico-surrénalienne
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Hyperaldostéronisme Familial
Hh	Hedgehog
HHC	axe Hypothalamo-Hypophyso-Cortico-surrénalien
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A
HMT	Histone MéthylTransférase
HP	Hyperaldostéronisme Primaire
ICR	Imprinting Control Region
IGF1R	Insulin-like Growth Factor Receptor 1
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
Ihh	Indian hedgehog
IP_3	Inositol triphosphate
IP_3R	Inositol triphosphate Receptor
JAK	Janus Kinase
K+	Potassium
kDa	kiloDalton
Krm	Kremen
LAL	Lipase Acide Lysosomiale
LBD	Ligand binding domain
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	LDL-Receptor
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LF	syndrome Li-Fraumeni
LIT1 ou KCNQ10T1 ou KvLQT1-AS	KCNQ1-overlapping transcript 1
LOH	perte d'hétérozygotie
LoxP	Locus of X-ing-over P
LPA	Lysophosphatidic acid
LPH	Lipotrophic Hormone
LRP	Low density lipoprotein Receptor related Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein kinase
MC2R	MelanoCortin 2 Receptor
miR	miRNA
MSH	Melano-Stimulating Hormone
MVDP	Mouse Vas Deferens Protein
Na+	Sodium

NADP(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (réduit)
NBRE	NGFIB response element
NES	Nuclear export signal
nGRE	negative Glucocorticoid Response Element
NR4A1/NGFIB	Nuclear subfamily 4 group A member 1/Neuronal Growth Factor Induced clone B
NR4A2/NURR1	Nuclear subfamily 4 group A member 2/Nur-related receptor 1
PAF	Polypose Adenomateuse Familiale
PAG	Primordium adrénogénital
PAP7	Peripherial benzodiazepine receptor Associated Protein
pb	paire de bases
PBR	Peripherial-type Benzodiazepine Receptor
PCP	Planar Cell Polarity
PDE8	Phosphodiestérase 8
PDE11A	Phosphodiestérase 11A
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PKA	Protein Kinase A ou Protein Kinase AMPc dépendante
PKC	Protein Kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	PhosphoLipase C
PLD	PhosphoLipase D
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
POMC	Pro-opiomélanocortine
PPNAD	Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease
PRC1	Polycomb Repressor Complex 1
PRC2	Polycomb Repressor Complex 2
Pref-1	Preadipocyte factor-1
PRKAR1A	gène codant pour la sous-unité régulatrice RI alpha de la PKA
Ptch1	Patched 1
R1α	sous-unité régulatrice 1α
RanBP3	Ran (RAs-related Nuclear protein) binding protein 3
RanGDP	GDP (Guanosine diphosphate) bound Ran
RanGTP	GTP (Guanosine triphosphate) bound Ran
RanGTPase	Ran binding GTPase
RE	Reticulum Endoplasmic
RTqPCR	Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction
SBW	Syndrome Beckwith-Wiedemann
SCP2	Sterol Carrier Protein 1
SF1/NR5A1	Steroidogenic Factor 1/Nuclear subfamily 5 group A member 1
SFRP	secreted Frizzled Related Protein
Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
Sp1	selective promoter factor 1/sephacryl phosphocellulose 1
SR-BI	Scavenger Receptor class B type I
SRC	src-family kinase

StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
SV40	Simian Virus 40
TASK	TWIK-related acid-sensitive K
TCF	T Cell-specific Factor
TCS	Tumeur Cortico-Surrénalienne
TGFß	Transforming Growth Factor ß
TP53	Tumor Protein 53
TPA	Tumeurs Productrices d'Aldostérone
TSP	ThromboSPondine 1
TPA	Tumeur Productrice d'Aldosterone
TSPO	mitochondrial transporter protein
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wnt	Wingless
WTX	Wilms Tumour gene on the X chromosome
XCPE1	X Core Promoter Element 1
ß-TrCP	ß Transducin Repeat Containing Protein

TABLE
DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 **:** Représentation schématique et coupe transversale d'une glande surrénale humaine 6'

Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement de la cortico-surrénale 7'

Figure 3 : Schéma simplifié de la synthèse de novo du cholestérol à partir de l'acétate 8'

Figure 4 : Récepteurs aux LDL et aux HDL 9'

Figure 5 : Modèle du transport du cholestérol par PBR dans la mitochondrie 11'

Figure 6 : Stéroidogenèse surrénalienne 13'

Figure 7 : L'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien 15'

Figure 8 : Activation de la voie de la protéine kinase A 16'

Figure 9 : Représentation schématique de la synthèse d'angiotensine II et de son effet sur le cortex surrénalien 19'

Figure 10 : Régulation aigüe de la synthèse d'aldostérone par l'angiotensine II 20'

Figure 11 : Régulation aigue de la synthèse d'aldostérone par le potassium 23'

Figure 12 : Régulation chronique de la synthèse d'aldostérone par l'angiotensine II et le potassium 24'

Figure 13 : Régulation aigüe de la production d'aldostérone par l'ACTH 28'

Figure 14 : Différences de l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien entre des patients présentant ou non d'un syndrome de Cushing 31'

Figure 15 : Différents sous-type d'hyperaldostéronisme primaire 34'

Figure 16 : Arbre décisionnel pour détecter, confirmer et soigner un hyperaldostéronisme primaire 35'

Figure 17 : Modèle de l'implication des canaux TASK dans la production incontrôlée d'aldostérone 44'

Figure 18 : Modèle du rôle des mutations de KCNJ5 dans l'apparition d'un hyperaldostéronisme primaire 45'

Figure 19 : Tableau récapitulatif des mutations KCNJ5 retrouvées dans les APA sporadiques ou héréditaires de type HFIII 46'

Figure 20 : Modèle du rôle de l'horloge circadienne dans l'apparition d'un hyperaldostéronisme primaire chez les souris Cry1-/- et Cry2-/- 47'

Figure 21 : Classification de Mac Farlane 50'

Figure 22 : Critères histologiques définissant le score de Weiss 50'

Figure 23 : Survie sans récidive pour 122 patients présentant un CCS et traités par le mitotane 52'

Figure 24 : Structure et fonction de p53 53'

Figure 25 : Organisation de la région génomique 11p15 (locus IGF2) chez l'Homme 54'

Figure 26 : La ßcaténine est une protéine multi-fonctionnelle qui interagit avec divers partenaires 56'

Figure 27 : Signalisation Wnt/ßcaténine en absence du ligand 56'

Figure 28 : Signalisation Wnt/ßcaténine en présence du ligand 57'

Figure 29 : Système dépendant de CRM1 et du Ran-GTP pour exporter les protéines présentant un signal d'export nucléaire au travers du complexe du pore nucléaire 58'

Figure 30 : La ßcaténine, un co-activateur transcriptionnel des facteurs LEF/TCF et de certains récepteurs nucléaires 59'

Figure 31 : Régulation de la voie Wnt/ßcaténine par les antagonistes 60'

Figure 32 : Survie sans récurrence et globale, en présence ou non d'un marquage nucléaire pour la ßcaténine, dans les cohortes indépendantes de CCS 62'

Figure 33 : Modèle hypothétique du rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans l'oncogenèse surrénalienne 63'

RÉSULTATS & DISCUSSION

Figure 34 : Sécrétion d'aldostérone et de corticostérone lors de la progression tumorale des surrénales des souris ΔCat 72'

Figure 35 : La progression tumorale induit la perte de l'expression du marqueur stéroidogène, Sf1 72'

Figure 36 : Voie de signalisation Hedgehog 73'

Figure 37 : Modèle du rôle de la voie Shh dans le renouvellement du cortex surrénalien 74'

Figure 38 : Analyse de l'état de la voie Hedgehog chez les souris ΔCat 74'

Figure 39 : Un traitement à la dexaméthasone et à l'ACTH induit une hypercorticostéronémie chez les souris ΔCat 75'

Figure 40 : Un traitement à la dexaméthasone et à l'ACTH induit la réexpression de marqueurs de la zone fasciculée chez les souris ΔCat 75'

Figure 41 : Schéma bilan de la régulation de la synthèse d'aldostérone par la voie Wnt/ßcaténine dans le cadre du syndrome de Conn et hypothèse de travail 79'

Figure 42 : Expression de WNT4 et WNT10A dans les APA et NAPA 81'

Figure 43 : Expression de DKK3 dans les APA par rapport aux NAPA et surrénales normales 82'

Figure 44 : Contrôle de la sécrétion d'aldostérone par la ßarrestine 1 83'

Figure 45 : Tableau récapitulatif de la présence d'activation de la voie Wnt/ßcaténine et des altérations de KCNJ5 dans la cohorte de 28 APA issue de l'HEGP 84'

Figure 46 : Représentation de EZH2 et de la fonction du complexe PRC2-PRC1 90'

Figure 47 : Ezh2 est surexprimé uniquement dans les tumeurs avancées des souris ΔCat 90'

Figure 48 : Rôle de EZH2 dans les cellules H295R 91'

Figure 49 : Expression de EZH2 dans des surrénales de patients 91'

Figure 50 : Expression de EZH2 dans les surrénales des souris transgénique qui expriment l'AgT 92'

Figure 51 : Modèle hypothétique du mécanisme de surexpression de EZH2 dans les CCS avec activation de la voie Wnt/ßcaténine 93'

PERSPECTIVES

Figure 52 : Augmentation de l'expression de DNMT3A et DNMT3B dans les APA versus NAPA 100'
Figure 53 : Analyse de méthylation du promoteur de SFRP2 100'
Figure 54 : Analyse de méthylation du promoteur de SFRP2 entre les sites CpG 8 et 17 101'
Figure 55 : Listes des micro ARN prédits in silico pour réguler l'expression de SFRP2 102'
Figure 56 : Construction permettant l'expression du shEZH2 sous le contrôle de la doxycyline 103'

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE 5

I) La glande surrénale 6

1. La médullo-surrénale ou medulla 6

2. La cortico-surrénale : organisation et fonction 7

II) La stéroidogenèse surrénalienne 8

1. Prise en charge du cholestérol 8

A. Entrée du cholestérol dans les cellules stéroidogènes 8

a) Synthèse de novo 8

b) Import du cholestérol 8

B. Le transport intra-cellulaire du cholestérol 10

a) Rôle de SCP2 10

b) Rôle de StAR 10

c) Rôle de PBR 11

2. Synthèse des stéroïdes 12

3. Détoxification des produits secondaires de la stéroidogenèse 13

III) Contrôle moléculaire de la stéroidogenèse 15

1. Régulation de la sécrétion de glucocorticoïdes par la zone fasciculée 15

A. La zone fasciculée : description et fonction 15

B. L'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien 15

C. Mode d'action de l'ACTH : la voie AMPc/PKA 16

2. Régulation de la sécrétion des androgènes par la zone réticulée 17

3. Régulation de la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée 17

A. La zone glomérulée : description et fonction 17

B. Réponse rapide et tardive aux sécrétagogues naturels de l'aldostérone 18

a) Réponse rapide 18

b) Réponse tardive 18

C. Contrôle et effet de la production d'angiotensine II 19

a) Les récepteurs à l'angiotensine II 19

b) Signalisation des protéines G 20

c) Rôle du diacylglycérol : Activation de la protéine kinase C 21

d) Action de l'IP_3 : augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique 22

D. Effets et mode d'action de l'augmentation de la concentration de potassium sur les cellules de la zone glomérulée : dépolarisation membranaire 23

E. Médiateurs intra-cellulaires de la réponse à l'angiotensine II et au potassium 24

a) Importance des flux calciques et activation des calmoduline kinases 24

b) Facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'angiotensine II et au potassium 25

(1) Famille CREB/(ATF) 25
(2) Les facteurs NURRs 26

F. Effets de l'ACTH sur les cellules de la zone glomérulée : la voie PKA 28

IV) Tumeurs cortico-surrénaliennes 30

1. Tumeurs bénignes de la cortico-surrénale et syndromes associés 30

A. Le syndrome de Cushing 30

a) Hyperplasie micronodulaire pigmentée du cortex surrénalien 31

b) Hyperplasies macronodulaires bilatérales 32

B. Le syndrome de virilisation ou hyperandrogénisme 33

C. Le syndrome de Conn 34

a) Présentation clinique et épidémiologie 34

b) Diagnostic d'un hyperaldostéronisme primaire 35

(1) Le ratio aldostérone-rénine 35
(2) Tests de confirmation 35
(3) Identification du type d'hyperaldostéronisme primaire 35

c) Traitement de l'hyperaldostéronisme primaire 36

(1) Exérèse chirurgicale 36
(2) Traitement médicamenteux 36

(i) Inhibiteurs des minéralocorticoïdes 37
(ii) Inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes du récepteur à l'angiotensine II 38
(iii) Blocage des canaux sodiques et calciques 38
(iv) Inhibiteurs de l'aldostérone synthase : un traitement d'avenir ? 39

d) Causes de l'hyperaldostéronisme primaire 40

(1) Les hyperplasies idiopathiques bilatérales 40
(2) Les adénomes producteurs d'aldostérone 41

e) Hyperaldostéronisme familial 42

(1) Hyperaldostéronisme familial de type I 42
(2) Hyperaldostéronisme familial de type II 42
(3) Hyperaldostéronisme familial de type III 43

f) Génétique des tumeurs productrices d'aldostérone 44

(1) Canaux potassiques 44
(i) Les canaux TASK 44
(ii) Les canaux Kir 45

(2) L'horloge circadienne 47
(3) Voie Hedgehog 48
(4) Voie Wnt/ßcaténine 49

2. Lésions malignes 50

A. Diagnostic 50

B. Traitements des carcinomes cortico-surrénaliens 51

C. Génétique des tumeurs cortico-surrénaliennes 52

a) La protéine P53 53

b) Surexpression de IGF2 54

V) Rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne 56

1. Activités de la voie Wnt/ßcaténine 56

2. Mécanismes de contrôle de la voie Wnt/ßcaténine 56

A. Inactivation en absence de ligand 56

B. Activation en présence de ligand 57

a) Inhibition de la dégradation 57

b) Trafic nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine 58

c) Activité nucléaire de la ßcaténine 58

C. Modulation de la voie par les inhibiteurs extracellulaires 59

3. La voie Wnt/ßcaténine dans les tumeurs cortico-surrénaliennes sporadiques 60

A. La voie Wnt/ßcaténine dans les adénomes cortico-surrénaliens 61

B. La voie Wnt/ßcaténine dans les carcinomes cortico-surrénaliennes 61

VI) Projet de recherche 63

RÉSULTATS & DISCUSSION 67

Article 1 : L'activation de la voie Wnt/ßcaténine est un oncogène surrénalien 68

Article 2 : L'activation de la voie Wnt/ßcaténine induit un syndrome de Conn 76

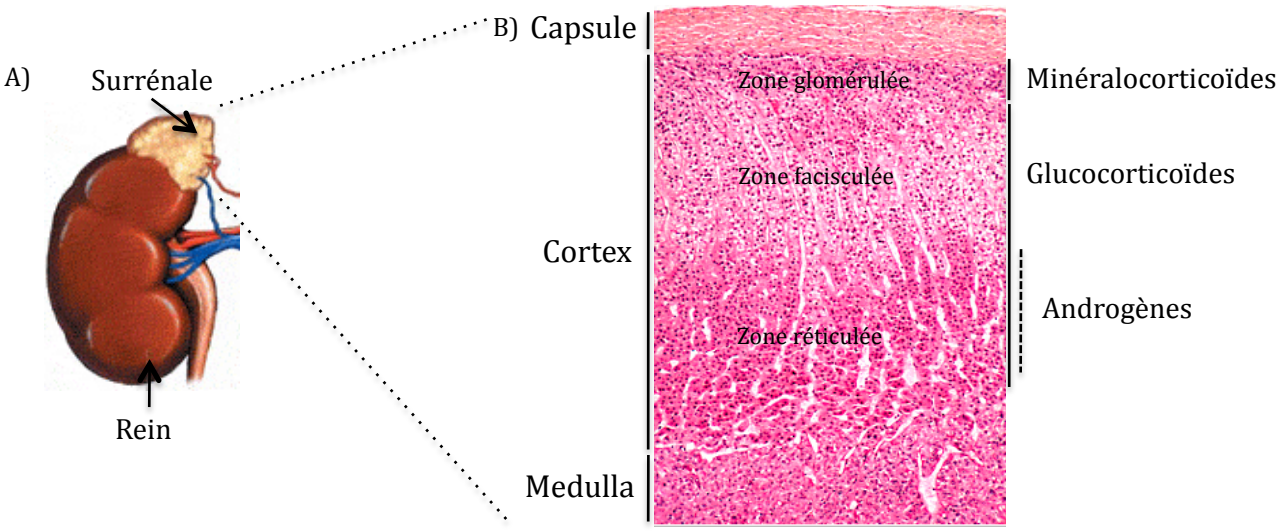
Article 3 : Coopération entre la voie Wnt/ßcaténine et la surexpression de Igf2 pour la progression tumorale 86

PERSPECTIVES 94

ANNEXES 109

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 112

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



<u>Figure 1</u> : Représentation schématique et coupe transversale d'une glande surrénale humaine

A) Positionnement de la surrénale par rapport au rein

B) Coupe transversale d'une surrénale humaine montrant les deux tissus qui la composent : la medulla, au centre de la glande et le cortex directement en dessous de la capsule conjonctive. Le cortex est lui-même composé de trois zones qui sont, de la plus externe à la plus interne :

- la zone glomérulée qui produit les minéralocorticoïdes tels que l'aldostérone
- la zone fasciculée qui sécrète les glucocorticoïdes de type cortisol
- la zone réticulée qui produit aussi des glucocorticoïdes et des androgènes comme la DHEA

I) La glande surrénale

La surrénale est une glande endocrine encapsulée située juste au dessus du rein. Elle est essentielle pour la réponse au stress et participe au contrôle de la pression sanguine, de l'inflammation et de l'homéostasie des lipides et du glucose. Elle est composée de deux tissus d'origine embryonnaire et de fonctions différentes (Orth, D.N. and Kovacs, N.J., 1998) (Figure 1).

1. La médullo-surrénale ou medulla

La medulla se situe au centre de la glande et fait partie du système sympathique. Elle est constituée de cellules chromaffines qui dérivent de sympathogonies qui colonisent l'ébauche surrénalienne à la neuvième semaine de gestation chez l'Homme et E13 (13 jours de développement embryonnaire) chez la souris (Hatano et al., 1996). Les cellules chromaffines produisent les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui sont des médiateurs importants du stress aigü (Wilson et al., 1998). Les catécholamines ont un effet pleïotrope. Ils augmentent le métabolisme du glucose (anabolisme dans le foie, catabolisme dans les muscles), induisent la lipolyse, contrôlent le rythme cardiaque, induisent la vascoconstriction (avec augmentation de la pression sanguine globale) et stimulent l'activité cérébrale.

La synthèse des catécholamines est stimulée par les glucocorticoïdes produits par le cortex surrénalien adjacent. Il existe donc une interation fonctionnelle entre les deux tissus surrénaliens, mise en évidence par l'absence de cellules chromaffines dans certains modèles d'agénésie du cortex (Huang et al., 2012). De manière similaire, chez des patients présentant de faibles taux de glucocorticoïdes à cause d'une hyperplasie congénitale surrénalienne, la fonction et la morphologie médullaire est altérée (Merke et al., 2000). En effet, les taux de catécholamines excrétés sont de 40 à 80% plus faible que chez des sujets sains et cette diminution est correlée avec l'importance de la déficience en glucocorticoïdes. Ceci démontre donc le lien entre les taux de glucocorticoïdes et la synthèse de catécholamines. D'autre part, la place centrale du tissu médullaire dans la surrénale est elle aussi affectée par cette pathologie cortico-surrénalienne puisque certaines cellules ou îlots de cellules chromaffines se retrouvent alors isolées dans le cortex surrénalien (Merke et al., 2000). De plus, une boucle de régulation de la production des glucocorticoïdes par la medulla a été mise en évidence chez la souris. Suite à un stress aigu, la production de PGF2α par le cortex surrénalien inhibe de manière paracrine la libération de catécholamines par la medulla. Ceci permet de limiter la libération de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien (Lambert-Langlais et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère donc que ces interactions médullo-corticales sont importantes à la fois pour la fonction et le développement normal de la medulla et du cortex chez la souris et chez l'Homme.

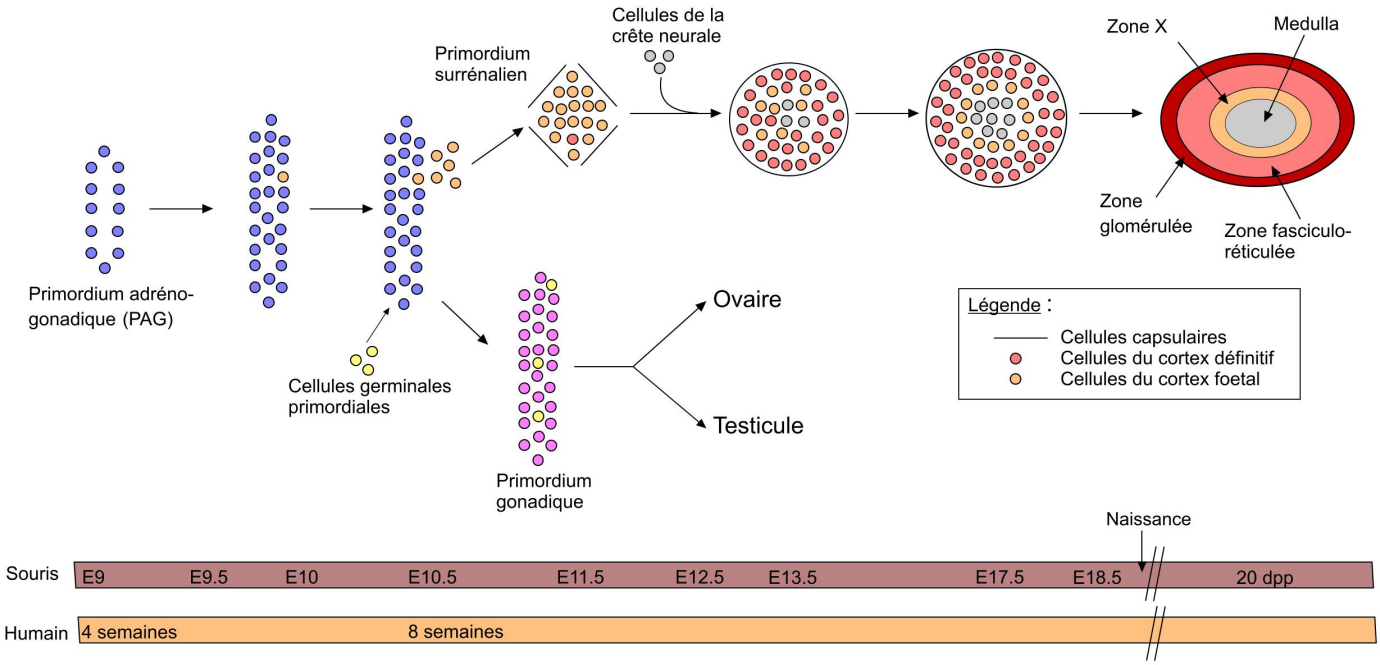
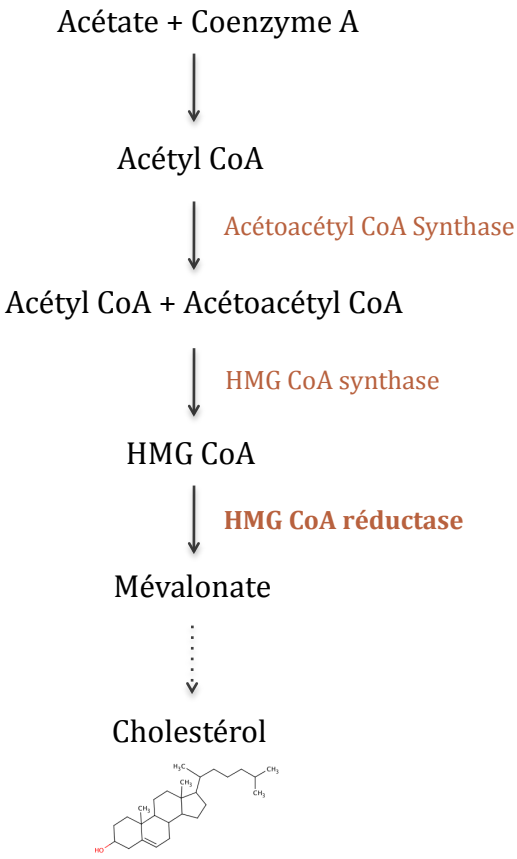


Figure 2 : Représentation schématique des étapes du développement de la cortico-surrénale
Le cortex surrénalien et les gonades dérivent du primordium adréno-gonadique (PAG). A E10 et E10.5 chez la souris (8 semaines de gestation chez l'Homme), les cellules surrénaliennes primordiales se séparent progressivement du primordium adréno-gonadique pour former le primordium surrénalien. Il est alors entouré de cellules capsulaires et envahi par des cellules de la crête neurale qui formeront la medulla. A partir de E16.5, la zonation du cortex se met en place progressivement pour aboutir à la formation de la zone glomérulée, fasciculo-réticulée et de la zone X dans le cortex surrénalien en période péri-natale. D'après Val et al., 2003.

2. La cortico-surrénale : organisation et fonction

La cortico-surrénale entoure la medulla et représente 90% de la masse surrénalienne. Avec les gonades, elle est la principale source d'hormones stéroïdiennes. C'est un composant majeur de l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Cortico-surrénalien (HHC) qui coordonne la réponse au stress. Au cours du développement, elle est issue du primordium adrénogonadique (PAG) qu'elle partage avec les gonades. Le PAG se développe à quatre semaines de gestation chez l'Homme et E9 chez la souris (Hatano et al., 1996). Il est recouvert de cellules de l'épithélium coelomique et se compose de cellules mésodermiques provenant du mésonéphros. Vers la huitième semaine de gestation chez l'Homme et à E10.5 chez la souris, l'ébauche surrénalienne s'individualise dans la partie rostrale du PAG et migre en direction de l'aorte dorsale (Hatano et al., 1996; Val et al., 2003; Val and Swain, 2010). A ce stade, l'ébauche surrénalienne est composée de cellules fœtales (Zubair et al., 2006). Le développement du cortex définitif commence entre la zone fœtale et la capsule. Le stade de régression de la zone fœtale varie en fonction des espèces. En effet, chez l'Homme, la zone fœtale régresse progressivement par apoptose après la naissance ce qui aboutit à un cortex surrénalien humain composé uniquement de cellules corticales dites « adultes » à la fin de la seconde année de la vie (Sucheston and Cannon, 1968; Bocian-Sobkowska, 2000). Par contre, chez la souris, la zone X persiste jusqu'à la première gestation chez la femelle et la puberté chez le mâle (Hershkovitz et al., 2007). La zonation fonctionnelle et histologique de la surrénale définitive est progressive et n'est terminée qu'à la puberté chez l'Homme et en période périnatale chez la souris (Figure 2). Elle permet l'établissement de trois zones concentriques morphologiquement et fonctionnellement différentes : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée (Rainey, 1999) (Figure 1). Chacune de ces zones produit des stéroïdes à partir d'un précurseur commun : le cholestérol.



<u>Figure 3</u> : Schéma simplifié de la synthèse de novo du cholestérol à partir de l'acétate
Le nom des différentes enzymes impliquées dans cette synthèse est présenté en orange. L'HMG CoA réductase est l'enzyme limitante (caractères gras) de la synthèse. Chaque flèche pleine représente une réaction enzymatique alors que la flèche en pointillée représente plusieurs étapes qui n'ont pas été détaillées ici.

II) La stéroidogenèse surrénalienne

1. Prise en charge du cholestérol

A. Entrée du cholestérol dans les cellules stéroidogènes

Les cellules surrénaliennes ont trois sources de cholestérol pour la stéroidogenèse : i) la synthèse *de novo*, ii) les esters de cholestérol stockés dans les gouttelettes lipidiques, iii) l'origine exogène.

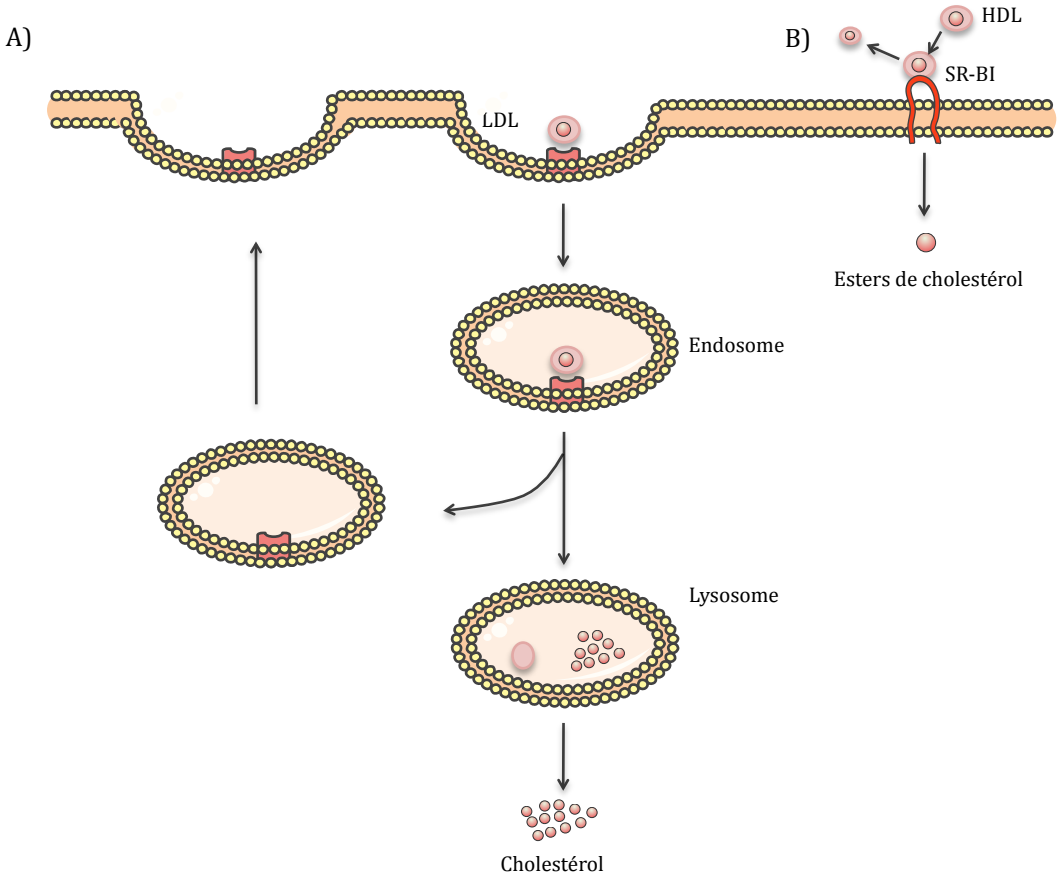
a) Synthèse de novo

Pour répondre à une demande accrue en stéroïdes, les tissus stéroidogènes synthétisent du cholestérol *de novo* dans le réticulum endoplasmique à partir d'acétate. Cette synthèse nécessite l'activité de l'HMG-CoA (Hydroxymethylglutaryl-Coenzyme A) synthase et de l'HMG-CoA réductase cytosolique (Figure 3) (Mason and Rainey, 1987; Porter and Herman, 2011). L'HMG-CoA réductase étant l'enzyme limitante de la réaction, son expression dépend de la concentration de cholestérol intracellulaire. Lorsque le cholestérol intracellulaire diminue, l'expression de l'*HMG-CoA* réductase augmente afin de fournir le cholestérol nécessaire à la synthèse des stéroïdes. La réciproque est également vraie puisqu'une augmentation du cholestérol intracellulaire induit un rétrocontrôle négatif sur l'expression de l'*HMG-CoA* réductase. Toutefois dans la surrénale, ce rétrocontrôle n'a qu'un rôle mineur, l'expression de l'HMG-CoA réductase étant régulée par un des sécrétagogues naturels de la synthèse surrénalienne, l'ACTH (Adreno Cortico Trophic Hormone) (Rainey et al., 1986).

b) Import du cholestérol

L'essentiel des stéroïdes est synthétisé à partir du cholestérol exogène fourni par le foie ou issu de l'alimentation. Il est alors transporté dans le plasma par les lipoprotéines (Gwynne and Hess, 1980; Kovanen et al., 1980; Verschoor-Klootwyk et al., 1982; Gwynne et al., 1984). La contribution du HDL (High Density Lipoprotein) et LDL (Low Density Lipoprotein) à l'apport du cholestérol au niveau des cellules diffère selon les espèces et la nature de la stimulation hormonale.

Chez la majorité des mammifères dont l'Homme, le cholestérol associé au LDL est la première source de stérols intracellulaires (Higashijima et al., 1987; Martin et al., 1999; Liu et al., 2000). En effet, des patients avec des faibles taux de LDL résultants d'une abêtalipoproteinémie congénitale ont des taux de cortisol basaux normaux mais présentent une réponse incomplète à l'ACTH (Illingworth et al., 1982). Le traitement de ces patients avec des statines qui inhibent la production du LDL au niveau du foie et diminuent les taux circulants de LDL ne modifie pas les



<u>Figure 4</u> : Récepteurs aux LDL et aux HDL

A) Le LDL est capté par son récepteur (R-LDL) et entre dans la cellule par endocytose. Le cholestérol estérifié du LDL est alors libéré par le lysosome et le R-LDL est quant à lui recyclé.

B) Les particules de HDL se lient au récepteur SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) qui permet l'entrée sélective du cholestérol sans internalisation de la fraction apolipoprotéique du HDL. Le HDL appauvri en cholestérol est alors relargué.

taux de cortisol démontrant que chez ces patients, la stéroidogenèse a lieu uniquement grâce à la synthèse *de novo* (Miller and Bose, 2011) Le LDL se lie au récepteur membranaire au LDL (LDL-R) ce qui induit son internalisation par endocytose (Brown and Goldstein, 1986; Krieger and Herz, 1994). LDL-R est ensuite recyclé. Le cholestérol estérifié des LDL est quant à lui hydrolysé en cholestérol libre dans les lysosomes par la LAL (lipase acide lysosomiale) (Brown and Goldstein, 1986; Brown et al., 1979). Les patients présentant des mutations causant une perte de l'activité de la LAL à l'origine de la maladie de Wolman ne disposent pas d'une quantité de cholestérol libre suffisante pour réaliser la stéroidogenèse ce qui aboutit à une insuffisance surrénalienne (Miller and Bose, 2011). La désestérification du LDL est donc essentielle pour la stéroidogenèse.

Les rongeurs diffèrent de la plupart des autres mammifères puisqu'ils utilisent principalement le HDL circulant comme source de cholestérol pour la stéroidogenèse (Gwynne and Hess, 1980). Le cholestérol estérifié des HDL entre dans les cellules grâce au récepteur SR-BI (Scavenger Receptor class B type I) qui n'est pas internalisé contrairement à LDL-R (Acton et al., 1996) (Figure 4). Même si SR-BI est le récepteur majoritaire du HDL, des expériences utilisant une lignée de cellules cortico-surrénaliennes murines, les Y1 qui sur-expriment naturellement SR-BI, ont permis de montrer qu'il est également capable de prendre en charge le cholestérol estérifié des LDL dans les tissus stéroidogènes (Swarnakar et al., 1999). Le rôle essentiel de SR-BI dans l'apport de HDL est démontré par une diminution du cholestérol surrénalien observée chez les souris invalidées pour *SR-BI*. Cet apport en cholestérol est essentiel pour la stéroidogenèse puisque ces souris ont une réponse à l'ACTH diminuée de deux fois (Hoekstra et al., 2010). Cependant, étant donné que le HDL n'est pas la source majoritaire de cholestérol chez l'Homme, SR-BI ne joue lui aussi qu'un rôle mineur dans la stéroidogenèse humaine (Liu et al., 2000; Connelly and Williams, 2003; Vergeer et al., 2011).

L'expression des récepteurs *LDL-R* et *SR-BI* est régulée par les sécrétagogues naturels des hormones stéroidogènes, à savoir majoritairement l'angiotensine II dans la zone glomérulée et l'ACTH dans la zone fasciculo-réticulée du cortex surrénalien. En effet, l'expression de *SR-BI* est contrôlée à la fois par l'angiotensine II (Cherradi et al., 2001; Capponi, 2002) et l'ACTH (Rigotti et al., 1996; Liu et al., 2000). Alors que le rôle de l'angiotensine II dans le contrôle de l'expression du *LDL-R* est discutable (Cherradi et al., 2001; Capponi, 2002), l'ACTH induit son expression (Lehoux and Lefebvre, 1991; Cherradi et al., 2001; Capponi, 2002). Les hormones trophiques sont donc capables de réguler l'entrée du cholestérol exogène dans les cellules stéroidogènes afin d'augmenter leur capacité de production. C'est la première ligne de régulation de la voie de biosynthèse des stéroides.

B. Le transport intra-cellulaire du cholestérol

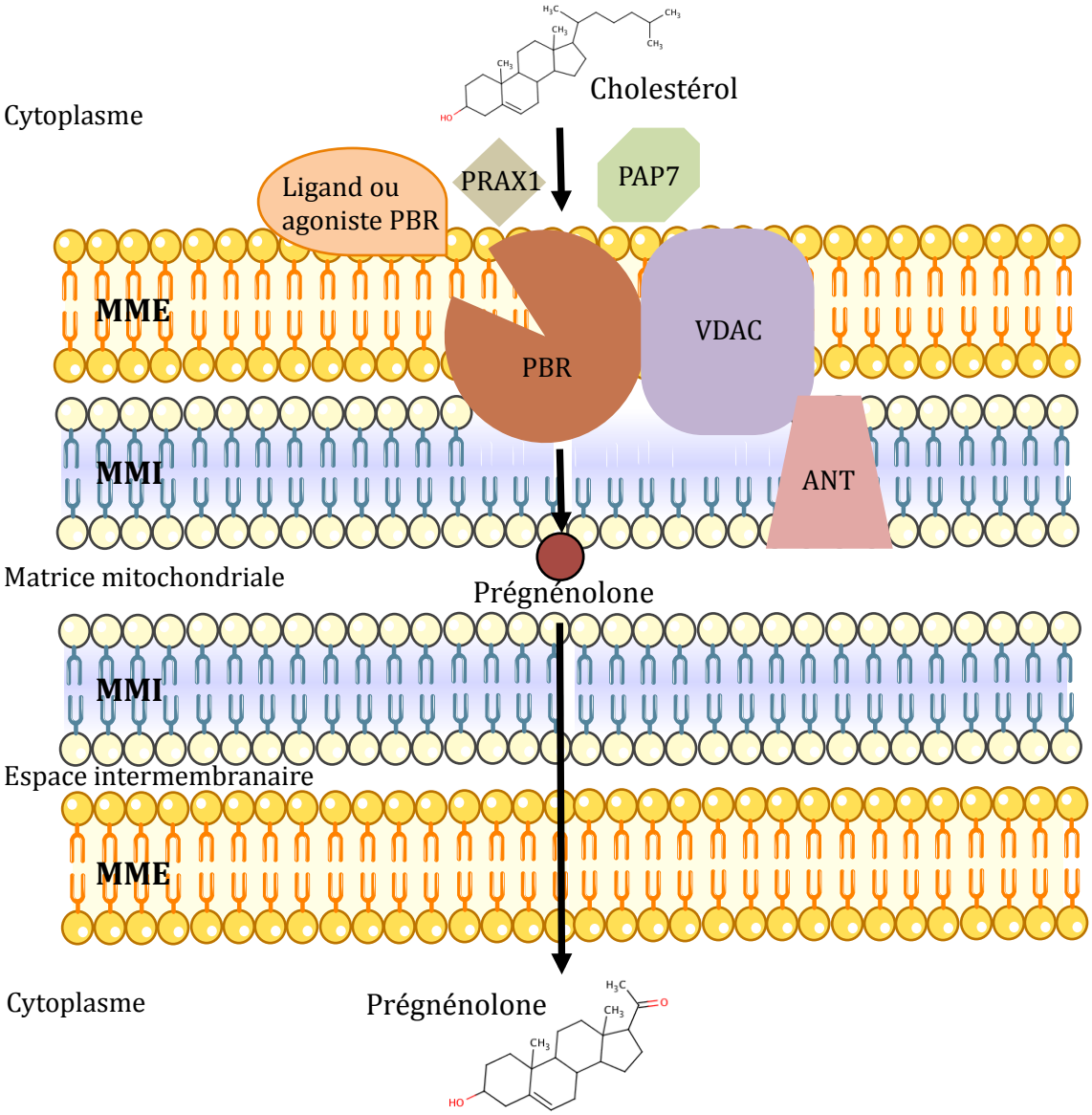
Une fois présent dans les cellules stéroidogènes, le cholestérol est transporté dans la mitochondrie où il est transformé en prégnénolone (précurseur de tous les stéroïdes) et isocaproaldéhyde par l'enzyme CYP11A1 ou P450scc (Cytochrome P450 cholesterol Side Chain Clivage). Les différents systèmes protéiques impliqués dans ce transport sont présentés ici.

a) Rôle de SCP2

Dans le cortex surrénalien, le cholestérol contenu dans des gouttelettes lipidiques est transporté vers la mitochondrie par la protéine SCP2 (Stérol Carrier Protein 2) (Chanderbhan et al., 1982; Vahouny et al., 1983) dont l'expression est stimulée par l'ACTH dans des cellules surrénaliennes de rat (Trzeciak et al., 1987). Cependant, SCP2 apparaît principalement comme un transporteur d'acides gras, d'acyl CoA et d'acide lysophosphatidique. En effet, elle n'a qu'une faible affinité pour le cholestérol et ne joue par conséquent qu'un rôle mineur dans son trafic (Seedorf et al., 2000; Gallegos et al., 2001), comme le prouve l'absence de phénotype reproducteur et d'accumulation de cholestérol observées chez les souris invalidées pour *SCP2* (Seedorf et al., 1998; Fuchs et al., 2001).

b) Rôle de StAR

StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) est une protéine exprimée dans le rein et les tissus stéroidogènes (surrénales et gonades) à l'exception du trophoblaste placentaire humain (Sugawara et al., 1997) où il est remplacé au moins en partie par MLN64. La surexpression de StAR dans des cellules de Leydig MA-10 augmente le taux basal de la stéroidogenèse (Clark et al., 1994) et lorsqu'elle est cotransfectée avec un vecteur exprimant l'enzyme CYP11A1 (P450scc) dans des cellules non stéroidogènes, elle induit la synthèse de prégnénolone (Lin et al., 1995). Ces résultats *in vitro* suggèrent donc que StAR a un rôle essentiel dans le contrôle de la stéroidogenèse. Conformément à cette hypothèse, l'absence de StAR dans un modèle murin conduit à une mortalité périnatale causée par une déficience en glucocorticoïdes (Caron et al., 1997; Hasegawa et al., 2000). La surrénale est le tissu le plus touché avec une désorganisation complète de la zone fasciculée, associée à la présence de nombreux dépôts lipidiques. Ce phénotype est très proche de celui des patients porteurs des mutations du gène *StAR* qui entrainent le développement d'une hyperplasie congénitale lipoïde de la surrénale (Congenital lipoid Adrenal Hyperplasia) (Lin et al., 1995; Bose et al., 1996). Ces anomalies peuvent s'expliquer par un phénomène en deux temps. L'absence de StAR empêche le transport du cholestérol dans la mitochondrie, conduisant à une diminution marquée de la stéroidogenèse. Sur le long terme le cholestérol qui n'est pas pris en charge s'accumule dans les



<u>Figure 5</u> : Modèle du transport du cholestérol par PBR dans la mitochondrie

PBR forme un complexe avec VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) qui est présent au niveau des sites de contact de la membrane mitochondriale externe (MME) et interne (MMI) et ANT (Adenine Nucleotide Translocase) de la MMI. Les protéines associées à PBR, PRAX1 (PBR associated protein) et PAP7 (Peripheral benzodiazepine receptor Associated Protein 7) peuvent faciliter la formation du complexe et le ciblage du cholestérol par PBR. Le transport du cholestérol au travers de la membrane externe par PBR est activé par la liaison de son ligand ou d'un agoniste. Le cholestérol délivré dans la MMI est clivé par CYP11A1 en prégnénolone qui sera ensuite métabolisée par les autres enzymes de la voie de stéroidogenèse. D'après Papadopoulos et al., 2006.

cellules stéroidogènes provoquant des dommages cellulaires importants qui conduisent à un arrêt complet de la stéroidogenèse et à la mort cellulaire (Bose et al., 1996).

StAR est une protéine de 37kDa, présentant un peptide signal d'adressage qui est clivée après son entrée dans la mitochondrie. Toutefois, StAR n'exerce sa fonction de transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie que lorsqu'il est transitoirement associée à la membrane mitochondriale externe (Bose et al., 2002a, 2002b).

La transcription de *StAR* est rapidement régulée par les hormones trophiques dans les cellules stéroidogènes. Toutefois, afin de répondre plus rapidement à une stimulation trophique (réponse aigüe), l'activité de StAR est également stimulée par la phosphorylation d'un résidu sérine conservé entre l'Homme et la souris (Arakane et al., 1997). Cette régulation sera détaillée par la suite.

c) Rôle de PBR

PBR (Peripheral-type Benzodiazepine Receptor) ou TSPO (mitochondrial transporter protein) est l'autre acteur du transport du cholestérol au travers des membranes mitochondriales en réponse aux hormones trophiques. PBR présente un domaine cytoplasmique consensus (CRAC) qui reconnaît le cholestérol (Li et al., 2001) et dont la mutagenèse prévient la stéroidogenèse (Midzak et al., 2011). Le cortex surrénalien est le tissu périphérique où *PBR* est le plus exprimé (De Souza et al., 1985). Au cours du développement, l'ontogenèse de la liaison et de l'immunoréactivité de PBR coïncident avec le démarrage de la stéroidogenèse suggérant que PBR est un pré-requis pour ce processus (Zilz et al., 1999). En accord avec ces résultats, l'invalidation de *PBR* dans les cellules de Leydig par recombinaison homologue (Papadopoulos et al., 1997b) ou grâce à un antisérum (Kelly-Hershkovitz et al., 1998) conduit à une diminution de la stéroidogenèse, associée à une diminution du transport du cholestérol. De la même façon, le traitement de rats avec un inhibiteur spécifique de l'expression et de la liaison au ligand de PBR, l'Egb (extrait de *Gingko biloba*) induit une diminution marquée de la synthèse de corticostérone (Amri et al., 1996) suggérant bien que PBR est nécessaire à la stéroidogenèse (Papadopoulos et al., 1997a).

PBR est une protéine de 18kDa qui n'agit pas seule. PBR est l'unité fonctionnelle minimale pour la liaison aux ligands et au cholestérol (Lacapère et al., 2001) d'un complexe multimérique localisé dans la membrane mitochondriale externe et enrichi dans les zones de contact entre la membrane mitochondriale externe et interne (Gavish et al., 1999; Papadopoulos et al., 2006) (Figure 5). Dans ce complexe, il est associé entre autres à VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) qui est essentiel pour la liaison des benzodiazépine, à une protéine de liaison à PBR (PRAX1) et à une protéine associée à la sous unité R1α de la PKA (Protein Kinase A), PAP7 (Peripherial benzodiazepine receptor Associated Protein 7) qui peuvent faciliter la formation du

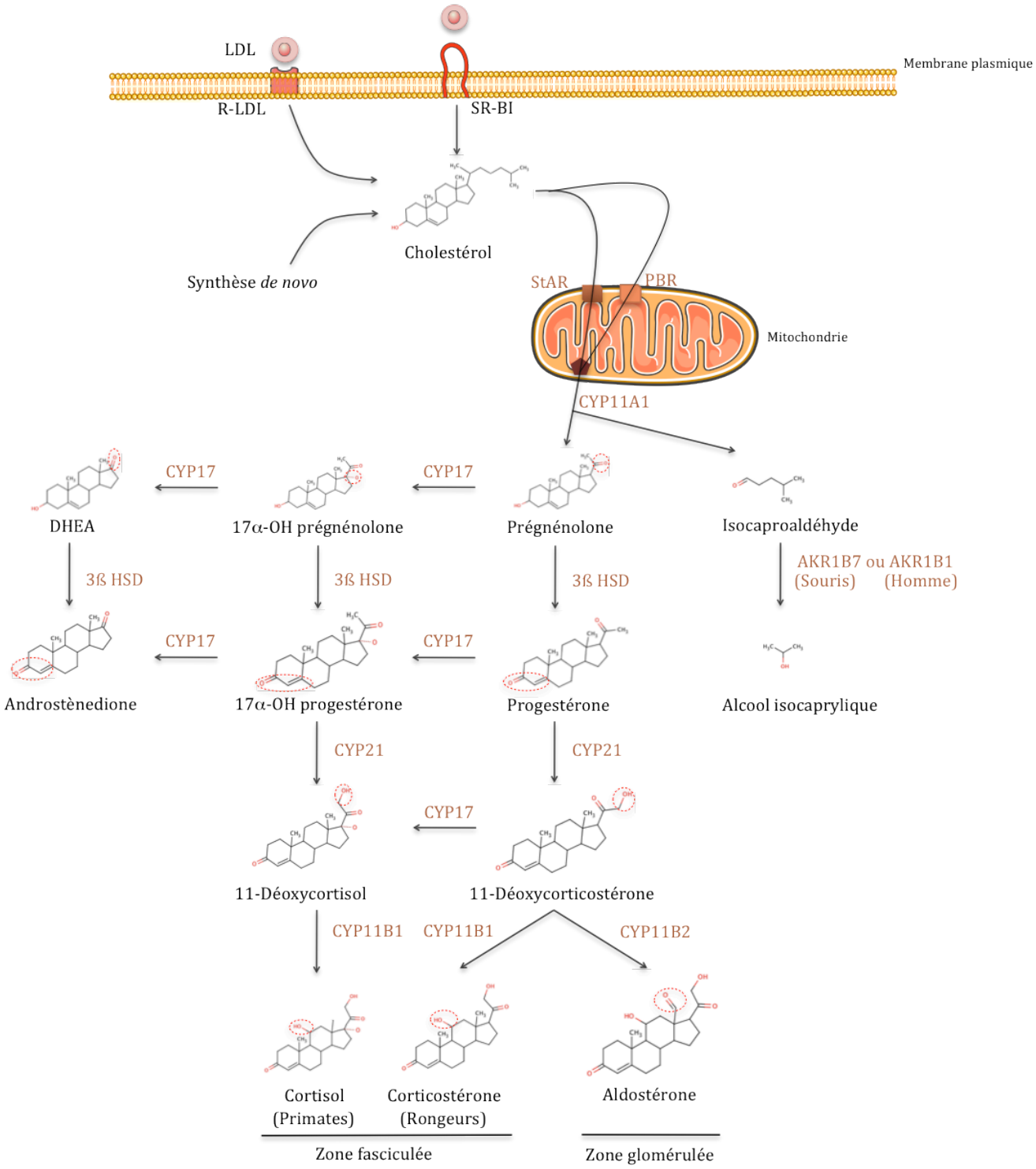
complexe ou la prise en charge du cholestérol par PBR (Papadopoulos et al., 2006). Le rôle de PAP7 sera rediscuté à la fin de ce chapitre.

Le mécanisme de régulation de PBR n'est pas encore clairement établi. L'hypophysectomie (absence d'ACTH) chez des rats induit une diminution considérable (80%) de la quantité de DBI (Diazepam Binding Inhibitor), le ligand de PBR dans la surrénale. Cette diminution est en partie réversible par l'administration d'ACTH. Ceci suggère que l'activité de PBR pourrait être régulée par la disponibilité de son ligand, en réponse à une stimulation par l'ACTH. En accord avec cette hypothèse, il existe une corrélation positive entre la quantité de DBI et la concentration de corticostérone plasmatique (Massotti et al., 1991). La présence de DBI résultant de sa synthèse *de novo* dans la surrénale semble donc être un facteur important dans la régulation de la stéroidogenèse par l'ACTH. Toutefois, d'autres analyses *in vivo* et *in vitro* (Brown et al., 1992 ; Amri et al., 1997) montrent que la synthèse de DBI et de PBR est insensible aux hormones trophiques dont l'ACTH, et que c'est essentiellement la liaison de PBR à son ligand qui module le transport du cholestérol. L'activité de PBR peut nécessiter la présence de modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations par la PKA, le médiateur intracellulaire de l'effet de l'ACTH. En effet, PBR est un substrat de la PKA (Whalin et al., 1994) et il interagit dans le complexe multimérique avec PAP7, une protéine associée à la sous-unité RIα de la PKA ce qui pourrait favoriser sa phosphorylation *in vivo*. Cette association pourrait également permettre de phosphoryler StAR avec qui PBR interagit physiquement et fonctionnellement sur la membrane mitochondriale externe pour favoriser le transfert du cholestérol (Papadopoulos, 1993; Hauet et al., 2005; Liu et al., 2006).

2. Synthèse des stéroïdes

Une fois dans la mitochondrie, le cholestérol est transformé grâce à une série d'hydroxylations impliquant les enzymes cytochrome P450 ou CYP et deux hydroxystéroides déshydrogénases. Les enzymes de type cytochrome P450 sont des hémoprotéines qui transfèrent les électrons du NAPDH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit) vers les stéroïdes via des protéines accessoires et utilisent des molécules d'oxygène pour catalyser les hydroxylations ou autres conversions oxydatives. Les premières étapes de la synthèse de stéroïdes surrénaliens sont communes à l'ensemble des zones corticales. Les dernières étapes de synthèse reposent sur l'expression restreinte des enzymes terminales de synthèse, CYP11B1 et CYP11B2.

La première étape de synthèse se déroule au niveau de la membrane mitochondriale interne. L'enzyme P450scc ou CYP11A1 présente dans les mitochondries de toutes les cellules



<u>Figure 6</u> : Stéroïdogenèse surrénalienne

Le cholestérol présent dans les cellules cortico-surrénaliennes est majoritairement importé sous forme de HDL ou LDL par SR-BI et R-LDL respectivement, en fonction des espèces. Il peut également être synthétisé *de novo*. Il entre ensuite grâce à StAR et PBR dans la mitochondrie où il est clivé en prégnénolone par CYP11A1. La prégnénolone est convertie en progestérone par 3ßHSD dans le cytoplasme puis l'hydroxylation de la progestérone par CYP21 permet de former la 11-déoxycorticostérone. C'est à partir de cette étape qu'apparait la différenciation fonctionnelle entre les zones du cortex. En effet, la 11-déoxycorticostérone est prise en charge par deux enzymes différentes :

- CYP11B1 dans la zone fasciculée pour produire de la corticostérone ou du cortisol
- CYP11B2 dans la zone glomérulée afin de produire l'aldostérone

La principale différence entre la stéroidogenèse chez les primates et les rongeurs réside dans l'absence de CYP17 chez les rongeurs, ce qui se traduit par l'absence de synthèse de cortisol et d'androgènes surrénaliens.

stéroidogènes, clive la chaine latérale du cholestérol produisant de la prégnénolone et de l'isocaproaldéhyde (Figure 6). La prégnénolone ainsi libérée est le précurseur de tous les stéroïdes. C'est pourquoi les souris invalidées pour CYP11A1 présentent une absence de stéroïdes dont les glucocorticoïdes et les minéralocorticoides ce qui cause une létalité périnatale. Chez ces souris, tout comme chez les souris invalidées pour StAR, le cholestérol s'accumule, celui-ci ne pouvant être transformé par la chaîne de stéroïdogenèse (Hu et al., 2002).

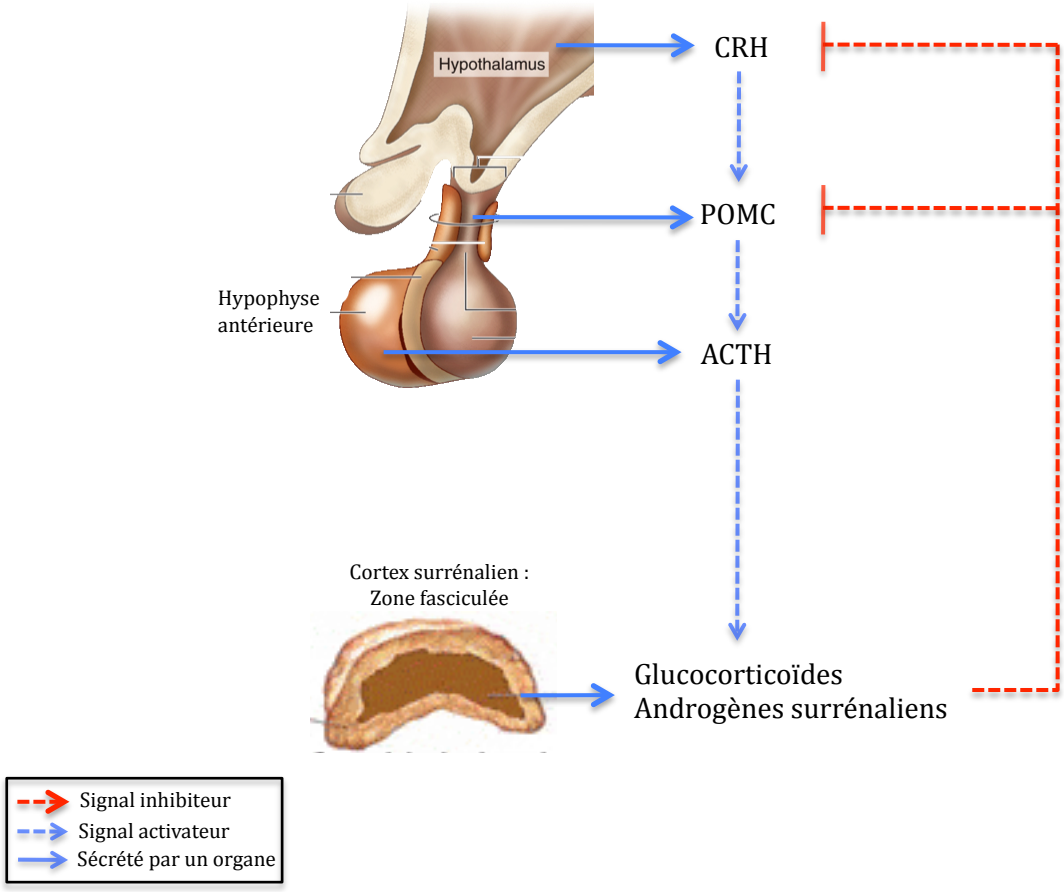
La prégnénolone est ensuite transférée vers la membrane du réticulum endoplasmique où la Δ5-3ß-hydroxystéroïde déshydroxygénase-Δ-4-5 isomérase de type I (3ß-HSD) la convertit en progestérone. Cette dernière est ensuite hydroxylée par le cytochrome P450 21-hydroxylase (P450c21 ou CYP21) ce qui aboutit à la formation de la déoxycorticostérone. Ces étapes de transformation du cholestérol en désoxycorticostérone sont communes à l'ensemble du cortex surrénalien chez la souris. Puis, au niveau de la zone glomérulée, le cytochrome P450 aldostérone synthase (P450c11AS ou CYP11B2) produit l'aldostérone. Par contre, au niveau de la zone fasciculée, c'est le cytochrome P450 11ß hydroxylase (P450c11ß ou CYP11B1) qui forme chez l'Homme, le cortisol, ou chez les rongeurs, la corticostérone. Cette différence ainsi que l'absence de la synthèse d'androgènes chez les rongeurs est causée par l'absence d'expression de la cytochrome P450 17 hydroxylase (P450c17 ou CYP17) dans la surrénale des rongeurs adultes. En effet, la P450c17 possède deux activités enzymatiques :

- seule l'activité 17α-hydroxylase permet la production des glucocorticoïdes
- l'activité 17α-hydroxylase et 17,21-lyase permettent la production des précurseurs des androgènes que sont principalement la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son sulfate (DHEA-S).

3. Détoxification des produits secondaires de la stéroidogenèse

L'isocaproaldéhyde, qui est la chaine latérale du cholestérol libérée par CYP11A1 (P450scc) au niveau de la membrane mitochondriale interne, est un aldéhyde toxique pour la cellule. Il doit donc être inactivé. Pour cela, il peut être dégradé par des enzymes de la famille des aldo-céto réductases ou oxydé par les aldéhydes déshydrogénases (Matsuura et al., 1996; Lefrançois-Martinez et al., 1999). L'équipe d'accueil a démontré que l'activité de réduction de l'isocaproaldéhyde dans des cellules cortico-surrénaliennes de souris, les Y1, est essentiellement prise en charge par l'aldose réductase Akr1b7 (Aldo Keto Reductase ou MVDP : Mouse Vas Deferens Protein). L'invalidation d'*Akr1b7* dans les cellules Y1 induit une augmentation de la mortalité cellulaire résultant de l'accumulation d'isocaproaldéhyde (Lefrançois-Martinez et al.,

1999; Aigueperse et al., 1999, 2001). Chez l'Homme, cette fonction pourrait être assurée par l'aldose-réductase AKR1B1 qui, tout comme Akr1b7, voit son expression induite par l'ACTH (Lefrançois-Martinez et al., 2004).



<u>Figure 7</u> : L'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien (HHC)
Le CRH (Corticotropin Realeasing Hormone) libéré par l'hypothalamus au niveau de l'éminence médiane hypophysaire induit le clivage de la POMC (Pro-opiomélanocortine hypophysaire) et la libération de l'ACTH (Adreno Cortico Trophic Hormone) dans le sang. L'ACTH stimule alors la fonction surrénalienne. Elle joue un rôle mineur dans la production des minéralocorticoïdes, mais son rôle est essentiel pour la synthèse des glucocorticoïdes. En retour, les glucocorticoïdes régulent leur propre synthèse en exerçant un rétrocontrôle négatif sur la synthèse d'ACTH dans l'hypophyse, et dans une moindre mesure, en diminuant l'accumulation des ARNm du CRH au niveau de l'hypothalamus.

III) Contrôle moléculaire de la stéroidogenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, la surrénale adulte est divisée en trois zones fonctionnellement distinctes qui produisent chacune des hormones, l'aldostérone dans la zone glomérulée, la corticostérone/le cortisol dans la zone fasciculée et les androgènes surrénaliens à la fois dans la fasciculée et la réticulée. Les mécanismes moléculaires permettant l'établissement de cette zonation fonctionnelle seront discutés à la suite du second article. Compte-tenu des thématiques abordées au cours de ma thèse, après une succincte présentation des modes de contrôle connus de la sécrétion des glucocorticoïdes et des androgènes, ce chapitre se focalisera sur l'activité de la zone glomérulée et son contrôle.

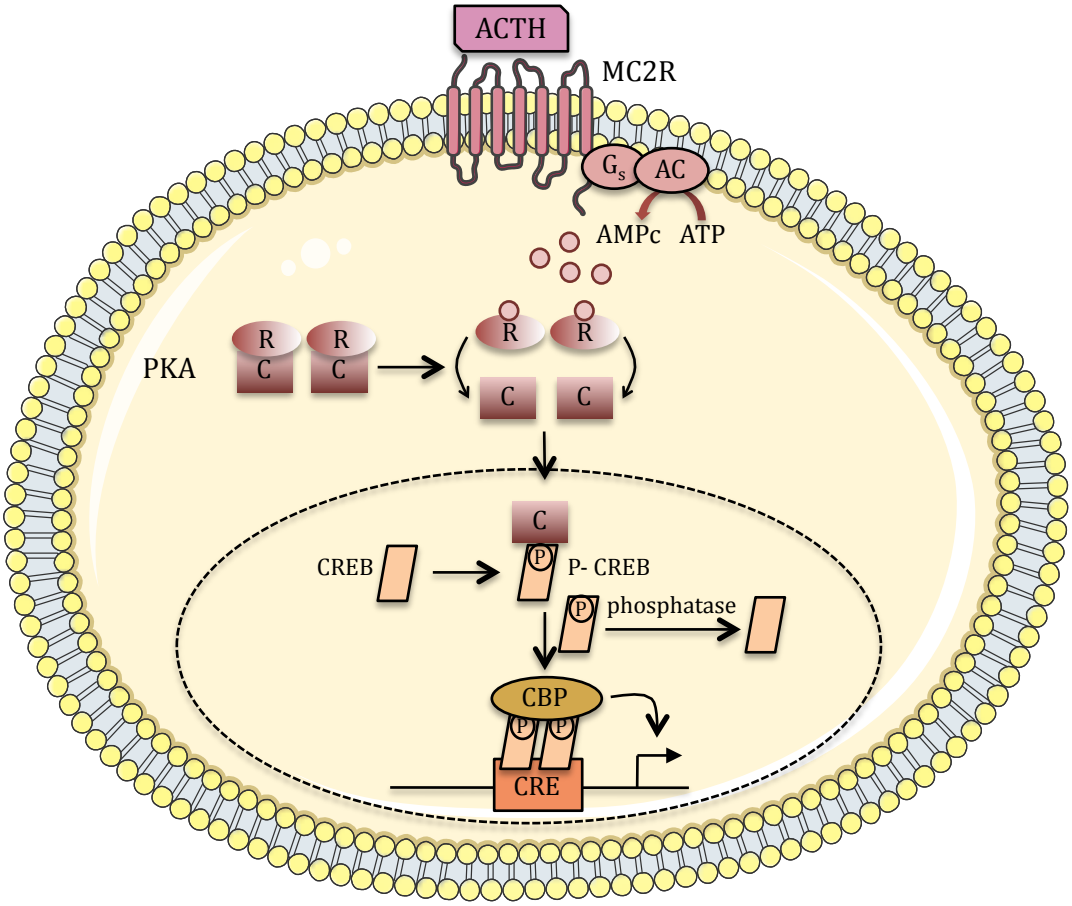
1. Régulation de la sécrétion de glucocorticoïdes par la zone fasciculée

A. La zone fasciculée : description et fonction

La *zone fasciculée* représente l'essentiel du cortex (75-80%), elle est constituée de cordons de cellules stéroïdogènes organisés de façon radiée dans l'axe cortex-medulla. Sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, ces cellules produisent les glucocorticoïdes (le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez les rongeurs). Ces derniers jouent un rôle dans le développement embryonnaire, la réponse inflammatoire, le métabolisme énergétique et la réponse au stress.

B. L'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien

La sécrétion des glucocorticoïdes est contrôlée par des interactions hormonales entre l'hypothalamus, l'hypophyse, la glande surrénale et des stimuli nerveux (Orth, D.N. and Kovacs, N.J., 1998). Les stimuli nerveux induisent la synthèse et la libération par l'hypothalamus du peptide CRH (Corticotropin Realeasing Hormone) et d'AVP (Arginine Vasopressin) dans le système porte-hypothalamo-hypophysaire. Une fois au niveau des cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure, le CRH et l'AVP stimulent la synthèse de pro-opiomélanocortine hypophysaire (POMC) dont le clivage protéolytique aboutit à la synthèse d'ACTH et d'autres peptides en quantité équimolaire (les hormones lipotropes (LPHs), les hormones mélanotropes (MSH), etc…) (Figure 7). Bien que le CRH soit le régulateur physiologique majeur de la sécrétion d'ACTH, d'autres facteurs comme les catécholamines et la sérotonine peuvent également intervenir dans ce processus. L'action du CRH se traduit essentiellement par la sécrétion d'ACTH mais il induit également la synthèse des transcrits de POMC dans les cellules corticotropes. L'AVP est un faible stimulateur de la sécrétion d'ACTH mais il potentialise l'action du CRH (Aguilera, 2011).



<u>Figure 8</u> : Activation de la voie de la protéine kinase A

La liaison de l'ACTH (Adreno Cortico Trophic hormone) sur son récepteur couplé aux protéines G, MC2R induit l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui transforme l'ATP en AMPc. Deux molécules d'AMPc vont alors se fixer sur les sous-unités régulatrices (R) de la protéine kinase A (PKA) ce qui induit un changement de conformation et libère les sous unités catalytiques (C) actives. Les sous unités catalytiques migrent alors dans le noyau où elles phosphorylent et activent des facteurs de transcription tels que CREB présenté ici. CREB phosphorylé se fixe alors sur ses éléments de réponse à l'AMPc, présents dans le promoteur de ses gènes cibles et recrute des co-activateurs comme CBP (CREB-binding protein).

L'ACTH se lie alors à des récepteurs spécifiques MC2R (MelanoCortin 2 Receptor) sur la membrane des cellules cortico-surrénaliennes, afin de stimuler la production des glucocorticoïdes (voir « Mode d'action de l'ACTH : la voie AMPc/PKA»).

Les glucocorticoïdes régulent leur propre synthèse en agissant sur les quantités d'ACTH plasmatiques. Ils inhibent au niveau de l'hypophyse antérieure, la transcription de *POMC*, la sécrétion d'ACTH et l'expression du récepteur *CRH* (Figure 7). Toutefois, une étude du redémarrage de l'axe hypothalamo-hypophysaire suite à l'opération des tumeurs de Cushing démontre que l'action inhibitrice des glucocorticoides sur l'hypophyse est inférieure à celle exercée sur l'hypothalamus (Gomez et al., 1993). Ces effets inhibiteurs sur la transcription des gènes *POMC* et *CRH* passe par l'intermédiaire du récepteur aux glucocorticoides, GR (Glucocorticoid Receptor) qui se fixe sur des nGRE (negative Glucocorticoid Respond Element) présents dans les promoteurs de ces gènes (Therrien and Drouin, 1993; Dostert and Heinzel, 2004).

C. Mode d'action de l'ACTH : la voie AMPc/PKA

L'ACTH agit au niveau des cellules cortico-surrénaliennes grâce à sa liaison à son récepteur à sept domaines transmembranaires, MC2R. Cette interaction induit un changement de conformation de son récepteur couplé aux protéines Gs libérant ainsi la sous-unité α qui active l'adénylate cyclase membranaire. Cette dernière convertit alors l'ATP en un messager secondaire, l'AMPc (Figure 8). L'AMPc se lie sur les deux sous-unités régulatrices de la PKA ce qui entraine leur changement de conformation et la libération des deux sous-unités catalytiques. Les sous-unités catalytiques de la PKA peuvent alors phosphoryler les résidus sérine de nombreuses protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Parmi ces cibles, la protéine CREB (CRE-binding protein) est un facteur de transcription avec un motif « leucine zipper » qui lui permet de former des homodimères. La PKA activée phosphoryle CREB sur la sérine en position 133, induisant sa liaison sur ses éléments de réponse CRE (cAMP response élément) et le recrutement du co-activateur CBP (CREB-binding protein) qui contacte la machinerie de transcription. Les éléments de réponse CRE sont retrouvés dans le promoteur de certains gènes de la stéroidogenèse (StAR, par exemple) dont l'expression sera stimulée par l'activation de la PKA.

CREB n'est pas le seul facteur de transcription de la voie de signalisation de l'AMPc. En effet, il existe également des combinaisons de facteurs, dont certains sont sensibles à l'AMPc, qui agissent sur un gène donné au travers des unités de réponse à l'AMPc. C'est le cas par exemple, de *CYP11A1* (Ahlgren et al., 1999) et *Akr1b7* (Aigueperse et al., 2001) dont l'expression est régulée par le facteur Sp1 (Selective promoter factor 1). Cependant, outre les facteurs de

transcription sensible à l'AMPc, d'autres acteurs participent également au contrôle de la transcription des gènes de la stéroidogenèse pour une réponse maximale à l'ACTH. C'est le cas du récepteur nucléaire orphelin Sf1 qui se fixe sur une séquence d'ADN consensus de type PyCAAGGPyPy ou PuPuAGGTCA, présente dans le promoteur des gènes codant pour les enzymes de la stéroidogenèse *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP21* afin d'activer leur transcription (Val et al., 2003).

2. Régulation de la sécrétion des androgènes par la zone réticulée

La *zone réticulée*, essentiellement retrouvée chez les primates, est formée de cordons cellulaires disposés de façon réticulaire et bordant la medulla. Elle produit de faibles quantités de glucocorticoïdes et elle est également la source de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et de son dérivé sulfaté (DHEAS). Ces deux androgènes surrénaliens peuvent ensuite être convertis en testostérone et 5α-dihydrotestostérone (DHT) dans les tissus périphériques. Alors que chez l'homme, la quantité d'androgènes produite par le cortex surrénalien est très faible à côté de celle issue des testicules, chez la femme, la *zone réticulée* est la seule source d'androgènes. Chez les rongeurs, la zone la plus interne du cortex est appelée la zone X. Contrairement à la *zone réticulée*, la zone X ne produit pas d'androgènes à cause de l'absence d'une des enzymes surrénaliennes, CYP17. La zone X est en fait dérivée de la surrénale fœtale (Morohashi and Zubair, 2011) et régresse par apoptose après la première gestation chez la femelle et après la puberté chez le mâle sous l'action de l'activine (Beuschlein et al., 2003).

La régulation de la sécrétion des androgènes est moins bien documentée que celle des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes. Les concentrations en DHEA, androstenedione et testostérone plasmatiques sont corrélées aux variations du taux de cortisol au cours du rythme circadien, suggérant que le cortisol et l'ACTH jouent un rôle important dans le contrôle de leur sécrétion. La DHEAS qui présente un temps de demi-vie circulatoire plus long ne suit pas ce rythme et n'augmente que deux à trois jours après un traitement à l'ACTH (Orth, D.N. and Kovacs, N.J., 1998).

3. Régulation de la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée

A. La zone glomérulée : description et fonction

La *zone glomérulée* est située juste en dessous de la capsule conjonctive et tient son nom de l'aspect de glomérules des cellules irrégulièrement disposées en amas qui la composent. L'expression restreinte de *CYP11B2* dans la zone glomérulée permet la production de l'aldostérone, un minéralocorticoïde qui joue un rôle essentiel pour le contrôle de la balance

sodium/potassium et de l'homéostasie acido-basique des organismes vertébrés. Ses principales cibles physiologiques sont les cellules épithéliales, en particulier dans le néphron distal du rein où l'aldostérone induit la réabsorption du Na+ et l'élimination du K+ et H+. Ces changements dans la balance du sodium modifient la composition de l'espace extracellulaire et modulent de fait, la pression sanguine. En plus de cette action au niveau épithélial, l'aldostérone joue un rôle dans la fonction du système cardio-vasculaire par son action sur le cœur et les vaisseaux. La synthèse d'aldostérone est augmentée par une perte de sodium aigüe ou chronique, une perte de fluide, une surcharge en potassium venant de l'alimentation ou un dommage tissulaire induisant une hyperkaliémie. La sécrétion d'aldostérone qui a un rôle essentiel dans le contrôle du fluide extracellulaire et de la circulation, est finement contrôlée par de nombreux facteurs hormonaux et paracrines *in vitro* e*t in vivo*. Toutefois, dans des conditions physiologiques, sa sécrétion est principalement régulée par le système rénine-angiotensine, les concentrations de potassium et l'ACTH.

B. Réponse rapide et tardive aux sécrétagogues naturels de l'aldostérone

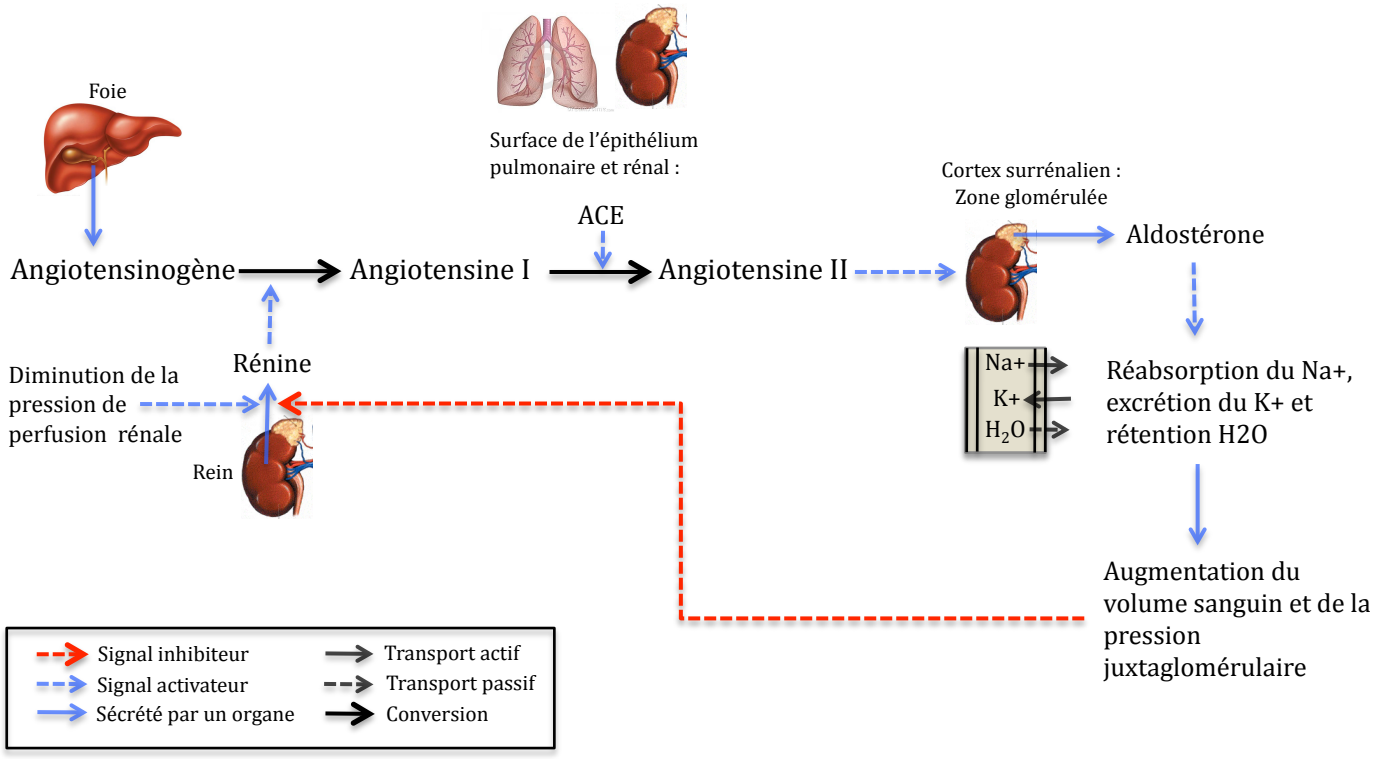
Contrairement à l'ACTH qui ne contrôle que rapidement la sécrétion d'aldostérone, l'angiotensine II et le potassium eux présentent deux modes d'action distincts : une action rapide et une action tardive.

a) <u>Réponse rapide</u>

Aussi appelé effet aigü, la réponse rapide induit la sécrétion d'aldostérone en quelques minutes après la stimulation. Le cholestérol stocké dans le cytoplasme étant le précurseur limitant, son transfert dans la mitochondrie assuré par la protéine StAR est essentiel pour la stéroidogenèse. Lors de la réponse rapide, les voies de signalisation activées en réponse aux sécrétagogues stimulent la production d'aldostérone en contrôlant l'activité de StAR (expression et phosphorylation) pour augmenter le mouvement du cholestérol dans la mitochondrie (Arakane et al., 1997; Cherradi et al., 1998; Fleury et al., 2004; Manna et al., 2009).

b) <u>Réponse tardive</u>

Aussi appelée effet chronique, la réponse tardive correspond à une stimulation prolongée, de plusieurs heures à plusieurs jours. Les changements induits par l'angiotensine II et le potassium sont alors plus drastiques avec une hypertrophie et une hyperplasie des cellules qui mènent à un élargissement de la zone glomérulée (McEwan et al., 1999; Dierks et al., 2010). Cependant, la stimulation chronique induit également une augmentation de la production d'aldostérone par unité de cellule. Ainsi, cette stimulation induit l'expression des enzymes impliquées dans la voie de synthèse de l'aldostérone dont l'aldostérone synthase, *CYP11B2*



<u>Figure 9</u> : Représentation schématique de la synthèse d'angiotensine II et de son effet sur le cortex surrénalien

Le précurseur de la synthèse d'angiotensine II est l'angiotensinogène qui est produit au niveau du foie. Il est ensuite clivé en angiotensine I par la rénine sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire du rein, en réponse à une diminution de la pression sanguine. L'angiotensine I est, à son tour, clivée par l'enzyme de conversion (ACE) produite au niveau de l'épithélium pulmonaire et rénal. L'angiotensine II ainsi formée induit alors la sécrétion d'aldostérone au niveau des cellules de la zone glomérulée du cortex surrénalien. L'aldostérone sécrétée va agir au niveau des tubes distaux du rein afin de favoriser la réabsorption du sodium, la rétention de l'eau et l'élimination du potassium. Ceci induit une augmentation de la pression sanguine, ce qui inhibe la sécrétion de rénine au niveau du rein et donc la production d'angiotensine II.

(Bassett et al., 2004c), dans la synthèse des protéines responsables de l'entrée du cholestérol dans la cellule (SR-BI et LDL-R) ou de sa synthèse *de novo*.

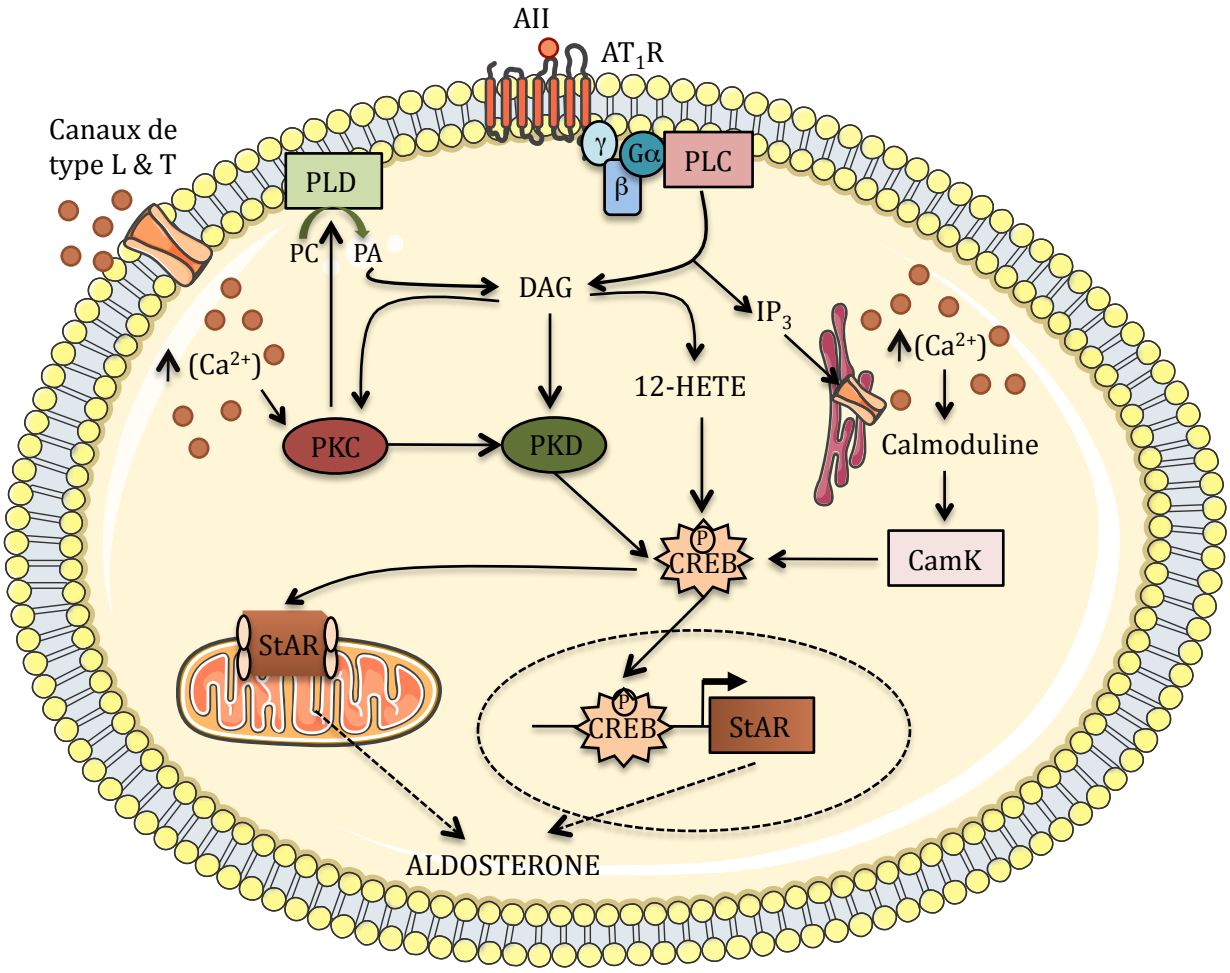
Les effets sur la prolifération cellulaire ne seront pas discutés dans ce chapitre qui se consacre aux rôles de l'angiotensine II, du potassium et de l'ACTH sur le contrôle de la synthèse d'aldostérone dans une cellule de la zone glomérulée.

C. Contrôle et effet de la production d'angiotensine II

Toute diminution du volume intra-vasculaire, notamment celle causée par un faible apport en sodium ou par un passage de la position couchée à la position debout induit une augmentation de la sécrétion d'aldostérone aboutissant à la rétention du sodium et de l'eau. En effet, les artérioles rénales répondent aux modifications de la pression de perfusion moyenne captées par des barorécepteurs grâce à la sécrétion de rénine par l'appareil *juxta-glomérulaire* (composé des cellules *juxta-glomérulaires* du rein près de la *macula densa)* dans le sang et la lymphe (Blalock and Levy, 1937; Tagawa et al., 1974). La rénine libérée catalyse alors la transformation de l'angiotensinogène hépatique en angiotensine I, lui même converti en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans les poumons. Le clivage NH_2-terminal de l'angiotensine II produit un heptapeptide, l'angiotensine III dont le niveau circulant est 5 fois plus faible que celui de l'angiotensine II (Goodfriend and Peach, 1975). L'angiotensine II et l'angiotensine III sont équipotents pour stimuler la sécrétion d'aldostérone par la *zone glomérulée* du cortex surrénalien même si l'angiotensine II est un vasopresseur plus efficace (Blair-West et al., 1980; Gibbons et al., 1984). L'augmentation de la sécrétion d'aldostérone en réponse à l'angiotensine II induit la réabsorption du sodium et la rétention de l'eau par les tubules rénaux distaux. Ceci conduit à une augmentation du volume sanguin qui provoque une diminution de la sécrétion de la rénine et *in fine,* une réduction de la production d'angiotensine II (rétrocontrôle négatif) (Figure 9).

a) Les récepteurs à l'angiotensine II

L'action de l'angiotensine II au niveau des cellules de la zone glomérulée est médiée par sa liaison sur son récepteur à haute affinité dans la membrane plasmique (Goodfriend and Peach, 1975). Les récepteurs à l'angiotensine II font partie de la classe des récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés aux protéines G. Il existe deux catégories majeures de récepteurs à l'angiotensine II, type 1 (AT1R) et type 2 (AT2R) (Balla et al., 1991; Whitebread et al., 1989). Chez l'Homme, contrairement à AT2R dont l'expression est principalement fœtale et se restreint à l'utérus, l'ovaire, le cœur, certains noyaux du cerveau et la médullosurrénale à l'âge adulte, AT1R est ubiquiste et retrouvé dans de nombreux tissus adultes dont le vaisseau



<u>Figure 10</u> : Régulation aigüe de la synthèse d'aldostérone par l'angiotensine II

L'angiotensine II (AII) agit au travers de sa liaison sur son récepteur couplé aux protéines G, AT1R. La liaison de l'AII sur AT1R stimule les protéines G qui activent à leur tour la phospholipase C (PLC) qui transforme le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) en deux messagers secondaires, le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP_3). Le DAG active les protéines kinases C (PKC) et D (PKD). La PKC active la phospholipase D (PLD) qui transforme la phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) qui est métabolisé en DAG. Ce DAG peut activer la CRE-binding protein (CREB) par l'intermédiaire de la PKD. Le DAG peut également être métabolisé en 12-acide hydroxyeicosatetraenoique (12-HETE) qui peut induire la phosphorylation et l'activation de CREB.

L'IP3 induit une sortie du calcium contenu dans le reticulum endoplasmique, induisant une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium qui est amplifiée par l'ouverture des canaux de type L & T. Le calcium cytoplasmique se lie alors aux calmodulines et active les kinases dépendantes des calmodulines (CaMK). Les CaMK phosphorylent alors CREB, qui migre dans le noyau pour se fixer sur les éléments de réponse à l'AMPc dans le promoteur du gène Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) et active également StAR par phosphorylation.

sanguin, le cœur, le rein et la cortico-surrénale (Bergsma et al., 1992). Par conséquent, dans la zone glomérulée, l'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone via AT1R (Hajnóczky et al., 1992; Tsuchida et al., 1998). Chez les rongeurs, deux isoformes d'AT1R ont été identifiées, AT1aR et AT1bR qui possèdent 94% d'homologie par rapport à leur séquence en acides aminés et ont des propriétés pharmacologiques, des sites de liaisons au ligand et des propriétés d'activation similaires (Kim and Iwao, 2000). Bien que ces deux isoformes diffèrent par leur distribution tissulaire, elles sont toutes les deux exprimées dans la zone glomérulée (Nogueira et al., 2009a).

La liaison de l'angiotensine II sur son récepteur AT1R active principalement via les protéines $G_{q,}$ les phospholipases A2 (PLA2), C (PLC) et D (PLD) qui activent à leur tour, la protéine kinase C (PKC) et la voie de signalisation Ca^{2+} (Figure 10). Toutefois, il est intéressant de noter que l'angiotensine II stimule également la voie Janus kinase (JAK) et des tyrosines kinase tels que les src-family kinase (SRC) indépendamment des protéines G (Nogueira et al., 2009a). Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur le rôle de la voie PLC/Ca^{2+} qui est la première voie activée suite à l'interaction de l'angiotensine II et d'AT1R, en seulement quelques secondes (Spät and Hunyady, 2004).

b) Signalisation des protéines G

L'activation de la phospholipase C est dépendante de la signalisation des protéines G qui sont des protéines hétérotrimériques composées de polypeptides Gα, Gß, Gγ. Quand l'angiotensine II se fixe sur AT1R, cela induit un changement de conformation du récepteur et favorise l'échange du GDP par du GTP au niveau de la sous-unité Gα. La liaison de la protéine G avec le GTP induit la dissociation de la sous unité Gα du complexe Gßγ. La protéine Gα active ensuite la cascade de signalisation intra-cellulaire déclenchée par le ligand. Il existe différentes classes de protéines Gα en fonction de l'effecteur qu'elles contrôlent. Dans le cadre de l'activation par l'angiotensine II, AT1R est lié à la protéine Gαq/11 qui active la phospholipase C (PLC) (Spät and Hunyady, 2004). Cette dernière assure alors la transformation du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP_2) en deux messagers secondaires, l'inositol triphosphate (IP_3) et le 1,2-diacylglycérol (DAG) (Figure 10) (Farese et al., 1981; Kojima et al., 1984a; Barrett et al., 1989; Hunyady et al., 1990; Bollag et al., 1991; Bird et al., 1993).

c) *Rôle du diacylglycérol : Activation de la protéine kinase C*

Le DAG libéré par la PLC est un messager secondaire qui induit la redistribution des sérine/thréonine kinases de la famille des PKC du cytosol à la membrane et augmente leur activité, mesurée par la phosphorylation d'un peptide substrat exogène (Kojima et al., 1994). Toutefois, le rôle effecteur du DAG dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone au travers de la PKC demeure controversé puisque certains auteurs rapportent un effet activateur de la PKC sur la sécrétion d'aldostérone et d'autres un effet inhibiteur (Hajnóczky et al., 1992; LeHoux et al., 2001). Quoi qu'il en soit, un traitement simultané avec de la PLD exogène (qui augmente les taux de DAG) et un agoniste des canaux calciques (BAY K8644) dans des cellules bovines de glomérulée, induit une augmentation de la réponse à l'angiotensine II (Bollag et al., 1990). Ceci suggère que l'effet activateur de la PKC est dépendant de la stimulation concomitante de la voie de signalisation du calcium. Ces observations sont confirmées par l'utilisation d'agents pharmacologiques qui miment la signalisation de la PKC et du Ca^{2+} et qui reproduisent une réponse équivalente à la réponse induite par l'angiotensine II (Hattangady et al., 2012).

D'un point de vue moléculaire l'activation de la PKC par le DAG coïncide avec la phosphorylation (Betancourt-Calle et al., 2001a) et l'augmentation de l'expression de la protéine StAR (Manna et al., 2009). La phosphorylation de StAR étant requise pour sa pleine activité (Manna et al., 2009), ces observations suggèrent que l'effet de la PKC sur la synthèse d'aldostérone pourrait passer par l'activation de StAR. En accord avec ces corrélations, Bollag et ses collaborateurs ont démontré que le traitement de cellules cortico-surrénaliennes humaines, les H295R avec des esters de phorbol (activateur de la PKC), augmente les taux de cholestérol intra-mitochondrial et la sécrétion d'aldostérone (Bollag et al., 2008). Ces résultats suggèrent donc une implication de la PKC dans la production d'aldostérone, au travers du contrôle de l'import mitochondrial du cholestérol.

Outre StAR, l'utilisation d'ARN interférants et d'inhibiteurs de la PKC dans des cellules de Leydig MA-10, a permis de démontrer que l'isoforme epsilon de la PKC régule l'expression de *PBR* qui est chargé avec StAR, de transporter le cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie (Batarseh et al., 2008). Si ces résultats se confirment dans des cellules de glomérulée, l'activation de la PKC, suite à une induction par l'angiotensine II, pourrait faciliter le transfert du cholestérol dans la mitochondrie grâce à une action coordonnée sur StAR et PBR. Cependant, dans des cellules H295R, l'isoforme epsilon de la PKC inhibe l'expression de CYP11B2 et a donc un effet négatif sur la sécrétion chronique d'aldostérone (Lehoux and Lefebvre, 2007). Il semblerait donc que l'isoforme epsilon de la PKC ait un rôle bivalent en favorisant la synthèse d'aldostérone en réponse rapide à l'angiotensine II puis en l'inhibant lors d'un effet chronique. Toutefois, de manière générale, le phorbol-12-myristate-13 acetate (PMA), un activateur de la PKC, induit

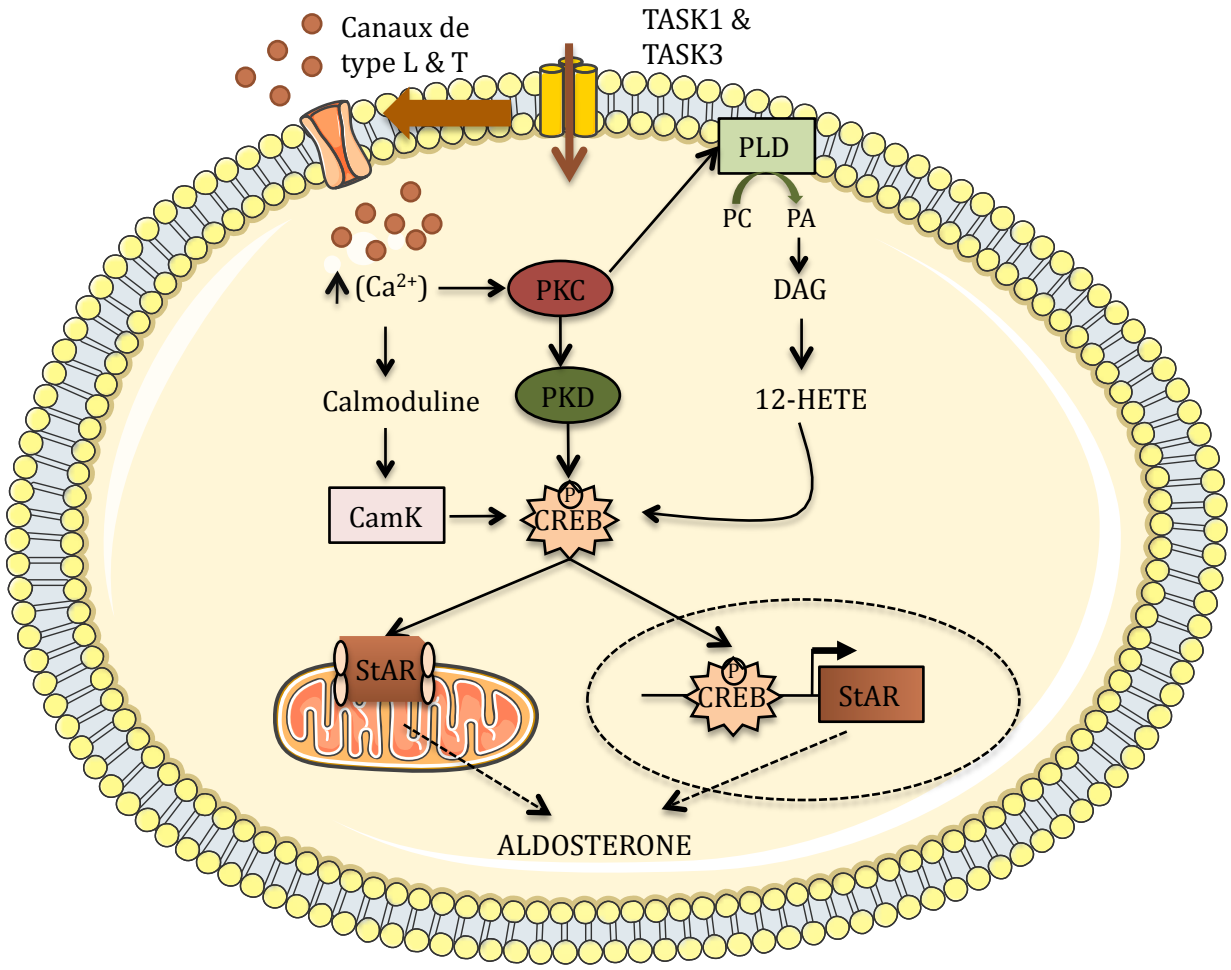
l'expression de *SR-BI* et de *LDL-R* (Pilon et al., 2003), ce qui favorise l'entrée de cholestérol dans la cellule et donc la production d'aldostérone. L'implication de la PKC dans la réponse chronique, semble donc pouvoir varier en fonction de(s) l'isoforme(s) mobilisée(s).

d) Action de l'IP_3 : augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique

A des concentrations physiologiques, l'angiotensine II provoque une variation oscillative des concentrations cytoplasmiques de calcium due au pic d'IP_3 observé 10 à 15 secondes après l'induction (Spät and Hunyady, 2004). Ainsi, l'IP_3 libéré par l'hydrolyse dépendante de la PLC du PIP_2 augmente la concentration cytoplasmique de calcium en mobilisant à la fois des stocks intra et extracellulaires. Contrairement à l'effet de la PKC sur la sécrétion d'aldostérone qui reste toujours controversé, l'action essentielle du calcium est bien caractérisée.

L'IP_3 permet la libération du calcium contenu dans des vésicules sensibles à l'IP_3 du réticulum endoplasmique, grâce à sa liaison sur ses récepteurs (IP_3R) à haute affinité. Il existe trois IP_3R (IP_3R1, IP_3R2, IP_3R3) qui sont tous exprimés dans la zone glomérulée de rat même, si IP_3R1 est le plus fortement retrouvé. L'activité de ces récepteurs est donc biensur régulée par leur liaison avec l'IP_3 mais également par d'autres acteurs de la voie calcique. Ainsi, suite à l'induction à l'angiotensine II, la PKC et la CaMKII phosphorylent les IP_3R pour favoriser leurs activités alors que la calcineurine les déphosphore ce qui inhibe l'action de l'IP_3 quand la concentration de calcium cytoplasmique est trop élevée (Spät and Hunyady, 2004). Dans les 20 minutes suivant l'induction, le pic de calcium est maintenu en absence de Ca^{2+} extracellulaire, il résulte donc uniquement de la libération du calcium des stocks intracellulaires sensible à l'IP_3.

Cependant, cette augmentation du calcium cytoplasmique est ensuite suivie par un influx calcique voltage dépendant et capacitatif. Ainsi, l'angiotensine II inhibe les canaux potassiques TWIK-related acid-sensitive K (TASK) et les Na+/K+ ATPase qui maintiennent le potentiel de la membrane à l'état de repos, ce qui induit une dépolarisation membranaire (Matsunaga et al., 1987). Cela permet l'ouverture des canaux calciques dits voltage-dépendants de type T (Transitoire) ou L (long-lasting) ce qui induit une entrée de calcium extracellulaire. Les canaux de type T qui présentent un seuil d'activation (environ -70mV) beaucoup plus faible que les canaux de type L semblent être les principaux médiateurs de la réponse à l'angiotensine II, même si les canaux de type L sont activés dans le cortex surrénalien bovin (Hattangady et al., 2012).



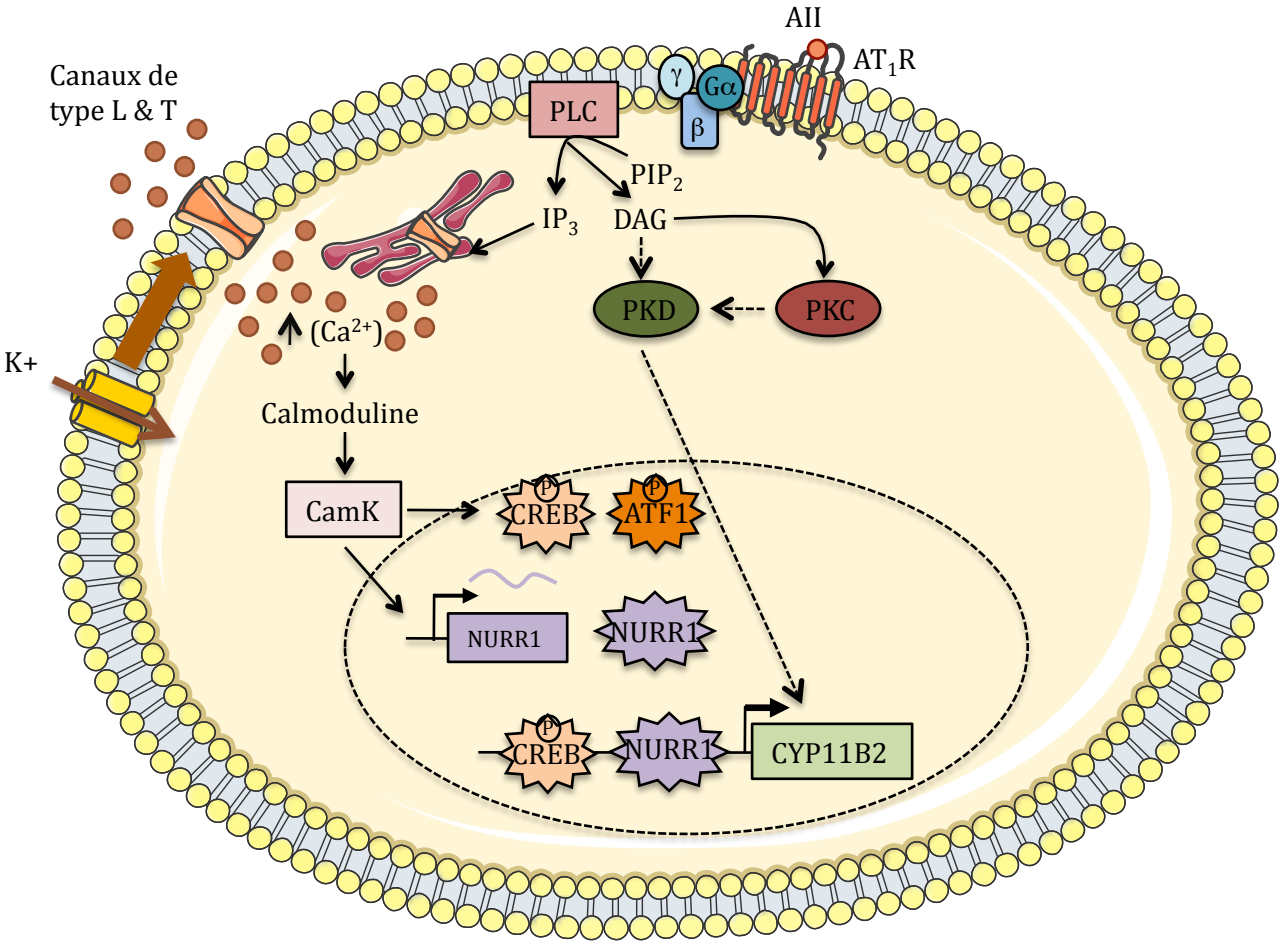
<u>Figure 11</u> : Régulation aigüe de la synthèse d'aldostérone par le potassium

De petites augmentations de la concentration extracellulaire de potassium induisent la dépolarisation de la membrane des cellules de la zone glomérulée, ce qui active les canaux calciques de type T (Transitoire) et de type L (long-lasting). Le calcium entre dans la cellule ce qui augmente sa concentration cytoplasmique. Il se lie alors aux calmodulines et active les kinases dépendantes des calmodulines (CaMK). Les CaMK phosphorylent alors CRE-binding protein (CREB), lui permettant de se lier au promoteur de StAR pour activer sa transcription et de le phosphoryler pour activer la protéine StAR. Parallèlement, l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique active la PKC qui a deux actions distinctes. D'une part, elle stimule la PKD qui phosphoryle également CREB. D'autre part, la PKC active la phospholipase D qui transforme le phosphatidylcholine (PC) en acide phosphatidique (PA) qui est métabolisé en DAG. Le DAG sera ensuite métabolisé en 12-acide hydroxyeicosatetraenoique (12-HETE) qui peut lui aussi phosphoryler CREB et permettre l'activation de StAR par phosphorylation et par stimulation de son promoteur.

D. Effets et mode d'action de l'augmentation de la concentration de potassium sur les cellules de la zone glomérulée : dépolarisation membranaire

L'augmentation des concentrations sériques de potassium, induit directement au niveau du cortex surrénalien, la sécrétion d'aldostérone qui à son tour, diminue le taux de potassium sérique par la stimulation de son élimination au niveau du rein (Orth, D.N. and Kovacs, N.J., 1998). Il existe donc une relation réciproque entre le potassium sérique et la concentration d'aldostérone. Les cellules de la zone glomérulée sont très sensibles à toute modification de la concentration de potassium puisque chez un patient sain, une injection de potassium pourtant insuffisante pour modifier sa concentration sérique, induit une augmentation de 25% de la concentration d'aldostérone plasmatique (Himathongkam, T., Dluhy, R. G., Williams, G. H., 1975). Par conséquent, une prise importante de potassium augmente la sécrétion d'aldostérone, mais aussi la réactivité de sa production en réponse au potassium lui-même ou à l'angiotensine II (Dluhy et al., 1972). Réciproquement, une diminution de la concentration de potassium induit une baisse de la réponse à l'angiotensine II, ce qui est essentiel pour éviter une élimination excessive de potassium et donc une hypokaliémie (Hattangady et al., 2012). Cet effet doit être causé par l'hyperpolarisation de la membrane, induite par la perte de potassium qui limite l'ouverture des canaux calciques, même en réponse à l'angiotensine II.

Bien que cela reste toujours soumis à caution, plusieurs voies de signalisation seraient impliquées dans la production d'aldostérone suite à une stimulation par le potassium. En effet, certaines équipes ont observé une augmentation du niveau d'AMPc suite à une augmentation du niveau de potassium extracellulaire (Tait and Tait, 1999). Le potassium stimule également l'activité PLD au travers des canaux calciques voltage-dépendants (Betancourt-Calle et al., 2001b), mais le mécanisme exact d'activation, ainsi que le rôle de la PLD dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone, restent à découvrir. L'effet le mieux caractérisé du potassium reste donc son action directe au niveau de la membrane plasmique en modifiant sa polarité. Ainsi, une augmentation de la concentration de potassium au niveau extracellulaire dépolarise la membrane, ce qui induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants transitoires de type T et d'action longue de type L (Spät and Hunyady, 2004). C'est l'étape initiale de la transduction du signal (Figure 11). Comme attendu, suite à l'ouverture des canaux calciques, il y a une augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique libre qui est corrélée avec une augmentation de la production d'aldostérone (Braley et al., 1986; Capponi et al., 1984; Connor et al., 1987).



<u>Figure 12</u> : Régulation chronique de la synthèse d'aldostérone par l'angiotensine II et le potassium

Tout comme pour la réponse aigue, la liaison de l'angiotensine II sur AT1R induit l'activation de la phospholipase C (PLC) qui transforme le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DAG) et inositol triphosphate (IP_3). Le DAG active la protéine kinase D (PKD) directement ou par l'intermédiaire de la stimulation de la protéine kinase C (PKC). L'activation de la PKD permet alors de stimuler l'expression de CYP11B2. D'autre part, l'IP_3 permet la libération des stocks de calcium contenus dans le réticulum endoplasmique. Le calcium cytoplasmique se lie aux calmodulines pour activer les protéines kinases dépendantes des calmoduline (CaMK) qui stimulent alors les facteurs de transcription qui contrôlent l'expression de l'aldostérone synthase, CYP11B2. Parmi ces facteurs de transcription, il y a les protéines de la famille b-ZIP-CREB (CRE binding protein (CREB), ATF1) et NURR1 qui sont activées respectivement par phosphorylation et au niveau transcriptionnel. NURR1, CREB et ATF1 se fixent ensuite sur leurs éléments de réponse dans le promoteur de l'aldostérone synthase (CYP11B2) afin de stimuler sa transcription. Le mécanisme d'activation de l'expression de CYP11B2 par le potassium est identique à celui de l'IP_3. Toutefois, dans ce cas, l'augmentation de la concentration de calcium cytoplasmique est due à la dépolarisation membranaire. En effet, suite à une augmentation de la concentration de potassium extracellulaire, la membrane se dépolarise ce qui ouvre les canaux calciques de type (transitoire) T et (long-lasting) L contenus dans la membrane plasmique et permet l'entrée du calcium extracellulaire.

E. Médiateurs intra-cellulaires de la réponse à l'angiotensine II et au potassium

a) Importance des flux calciques et activation des calmoduline kinases

Même si les étapes initiales de la transduction du signal diffèrent, la stimulation des cellules de la zone glomérulée par l'angiotensine II ou par le potassium, induit dans les deux cas une augmentation de la concentration du calcium cytoplasmique. Or ce flux calcique est indispensable pour la réponse à ces sécrétagogues puisque son blocage pharmacologique (nitrendipine, mibefradil) diminue ou abolit l'induction de la sécrétion d'aldostérone par l'angiotensine II et le potassium (Kojima et al., 1984, 1985b; Rossier et al., 1998; Hattangady et al., 2012).

La principale protéine de liaison au calcium retrouvée dans le cortex surrénalien bovin et de rat est la calmoduline (CaM), dont les antagonistes inhibent la production d'aldostérone en réponse à l'angiotensine II ou au potassium (Pezzi et al., 1996). Une fois activée par le calcium, les CaM sont donc importantes pour contrôler la stéroidogenèse au travers de leur capacité à activer les protéines kinases dépendantes du Ca^{2+}/CaM (CaMK). Ainsi, le traitement de cellules de la zone glomérulée humaine, bovine ou de rat avec le KN93, un inhibiteur des CaMK abolit la production d'aldostérone en réponse à l'angiotensine II et au potassium, sans inhiber l'augmentation de la concentration de calcium intra-cellulaire (Gambaryan et al., 2006; Pezzi et al., 1996; Pezzi et al., 1997). L'activation des CaMK, observée suite à l'induction par l'angiotensine II en test kinase *in vitro,* est donc essentielle à la réponse à l'angiotensine II. Les trois membres de la famille des CaMK (CaMKI, CaMKII, CaMKIV) sont exprimés dans les cellules de la zone glomérulée bovine et de rat, à des niveaux quasiment similaires (Gambary an et al., 2006). Le rôle de la CaMKII dans la réponse aigüe a été validé dans ces cellules de glomérulée bovine et de rat, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette isoforme, le 27-mer CNT, qui inhibe la sécrétion d'aldostérone induite par l'angiotensine II. De plus, dans les cellules H295R, l'utilisation du 22R-OH cholestérol qui entre dans la mitochondrie indépendamment de StAR, améliore la synthèse d'aldostérone, qui n'est plus inhibée par le KN93. Les CaMK semblent donc avoir une action dans le transport mitochondrial du cholestérol. Cependant, la protéine StAR n'est pas diminuée suite au traitement avec le KN93 (Pezzi et al., 1997). Il serait donc intéressant d'évaluer la phosphorylation de StAR en réponse au KN93. D'autre part, les CaMK interviennent dans la réponse chronique au travers de la régulation de l'expression de CYP11B2 (Pezzi et al., 1997). Des analyses *in vitro* dans les cellules H295R suggèrent que c'est la CaMKI qui est impliquée dans ce contrôle (Condon et al., 2002). Bien que l'effet et l'identité des CaMK impliquées semblent dépendre de la nature rapide ou tardive de la réponse, leur mode d'action est identique. Les CaMK phosphorylent des facteurs de transcription qui varient en fonction du type de réponse et activent l'expression ou l'activité de leurs gènes cibles (Figure 10, 11 et 12).

b) Facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'angiotensine II et au potassium

(1) Famille CREB/(ATF)

Le facteur de transcription CREB (CRE-binding protein) intervient à la fois dans la réponse rapide et tardive. Il appartient à la famille des protéines b-ZIP-CREB/CREM, qui comprend CREB, CREM (CREmodulator), ATF1 (Activating Transcription Factor), ATF2, ATF3, ATF4 et ATF5. Ces facteurs de transcription reconnaissent une séquence d'ADN consensus dont la mieux caractérisée nommée CRE (cAMP Response Element) est 5'-TGACGTCA-3'. L'activité de CREB est stimulée par une phosphorylation de sa Sérine 133 (Cho et al., 2011). Bien que la famille CREB soit décrite comme une famille de facteurs de réponse à l'AMPc, il a été démontré que la phosphorylation activatrice de la sérine 133 de CREB est retrouvée suite à une activation de la voie calcique, dans des cellules issues d'un phéochromocytome. Ainsi, les CaMKI et CaMKII activées par la voie calcique sont capables de phosphoryler CREB qui à son tour, recrute le complexe CBP (CREB binding protein)/p300 pour activer la transcription de ses gènes cibles (Sheng et al., 1991). Cette phosphorylation de CREB est essentielle à la production des glucocorticoïdes et des minéralocorticoides. En effet, des souris portant une substitution de ce résidu sérine en alanine, empêchant la phosphorylation de CREB, présentent une diminution de la stéroidogenèse (Manna et al., 2009).

L'augmentation des ARNm et des protéines de StAR suite à une induction aigüe par l'angiotensine II et par le potassium est essentielle pour induire rapidement une augmentation de la stéroidogenèse (Clark et al., 1995). L'effet de CREB sur le promoteur de *StAR* a principalement été décrit en réponse à l'AMPc, mais comme la voie calcique semble également capable d'activer CREB, ces effets doivent pouvoir être extrapolables. Il a été démontré que la surexpression de *CREB* dans des cellules de Leydig MA-10 ou cortico-surrénaliennes Y1 est capable d'augmenter la réponse transcriptionnelle de StAR à l'AMPc (Manna et al., 2002). De plus, dans les cellules MA-10, CREB interagit avec CBP au niveau des éléments CRE en *cis*, présents sur le promoteur de *StAR* (Clem et al., 2005).

L'expression de l'aldostérone synthase est également stimulée suite à une induction chronique par l'angiotensine II et le potassium. Le promoteur humain de *CYP11B2* présente un site consensus CRE et 2 sites NBRE (NGFIB response element)/Ad qui seront discutés par la suite. La mutation des sites CRE du promoteur de *CYP11B2* auxquels se lient CREB mais également ATF1 et ATF2 en retardement sur gel (Bassett et al., 2000), induit une diminution de la sécrétion d'aldostérone en basal mais présente toujours une réponse aux sécrétagogues (angiotensine II et K+) (Nogueira and Rainey, 2010). Ces résultats suggèrent que outre CREB, ATF1 et ATF2 qui sont phosphorylés suite à l'induction à l'angiotensine II (Nogueira and Rainey,

2010) peuvent également intervenir dans la régulation de l'expression de *CYP11B2*. En accord avec cette hypothèse, la liaison d'ATF1, ATF2 et CREM sur le site CRE a été confirmée *in vivo* par des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (Nogueira and Rainey, 2010). De plus, la transfection de siARN dirigés contre ATF1, ATF2 et CREM induit une diminution des niveaux des transcrits de CYP11B2 en réponse à l'angiotensine II ou au potassium (Nogueira and Rainey, 2010). Ces données confirment bien l'implication de ces facteurs dans la régulation de l'expression de *CYP11B2*. Malheureusement, la faible expression de *CREB* dans les cellules H295R n'a pas permis aux auteurs de réaliser les mêmes analyses pour CREB. Toutefois, la liaison de CREB au domaine CRE en retardement sur gel (Bassett et al., 2000), suggère qu'il peut également contrôler l'expression de *CYP11B2*. L'ensemble de ces analyses démontre l'importance des facteurs de la famille des protéines b-ZIP-CREB/CREM dans le contrôle de l'expression de *CYP11B2* en condition basale et en réponse à l'angiotensine II et au potassium.

(2) Les facteurs NURRs

Cette famille de récepteurs nucléaires orphelins comprend 3 membres : nuclear subfamily 4 group A member 1 (NR4A1=NUR77=NGFIB), NR4A2 (=NURR1) et NR4A3 (=NOR), tous exprimés dans le cortex surrénalien humain (Bassett et al., 2004; Fernandez et al., 2000). Toutefois, une analyse immunohistochimique a montré que *NURR1* est plus spécifiquement exprimé dans la zone glomérulée humaine en condition basale (Bassett et al., 2004c). Des analyses différentielles de transcriptome réalisées sur des cellules de glomérulée bovine ou de rat en culture primaire, ainsi que sur les cellules H295R ont démontré une augmentation de l'expression des facteurs de transcription de la famille NGFIB (Neuronal Growth Factor Induced clone B) dans chacun de ces types cellulaires suite à un traitement par l'angiotensine II (Nogueira et al., 2007). La surexpression de *NURR1* et *NUR77* est également retrouvée suite à une induction au potassium. Leur surexpression après un traitement à l'angiotensine II ou au potassium suggère que la transcription de ces récepteurs nucléaires peut être régulée par la voie calcique et les CaMK. Conformément à cette hypothèse, des traitements avec le KN93 (inhibiteur des CaMK) diminuent significativement la stimulation de leur expression après chacun des traitements (Bassett et al., 2004b; EF Nogueira, Y Xing, CAV Morris, and WE Rainey, 2009). Toutefois, l'angiotensine II semble induire également des effets dépendant de la PKC, comme le prouve la diminution de l'induction des récepteurs NGFIB suite au traitement avec le GFX (inhibiteur de la PKC) (Bassett et al., 2004b).

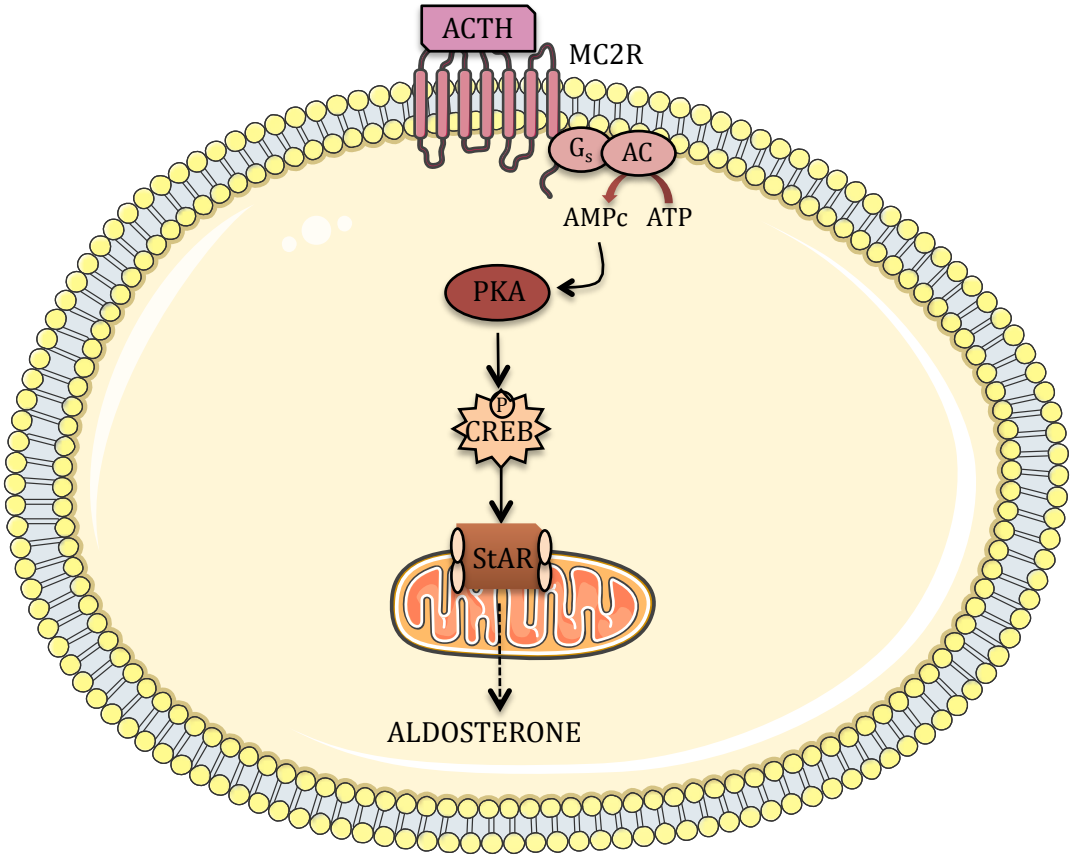
Les récepteurs de la famille NGFIB agissent en monomère afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles, au travers de leur liaison à une séquence d'ADN consensus de type 5'-AAAGGTCA-3' appelée NBRE. Des analyses *in silico* du promoteur de CYP11B2 ont identifié trois sites potentiels de liaison pour les membres de cette famille : un élément de réponse à l'AMPc

(CRE)/Ad1 et deux éléments distaux (Ad5 et NBRE). Les analyses de délétions et de mutagenèse du promoteur de CYP11B2 ont confirmé l'importance de ces éléments en *cis* pour le contrôle de l'activité du promoteur de CYP11B2 en condition basale et en réponse à l'angiotensine II, par les facteurs de la famille NGFIB (Bassett et al., 2004; EF Nogueira et al., 2009). De plus, des transfections de formes constitutivement actives de membres de la famille CREB/ATF (ATF1, ATF2, CREB ou CREM) ont permis de démontrer une synergie entre NURR1 et ces facteurs pour réguler l'expression de *CYP11B2* (Nogueira and Rainey, 2010). Par conséquent, les facteurs de la famille CREB/ATF et NGFIB ont un effet complémentaire pour une stimulation maximale de l'expression de *CYP11B2*, en réponse aux sécrétagogues.

En plus de CYP11B2, les membres de la famille NGFIB sont également capables de réguler l'expression de deux autres enzymes de la voie de stéroidogenèse, *CYP21* et *HSD3B2*, au travers de leur liaison sur des sites NBRE ou des sites de faible affinité pour Sf1 (Wilson et al., 1993; Bassett et al., 2004a). Ces observations suggèrent un rôle essentiel de la famille NGFIB dans le contrôle de la synthèse d'aldostérone. Toutefois, le rôle de ces facteurs dans la production d'aldostérone est plus difficile à mettre en évidence *in vivo*. En effet, les souris invalidées génétiquement pour *Nur77* ne présentent pas de défaut de production de corticostérone (Crawford et al., 1995) bien que *NUR77* contrôle l'expression de CYP21 *in vitro* (Wilson et al., 1993). La production d'aldostérone n'a, elle, pas été évaluée chez ces souris. Une des hypothèses pouvant expliquer ce résultat est la redondance fonctionnelle entre les différents membres de cette famille, qui partagent entre 91 et 97% d'homologie dans le domaine de liaison à l'ADN. En accord avec cette hypothèse, l'expression de Nurr1 est augmentée d'un facteur trois, chez les souris invalidées pour *Nur77*. L'expression de *NOR1* n'a malheureusement pas été analysée (Crawford et al., 1995). Toutefois, *in vitro Nurr1* et *Nor1* sont tous les deux capables de stimuler l'expression de CYP21 (Fernandez et al., 2000; EF Nogueira et al., 2009), suggérant que *Nor1* et *Nurr1* peuvent compenser l'absence de *Nur77*.

Une indication d'un rôle potentiel des membres de la famille NGFIB dans la production d'aldostérone *in vivo*, provient de l'observation de la surexpression de *NURR1* (Lu et al., 2004) ainsi que des trois enzymes de la voie de stéroidogenèse *HSD3B2*, *CYP21* et *CYP11B2* (Bassett et al., 2005) dont il peut contrôler l'expression *in vitro*, dans les tumeurs productrices d'aldostérone. Même si ces données ne permettent pas de confirmer le rôle physiologique des NGFIB, elles suggèrent que la dérégulation de ces facteurs peut contribuer à la production anormale d'aldostérone *in vivo*.

Le récepteur nucléaire orphelin Sf1 (NR5A1) joue un rôle essentiel pour le développement surrénalien et contrôle l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse dans la



<u>Figure 13</u> : Régulation aigüe de la production d'aldostérone par l'ACTH
Comme pour les cellules de la zone fasciculée, l'action de l'ACTH (Adreno Cortico Trophic Hormone) sur les cellules de la zone glomérulée passe par son récepteur MC2R (MelanoCortin 2 Receptor). L'interaction entre l'ACTH et MC2R induit une activation de l'adénylate cyclase (AC) qui transforme l'ATP en AMPc. L'AMPc active alors la protéine kinase A (PKA) en libérant ses sous unités catalytiques qui phosphorylent et activent le facteur de transcription CREB (CRE-binding protein). CREB phosphorylé active StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) en le phosphorylant, ce qui augmente l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie et donc la synthèse d'aldostérone.

zone fasciculée, en se liant à un site consensus proche des NGFIB (Val et al., 2003). Toutefois, à l'inverse de ces facteurs, il voit son expression diminuer suite à une induction par l'angiotensine II ou par le potassium (Demura et al., 2011). L'effet négatif de ces deux sécrétagogues naturels de l'aldostérone sur l'expression de Sf1, semble cohérente au vu de la capacité de Sf1 à réprimer l'expression de *CYP11B2*, en condition basale et en réponse à l'angiotensine II (Bassett et al., 2004c). Cependant, le mode d'action de Sf1 impliquant son niveau d'expression, dans sa capacité à réprimer *CYP11B2*, reste toujours à élucider (Ye et al., 2009).

F. Effets de l'ACTH sur les cellules de la zone glomérulée : la voie PKA

L'ACTH stimule la sécrétion aigüe d'aldostérone à la fois *in vivo* et *in vitro*. Tout comme pour les cellules de la zone fasciculée, l'action de l'ACTH nécessite sa liaison au niveau de son récepteur couplé aux protéines G, MC2R, ce qui active l'adénylate cyclase. Elle produit alors un messager secondaire AMPc qui stimule l'activité de la protéine kinase dépendante de l'AMPc ou protéine kinase A (PKA) (Figure 13). La PKA active alors StAR en le phosphorylant sur les sérines en position 56 et 194 ce qui augmente le passage du cholestérol au travers de la membrane mitochondriale (Betancourt-Calle et al., 2001a). En plus, la PKA peut réguler l'activité transcriptionnelle des facteurs de la famille de CREB qui possèdent des sites de liaison dans le promoteur de *StAR* (Manna et al., 2009). Cette régulation induit une augmentation rapide de l'expression de *StAR* et améliore la production d'aldostérone en phase aigüe.

L'ACTH induit également un flux calcique, probablement grâce à une phosphorylation des canaux calciques de type L, par la PKA (Sculptoreanu et al., 1993). L'augmentation de la concentration de calcium intra-cellulaire améliore alors la production de l'AMPc (Gallo-Payet et al., 1996) et par conséquent, la sécrétion d'aldostérone. Néanmoins, il a été démontré que la production d'aldostérone induite par l'ACTH n'est inhibée que de 30% par des inhibiteurs de la PKA (Gambaryan et al., 2006), suggérant que l'ACTH présente également une action indépendante de la PKA. Conformément à cette hypothèse, un inhibiteur spécifique des CaMK, le KN93 abolit complètement la production d'aldostérone, sans action sur l'activité PKA. Le médiateur de l'AMPc nécessaire à l'activation des CaMK reste toujours à déterminer.

Contrairement à l'angiotensine II et au potassium, l'ACTH n'induit pas la sécrétion d'aldostérone de manière chronique. En effet, des analyses *in vivo* démontrent qu'une stimulation à l'ACTH induit initialement la sécrétion d'aldostérone chez l'Homme et l'accumulation des transcrits de CYP11B2 chez le rat mais qui diminue progressivement après une journée (Holland and Carr, 1993; Fuchs-Hammoser et al., 1980). Le mécanisme mis en jeu dans cette répression de la sécrétion d'aldostérone et de l'expression de *CYP11B2*, en réponse chronique à l'ACTH, reste toujours inconnu. Toutefois, comme l'ACTH est le régulateur majeur de la synthèse de cortisol, les précurseurs des stéroïdes peuvent être majoritairement utilisés

par CYP11B1 et CYP17, dont l'expression est induite par l'ACTH, ce qui diminuerait la quantité de substrat disponible pour la synthèse d'aldostérone (Bird et al., 1996). Bien que le promoteur de *CYP11B2* présente des éléments de réponse à l'AMPc (CRE), l'ACTH n'induit pas son expression (Holland and Carr, 1993). Le mécanisme moléculaire empêchant le contrôle du promoteur de *CYP11B2*, par l'augmentation de la concentration d'AMPc induite par l'ACTH, reste encore à élucider. Toutefois, deux hypothèses peuvent être formulées. Tout d'abord, il a été démontré que l'angiotensine II, au travers de AT1R, active les protéines de liaison à la guanine inhibitrices (Gi) qui inhibent la formation d'AMPc, stimulée par l'ACTH (Begeot et al., 1988). D'autre part, les cellules de la zone glomérulée expriment des adenylyl cyclases qui sont inhibées par une augmentation de la concentration en calcium intra-cellulaire. Or cette augmentation est induite à la fois par l'angiotensine II et le potassium (Hattangady et al., 2012). Ces données suggèrent donc que l'ACTH peut induire la synthèse d'aldostérone, uniquement dans des situations de stress aigü mais pas en chronique.

IV) Tumeurs cortico-surrénaliennes

Le cortex surrénalien peut présenter deux types de tumeurs : des tumeurs bénignes, adénomes ou hyperplasies et des tumeurs malignes dites carcinomes. L'ensemble des tumeurs cortico-surrénaliennes (TCS) est soit silencieux, soit sécréteur d'une ou plusieurs hormones cortico-surrénaliennes. Elles induisent alors divers troubles regroupés sous le terme hypercorticisme. Il existe l'hypercorticisme glucocorticoïdes (ou hypercortisolisme), l'hypercorticisme minéralocorticoïdes (ou hyperaldostéronisme), l'hyperandrogénie surrénalienne (ou hyperandrogénisme) et l'hyperoestrogénie. En fonction de la nature de l'hormone hypersécrétée, les tumeurs cortico-surrénaliennes sont à l'origine de trois grands syndromes endocriniens qui seront présentés dans ce chapitre.

1. Tumeurs bénignes de la cortico-surrénale et syndromes associés

Les adénomes cortico-surrénaliens (ACS) sont des lésions bénignes de un ou plusieurs centimètres dont la fréquence augmente au fil de l'âge. En effet, une lésion surrénalienne est observée chez approximativement 0,2% des patients de 20 à 29 ans subissant un CT scan contre 7 à 10% chez la population de plus de 50 ans (Grumbach et al., 2003; Boland et al., 2008). Environ 94% des adénomes surrénaliens sont dits silencieux ou non fonctionnels mais ils peuvent produire des hormones surrénaliennes en excès dont principalement le cortisol (5%) (Latronico and Chrousos, 1997; Boland et al., 2008).

Il existe également différents types d'hyperplasies cortico-surrénaliennes. Les hyperplasies diffuses sont caractérisées par une augmentation globale, harmonieuse et souvent bilatérale de la taille des surrénales. Les hyperplasies micro ou macronodulaires qui sont à l'origine d'un syndrome de Cushing seront présentées par la suite.

A. Le syndrome de Cushing

Le syndrome de Cushing est le résultat d'une hypersécrétion de glucocorticoïdes qui entraîne de nombreux symptômes dont les plus évidents sont le visage dit « lunaire » (gonflé et rouge) et le « buffalo neck » (formations lipidiques qui s'enkystent au niveau du cou). Cet hypercortisolisme peut être soit d'origine exogène soit endogène. S'il est exogène, le syndrome de Cushing est causé par la prise excessive de corticostéroïdes retrouvés dans les anti-inflammatoires ou les immunosuppresseurs. Il est alors dépendant de la médication et sera réversible par le changement du traitement. Le syndrome de Cushing endogène est quant à lui dû à une rupture de la dynamique de l'axe hypothalamo-hypophyso-cortico-surrénalien (HHC) qui mène à une sécrétion anormale de cortisol (Guaraldi and Salvatori, 2012).

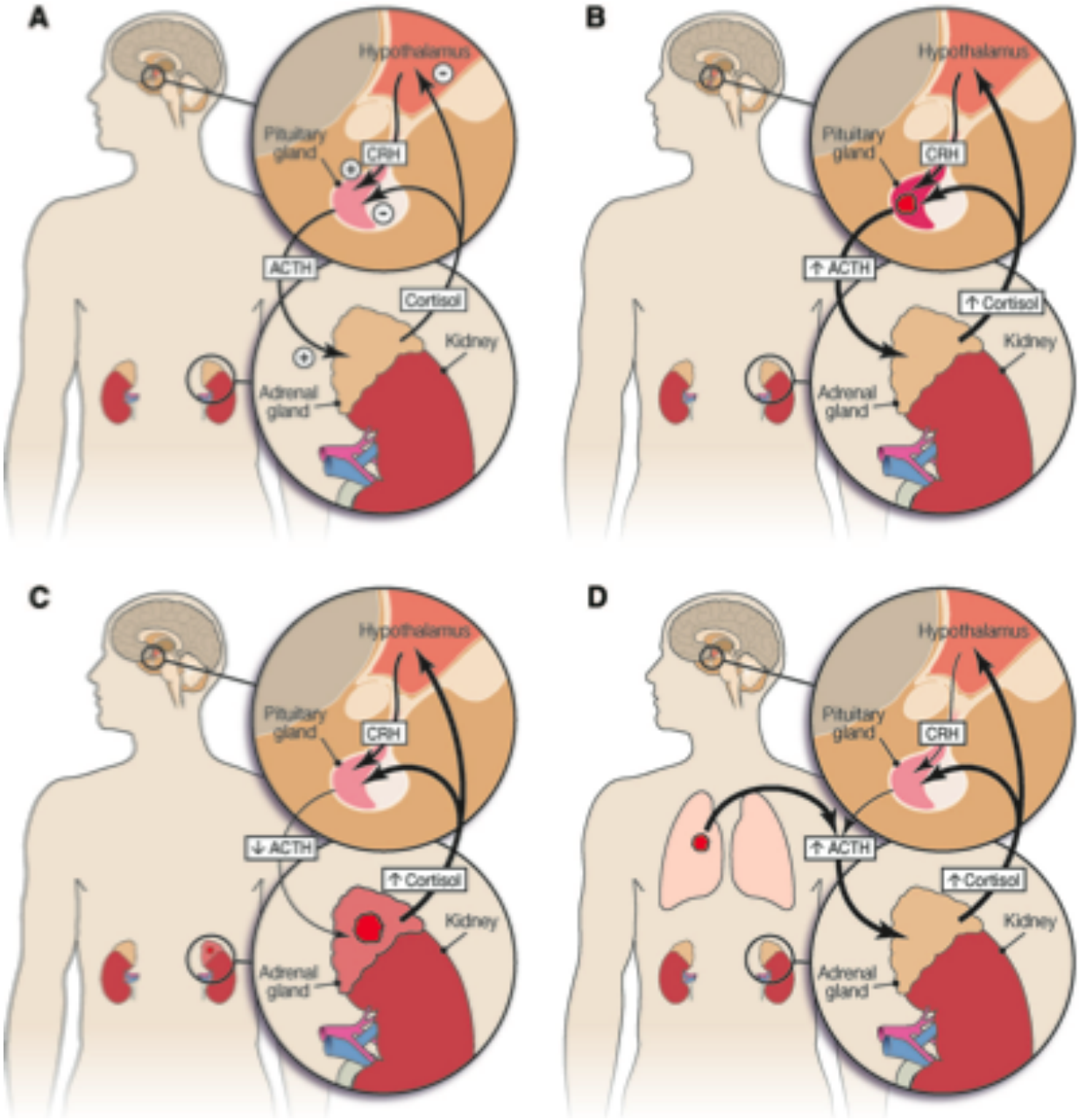


Figure 14 : Différences de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien (HHC) entre des patients présentant ou non un syndrome de Cushing

A) Axe HHC normal B) Syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH (Adreno Cortico Trophic hormone) C) Syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH D) Syndrome ACTH ectopique. CRH : corticotropin-releasing hormone. Guaraldi and Salvatori, 2012.

Il existe deux niveaux de dérégulation de l'axe HHC qui peuvent induire un syndrome de Cushing (Figure 14) :

- soit une sécrétion excessive d'ACTH : c'est la forme la plus commune du syndrome de Cushing (80-85% des cas), il est alors dit dépendant de l'ACTH ou syndrome de Cushing paranéoplasique. Cette hypersécrétion d'ACTH induit une hyperproduction de cortisol par les surrénales. Elle est majoritairement causée par un adénome hypophysaire mais elle peut également provenir d'une tumeur ectopique, sécrétrice d'ACTH.

- soit une sécrétion excessive de cortisol : ce syndrome de Cushing est alors dit indépendant de l'ACTH, il représente entre 15 et 20% des syndrome de Cushing. Il résulte alors d'une tumeur ou d'une hyperplasie bilatérale des surrénales qui sécrète du cortisol de manière excessive, ce qui cause une suppression des taux d'ACTH.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement aux causes surrénaliennes et donc au syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH.

a) Hyperplasie micronodulaire pigmentée du cortex surrénalien

Le PPNAD (Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease) est une forme rare d'hyperplasie cortico-surrénalienne micronodulaire bilatérale. Généralement, la taille de la surrénale est normale mais elle présente de nombreux petits nodules marron/jaune qui sont à l'origine d'un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH, causant une morbidité élevée. Le PPNAD est retrouvé, soit de manière sporadique soit dans un complexe de Carney, dont il est la principale manifestation endocrine (Almeida and Stratakis, 2010). Le PPNAD et le complexe de Carney sont principalement causés par des mutations inactivatrices du gène *PRKAR1A* (sous-unité régulatrice RI alpha de la PKA) qui code la sous-unité régulatrice 1α (R1α) de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). La perte d'hétérozygotie du second allèle de PRKAR1A observée dans le PPNAD suggère que PRKAR1A est un gène suppresseur de tumeurs dans le cortex surrénalien (Groussin et al., 2002). Conformément à cette hypothèse, les souris invalidées pour la sous unité R1α spécifiquement dans le cortex surrénalien, présentent une hyperplasie bilatérale, associée à un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH (Sahut-Barnola et al., 2010). L'invalidation de R1α est donc suffisante pour induire le développement d'une hyperplasie surrénalienne associée à une hypersécrétion de glucocorticoïdes. Les mutations de *PRKAR1A* sont retrouvées chez 80% des patients présentant un syndrome de Cushing dans le cadre d'un complexe de Carney (Cazabat et al., 2006). Pour les 20% restants, des mutations du gène codant la phosphodiestérase 11A (*PDE11A*) et la phosphodiestérase 8B (*PDE8*) pourraient être à l'origine du développement du PPNAD (Almeida and Stratakis, 2010).

b) Hyperplasies macronodulaires bilatérales

L'AIMAH (ACTH Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia) est une hyperplasie macronodulaire bénigne qui représente moins de 1% des cas de syndrome de Cushing (Lacroix et al., 2001). Dans ce cas, l'hypercorticisme semble plutôt causé par l'augmentation considérable du nombre de cellules que par une amélioration de la stéroidogenèse par unité cellulaire. En effet, l'expression de certaines enzymes de la voie de biosynthèse des stéroïdes diminue (Lacroix, 2009). Cette relative inefficacité de la stéroidogenèse peut expliquer que les patients atteints d'AIMAH présentent généralement un syndrome de Cushing subclinique (Lacroix, 2009). Cependant, le poids des surrénales est considérablement augmenté avec des nodules de couleur jaune associées à leur forte teneur en lipides. Si on regroupe les deux surrénales, leur poids est généralement supérieur à 60g et peut atteindre 200g par surrénale (Doppman et al., 1991). L'AIMAH a été décrite dans le contexte du syndrome de McCune-Albright qui est causé par des mutations activatrices de la protéine Gsα qui active constitutivement la voie de l'AMPc et aboutit à la sécrétion de cortisol (Mauras and Blizzard, 1986). Toutefois, il a été démontré que l'AIMAH retrouvé chez les enfants atteints d'un syndrome de McCune-Albright présente une histopathologie différente des AIMAH sporadiques caractérisée par une atrophie corticale qui donne au cortex une apparence bimorphique (Carney et al., 2011). Cette maladie cortico-surrénalienne bimorphique primaire qui vient d'être décrite deviendra surement un syndrome à part entière.

Dans les AIMAH sporadiques, de rares mutations activant constitutivement le récepteur à l'ACTH (MC2R) ont été retrouvées (Swords et al., 2004). Cependant, de manière générale, il semblerait que la synthèse anormale de cortisol soit induite par l'expression ectopique de différents récepteurs tels que le récepteur ßadrenergique, le récepteur à la vasopressine, à la sérotonine, au glucagon et probablement *AT1R* (Costa and Lacroix, 2007; Louiset et al., 2008; Assie et al., 2010). Ces récepteurs ectopiques couplés aux protéines G activent alors la stéroidogenèse en mimant les évènements intra-cellulaires déclenchés normalement par MC2R (Lacroix, 2009).

Alors que l'AIMAH a toujours été associé avec un hypercortisolisme, en 2011, le premier cas d'hyperplasie macronodulaire bilatérale de la zone réticulée a été décrit. Cette hyperplasie entraine une hyperandrogénie dont la cause diffère de celle généralement retrouvée (voir « le syndrome de virilisation ou hyperandrogénisme ») (Ghayee et al., 2011).

B. Le syndrome de virilisation ou hyperandrogénisme

L'hyperandrogénie surrénalienne résulte généralement d'une hyperplasie congénitale cortico-surrénalienne (HCA). Cette pathologie transmise selon le mode autosomique récessif est due à un défaut enzymatique dans la production du cortisol. La déficience en cortisol qui en découle empêche le rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse. L'ACTH est donc sécrétée en quantité excessive ce qui entraine une hyperplasie des cellules surrénaliennes qui lui sont sensibles et une hyperandrogénie. Cette dernière est causée par l'accumulation anormale de précurseurs stéroïdes en amont de la mutation qui seront transformés par CYP17 en DHEA ou DHEAS. Dans plus de 80% des cas, l'hyperplasie congénitale est causée par une mutation de la 21-hydroxylase (P450c21 ou CYP21A2) (Ambroziak et al., 2010). Il existe trois types de HCA dépendant de la sévérité de la déficience en 21-hydroxylase :

- HCA avec des pertes en sel classique : elle se caractérise par une perte totale de l'activité de la 21-hydroxylase, à la fois dans la zone glomérulée et fasciculée, ce qui conduit à une déficience en minéralocorticoïdes et en glucocorticoïdes
- HCA avec virilisation classique : seulement 1 à 2% de l'activité de la 21-hydroxylase est préservée. Celle-ci est suffisante pour ne pas induire de signes de déficience en aldostérone. La production de cortisol est quant à elle toujours déficiente
- HCA non classique : 20 à 50% de l'activité de la 21-hydroxylase est préservée. L'hyperplasie surrénalienne apparaît donc plus tardivement à la fin de l'enfance ou pendant la puberté et elle s'accompagne d'un excès d'androgènes modéré.

Environ 5 à 8% des cas de HCA sont dus à une déficience de la 11ß-hydroxylase (P450c11ß ou CYP11B1) (Ben Charfeddine et al., 2012). Ils peuvent également résulter d'une perte de la 3ß-hydrostéroïde déshydrogénase (3ßHSD ou 3ßHSDII), qui contrairement à CYP21 et CYP11B1, induit une perturbation de la stéroïdogenèse à la fois dans la surrénale et dans les gonades (Simard et al., 1993).

Bien que la virilisation induite par l'excès d'androgènes soit le signe clinique le plus souvent rencontré, les symptômes varient en fonction des déficits hormonaux et des propriétés biologiques des hormones intermédiaires dont la production est anormalement augmentée.

Hyperplasie idiopathique bilatérale	60% des cas
Adénome producteur d'aldostérone	35% des cas
Hyperaldostéronisme familial	<3% des cas
Hyperplasie cortico-surrénalienne unilatérale primaire	2% des cas
Carcinome cortico-surrénalien producteur d'aldostérone	<0,1% des cas
Adénome ou carcinome producteur d'aldostérone	<0,1% des cas

Figure 15 : Différents sous-types d'hyperaldostéronisme primaire

C. Le syndrome de Conn

Le syndrome de Conn, aussi appelé hyperaldostéronisme primaire (HP), est un groupe de pathologies caractérisé par une production anormale d'aldostérone, qui est au moins en partie indépendante du système angiotensine-rénine et non suppressible par une charge sodée (Funder et al., 2008). Cette hypersécrétion d'aldostérone est dite primaire puisqu'elle est causée par une anomalie surrénalienne. Alors que le Dr Conn a décrit le premier cas d'adénome surrénalien producteur d'aldostérone, en 1954, différentes causes ont maintenant été identifiées et seront décrites dans le chapitre « Causes de l'hyperaldostéronisme primaire » (Figure 15) (Fagugli and Taglioni, 2011). Toutefois, au moment du diagnostic d'un HP, il est essentiel d'identifier la cause surrénalienne pour améliorer la prise en charge et le pronostic du patient.

a) Présentation clinique et épidémiologie

Le principal symptôme qui conduit les médecins à suspecter un HP est la présence d'une hypertension artérielle secondaire (HAS) (Funder et al., 2008). En effet, une sécrétion excessive d'aldostérone induit une réabsorption du sodium et une rétention importante de l'eau qui mènent à une augmentation anormale et durable du volume sanguin, conduisant de fait à l'HAS.

Etant donné que l'élimination urinaire du potassium est induite par aldostérone, l'hypokaliémie a longtemps été considérée comme un symptôme important de l'HP. Cependant, à partir des années 1990, il a été démontré que la majorité des patients présentant un HP ont une HAS associée à une normokaliémie (Cicala and Mantero, 2010; Fagugli and Taglioni, 2011). Aujourd'hui, l'hypertension artérielle normokaliémique est la présentation la plus commune de cette pathologie alors que l'hypokaliémie retrouvée chez 9 à 37% des patients est probablement associée à des cas plus sévères (Rossi et al., 2006). Le diagnostic de l'HP qui semblait concerner approximativement 1% des patients hypertensifs a donc longtemps été trop restreint. Aujourd'hui l'HP est considéré comme la forme la plus commune d'HAS. Sa prévalence varie toutefois grandement, entre 5 et 20% en fonction de la sélection des patients et des méthodes de diagnostic qui ont beaucoup évolué ces dernières années (Fagugli and Taglioni, 2011). Afin d'élargir et d'homogénéiser son dépistage, la société endocrine des Etats-Unis a publié, en 2008, un guide des pratiques cliniques pour le diagnostic et le traitement des patients avec un HP. Au vu de ce guide, un HP doit être recherché chez des patients avec une hypertension modérée (stade 2) ou élevée (stade 3), une hypertension résistante aux anti-hypertenseurs, une hypokaliémie spontanée ou induite par les diurétiques, une hypertension avec un incidentalome surrénalien ou une hypertension associée à une histoire familiale d'hypertension à début précoce ou d'accident cérébro-vasculaire à un âge jeune (<40 ans) (Funder et al., 2008).

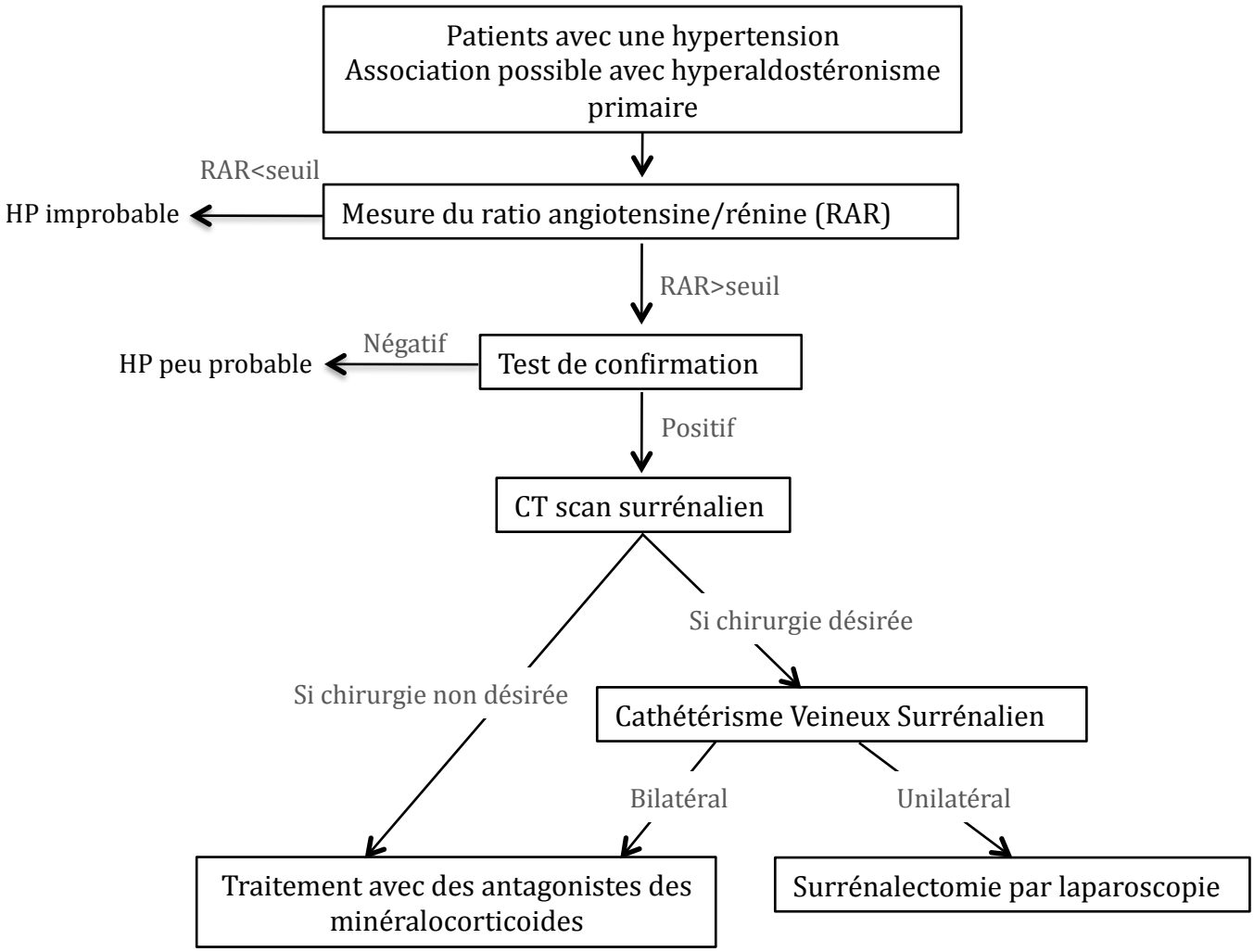


Figure 16 : Arbre décisionnel pour détecter, confirmer et soigner un hyperaldostéronisme primaire. D'après le guide des pratiques cliniques de la société américaine d'endocrinologie. D'après Funder et al., 2008.

b) *Diagnostic d'un hyperaldostéronisme primaire*

(1) Le ratio aldostérone-rénine

Comme l'augmentation du taux d'aldostérone plasmatique induit un rétro-contrôle négatif sur les taux de rénine, le premier test préconisé pour diagnostiquer un HP est le calcul du ratio de l'aldostérone plasmatique sur la rénine (ARR), qui de façon artificielle, augmente en cas de HP. Toutefois, de nombreux facteurs tels que les anti-hypertenseurs qui sont, en général prescrits aux patients, l'alimentation, la posture, la présence d'une hypokaliémie, le moment de la journée, la médication, l'âge et la fonction rénale interférent avec les taux de rénine et d'aldostérone (Cicala and Mantero, 2010). Le guide des pratiques cliniques préconise donc de stopper le traitement au moins deux semaines avant le calcul de l'ARR ou de changer de médication pour des médicaments qui ne présentent que des effets mineurs sur l'ARR (Funder et al., 2008). De plus, ce test est préférentiellement réalisé le matin sur un patient en ambulatoire. Dans ce cas, il est considéré que tous les patients avec un ARR supérieur à la valeur seuil fixée entre 20 ou 40 doivent subir des examens supplémentaires pour confirmer ou infirmer le diagnostic d'HP (Figure 16) (Cicala and Mantero, 2010).

(2) Tests de confirmation

Le guide pratique conseille différents tests de confirmation :

- la charge orale en sodium (15g par jour pendant 3 jours) ou par intra-veineuse (2 litres en 2h).
- la suppression à la fludrocortisone : la fludrocortisone est un corticoïde avec un fort pouvoir mimétique des minéralocorticoïdes.
- le test au captopril : le captopril est un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II.

Ces tests induisent une diminution de la sécrétion d'aldostérone, en interférant avec le contrôle physiologique de sa production chez des patients sans HP, alors qu'en cas d'HP, les taux d'aldostérone produits de façon autonome ne seront pas ou faiblement altérés.

(3) Identification du type d'hyperaldostéronisme primaire

Les patients dont le diagnostic d'HP a été confirmé par les tests précédents doivent subir une tomodensitométrie surrénalienne. C'est l'étape initiale dans l'identification de la cause de l'HP et cela permet d'exclure de larges masses surrénaliennes pouvant être des carcinomes cortico-surrénaliens (1% des cas). Toutefois, il est parfois difficile de différencier des petites TPA (Tumeurs Productrices d'Aldostérone), d'HBI (Hyperplasie Bilatérale Idiopathique) ou de

surrénales d'apparence normale (Funder et al., 2008). De plus, la tomodensitométrie étant insuffisante pour déterminer la latéralité de cette hypersécrétion, il est recommandé de réaliser un Cathétérisme Veineux Surrénalien (CVS). Cette technique permet de prélever du sang directement au niveau des veines caves et surrénaliennes droites et gauches, ce qui après dosage, permet de déterminer s'il s'agit d'une forme uni ou bilatérale d'HP (Funder et al., 2008).

Le diagnostic des HP est nécessaire non seulement à cause de leur prévalence importante mais également à cause de leur morbidité et mortalité cardio-vasculaire. Celle-ci est en effet supérieure à celle de patients présentant une hypertension essentielle de même âge, de même sexe et avec une même élévation de la pression sanguine (Milliez et al., 2005). Cette élévation du risque de complications cardiaques dans les cas d'HP peut être causée par l'action néfaste de l'excés d'aldostérone sur le système cardio-vasculaire. En effet, l'excés chronique d'aldostérone augmente la rigidité aortique et peut être associé avec une dysfonction endothéliale et des inflammations microvasculaire (Milliez et al., 2005). L'identification de la cause de HP est également essentielle pour déterminer quelle sera la prise en charge du patient.

c) *Traitement de l'hyperaldostéronisme primaire*

(1) Exérèse chirurgicale

En cas d'adénome surrénalien unilatéral, l'exérèse chirurgicale de la surrénale à l'origine de l'HAS est préconisée. Toutefois, il faut savoir que même en cas de surrénalectomie totale, la principale difficulté après l'opération est le retour à la normale des constantes. Alors que la kaliémie est améliorée chez près de 100% des patients, la pression sanguine reste élevée pour 50% d'entre eux (Funder et al., 2008). Toutefois, même si l'HAS persiste, elle devient plus facile à maitriser par les médicaments anti-hypertenseurs. Ce maintien de l'HAS est principalement causé par la vieillesse, la présence d'une autre cause d'HAS inconnue ou une HAS chronique de longue durée avant l'exérèse. En effet, si la sécrétion excessive d'aldostérone a endommagé le système cardio-vasculaire avant l'exérèse, l'HAS ne sera pas soignée par l'absence d'HP. L'exérèse est donc un traitement efficace mais qui ne s'applique généralement pas aux patients porteurs d'hyperplasies bilatérales. Ceux-ci doivent donc suivre des traitements médicamenteux au long cours (Quinkler and Stewart, 2010).

(2) Traitement médicamenteux

Chez des patients présentant un HP, la pression sanguine est plus difficile à réguler que chez des patients avec une HA essentielle. Des inhibiteurs des minéralocorticoïdes ont donc été développés afin de bloquer les actions potentielles de l'aldostérone.

(i) Inhibiteurs des minéralocorticoïdes

Ces composés inhibent l'action de l'aldostérone en entrant en compétition avec elle pour sa liaison à ses récepteurs. Deux composés de ce type sont actuellement utilisés en clinique : la spironolactone et l'éplérénone.

La spironolactone permet une diminution de la pression sanguine systolique et diastolique respectivement de 25% et 22% à une dose de 50-400 mg/jour et une durée de traitement allant de 1 à 96 mois (Quinkler and Stewart, 2010; Helber et al., 1980; Kater et al., 1983; Lim et al., 1999). A plus faible dose (25-50 mg/jour), la spironolactone permet de diminuer la nécessité de drogues anti-hypertensives et d'obtenir une pression sanguine normale chez près de la moitié des patients traités (Lim et al., 1999). Toutefois, la spironolactone induit de nombreux effets secondaires dont le principal est la gynécomastie chez les hommes qui survient chez 6,9% des patients après 6 mois à une dose de moins de 50 mg/jour et 52% à une dose de plus de 150 mg/jour. En plus, une baisse de la libido et des dysfonctionnements érectiles ont été décrits. Chez la femme, des perturbations des menstruations et des tensions dans la poitrine sont les principaux effets secondaires mais leur incidence reste méconnue. Ces effets secondaires sont dus à l'effet inhibiteur de la spironolactone sur le récepteur aux androgènes et son action agoniste du récepteur à la progestérone (Jeunemaitre et al., 1987; Quinkler and Stewart, 2010).

A cause des effets secondaires importants de la spironolactone, un autre antagoniste plus spécifique des récepteurs aux minéralocorticoïdes, l'éplérénone a été développé (de Gasparo et al., 1987). Cependant, il a une demi-vie plus courte et inhibe le récepteur moins efficacement que la spironolactone ce qui oblige à l'administrer deux fois par jour, à une dose de départ supérieure. Une première étude encourageante montre que l'ensemble des patients a présenté une normalisation de l'hypokaliémie et que 82,4% d'entre eux présentent une normalisation de la pression sanguine (140/90mmHg) après traitement contre seulement 76,5% des patients sous spironolactone (Karagiannis et al., 2008). L'efficacité de l'éplérénone semble donc au moins similaire à celle de la spironolactone. De plus, l'éplérénone semble limiter l'apparition et le maintien des effets secondaires lourds apparus sous spironolactone. En effet, deux patients développant une gynécomastie sous spironolactone sont passés sous éplérénone en cours de test ce qui a permis de reverser la gynécomastie tout en maintenant le contrôle de leur pression artérielle (Karagiannis et al., 2008).

(ii) Inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des antagonistes du récepteur à l'angiotensine II

Des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (captopril, MK421) et du récepteur à l'angiotensine II n'ont été évalués que chez un faible nombre de patients atteints d'HP et sans mesure du devenir des patients. De manière générale, ils ont un effet anti-hypertenseur (Funder et al., 2008). Toutefois, l'utilisation de ces molécules chez des patients présentant des maladies rénales et des problèmes cardiaques entraine une diminution transitoire des taux d'aldostérone plasmatique suivie d'une augmentation dans 10 à 50% des cas en fonction des études (Bomback and Klemmer, 2007). Ce processus appelé « aldosterone breakthrough » contribue à la résistance aux traitements. Comme la spiranolactone augmente l'activité du système angiotensine/rénine, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion pourraient être utilisés en complément afin de limiter les doses de spironolactone prescrites et par conséquent les effets secondaires adverses (Quinkler and Stewart, 2010).

(iii) Blocage des canaux sodiques et calciques

Les canaux sodiques épithéliaux (ENaC = amiloride-sensitive epithelial Na channel) présents dans le néphron distal sont les principales cibles de l'aldostérone et sont surrégulés dans l'HP. Des inhibiteurs de ces canaux, en particulier l'amiloride ont été testés dans le traitement de l'HP. Ils permettent de diminuer la pression sanguine et l'hypokaliémie grâce à leur action au niveau du rein. Cependant, il n'ont aucun effet bénéfique sur les altérations endothéliales (Farquharson and Struthers, 2002).

La nifedipine, un inhibiteur des canaux calciques a également été testée sur un petit nombre de patients. Elle a permis une diminution de la pression sanguine, des taux plasmatiques d'aldostérone et une augmentation du potassium sérique (Quinkler and Stewart, 2010). De plus, il est intéressant de noter que certains antagonistes des canaux calciques du groupe des dihydropyridines, tels que la nimodipine ont une activité inhibitrice du récepteur aux minéralocorticoïdes par compétition avec l'aldostérone pour la liaison sur son récepteur (Dietz et al., 2008). La nimodipine est capable de diminuer chez le rat l'expression de gènes cibles de l'aldostérone suggérant qu'elle peut fonctionner comme antagoniste des minéralocorticoïdes *in vivo* (Dietz et al., 2008).

Bien que les inhibiteurs des canaux calciques, sodiques, de l'enzyme de conversion et du récepteur à l'angiotensine II aient des effets bénéfiques plus ou moins marqués dans le traitement de l'HP, leurs effets ont été analysés sur de petites cohortes de patients et sans évaluation du bénéfice à long terme. Par conséquent, le guide des pratiques médicales conseille

le traitement avec la spironolactone ou l'éplérénone (Funder et al., 2008). Toutefois, les inhibiteurs de l'aldostérone synthase pourraient jouer un rôle important dans le futur.

(iv) Inhibiteurs de l'aldostérone synthase : un traitement d'avenir ?

Les antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes permettent de bloquer les effets de l'aldostérone passant par l'intermédiaire de ses récepteurs. Cependant, l'aldostérone présente également des effets non génomiques qui sont en partie médiés par d'autres récepteurs, non bloqués par la spironolactone et l'éplérénone (Amar et al., 2010). Les inhibiteurs de l'aldostérone synthase représentent donc une nouvelle option thérapeutique, puisqu'en diminuant le taux d'aldostérone plasmatique, ils réduiraient à la fois les effets génomiques et non génomiques de l'aldostérone.

Le LCI699 est le premier inhibiteur de l'aldostérone synthase à avoir été développé pour des tests cliniques chez l'Homme. Un premier essai de quatre semaines a été réalisé sur des patients atteints d'une HAS causée par un HP (Amar et al., 2010). A partir de 8 jours de traitement, une dose de 0,5 mg de LCI699 réduit significativement le taux d'aldostérone plasmatique et urinaire. Très rapidement cette diminution permet une augmentation de la kaliémie et même l'arrêt du traitement substitutif au KCl après 15 jours. Par contre, la répercussion sur la pression systolique n'apparaît qu'après 29 jours et aucune modification de la pression diastolique n'est observée. Cette observation n'est pas surprenante car une diminution de la pression sanguine n'est pas obligatoirement observée même après une exérèse chirurgicale ou après des traitements aux inhibiteurs des minéralocorticoïdes. En effet, la normalisation de la pression dépend de nombreux facteurs non hormonaux comme l'âge ou le remodelage cardio-vasculaire (Quinkler and Stewart, 2010). Toutefois, dans une seconde étude, une diminution significative de la pression sanguine clinique et ambulatoire est observée après 8 semaines de traitement à 1 mg de LCI699 (Calhoun et al., 2011). Cette diminution après 1 mg de LCI699 est similaire à celle observée suite à un traitement à l'éplérénone. Ceci démontre l'efficacité du traitement du LCI699 à la fois sur l'HP et sur l'HAS qui en découle. Comme attendu, l'ensemble des effets bénéfiques du traitement est réversible puisque les taux d'aldostérone et de potassium ne sont pas maintenus une semaine après l'arrêt du traitement. Seule l'augmentation de la concentration de la 11-deoxycorticosterone qui est causée par le blocage de l'aldostérone synthase se maintient.

Toutefois, ce traitement s'accompagne d'effets secondaires potentiellement délétères. En effet, alors que le taux de cortisol n'est pas modifié tout au long de l'étude, la réponse à l'ACTH s'effondre après 30 jours de traitement, ce qui suggère un effet inhibiteur du LCI699 sur la

synthèse de cortisol (Amar et al., 2010). Cet effet a été confirmé lors de la seconde étude puisqu'il est retrouvé respectivement chez 20,8% et 21,4% des patients à une dose de 0,5 mg deux fois par jour ou de 1 mg une fois par jour (Calhoun et al., 2011). Ces études démontrent que même si l'IC50 du LCI699 est trois fois plus importante pour CYP11B1 que pour CYP11B2, un traitement de quatre semaines suffit pour agir sur CYP11B1. Cet effet réversible n'a pas de conséquence sur des traitements courts mais les conséquences de son utilisation à long terme sur des périodes de stress restent méconnues. Bien que d'une manière générale, le LCI699 soit mieux toléré par les patients que la spironolactone, il serait donc nécessaire de développer des inhibiteurs plus spécifiques afin d'éviter l'effet sur la réponse à l'ACTH. De plus, cela permettrait de déterminer si l'inhibition de l'aldostérone synthase est plus avantageuse que des agents anti-hypertenseurs en terme de tolérance et de bénéfice clinique.

Ces dernières années, les traitements médicamenteux qui concernent la majorité des patients atteints d'HAS se sont donc améliorés. Toutefois, il reste des patients pour lesquels les traitements actuels n'ont pas d'effets suffisants, que ce soit directement ou à cause de l'apparition d'effets secondaires adverses. De plus, bien que les résultats obtenus avec le LCI699 soient intéressants, la grande homologie de séquence entre CYP11B1 et CYP11B2 rend difficile le développement d'inhibiteurs spécifiques de CYP11B2. Or, les effets à long terme d'une inhibition de CYP11B1 peuvent être délétères et conduire à des effets secondaires lourds pour le patient. Il serait donc nécessaire de développer de nouveaux traitements. Une piste intéressante est l'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre les acteurs moléculaires à l'origine de l'hypersécrétion d'aldostérone. Ceci permettrait d'agir en amont de CYP11B2 en limitant sa synthèse, tout en évitant les effets sur CYP11B1. Les connaissances actuelles sur l'étiologie moléculaire de l'HP et donc les pistes thérapeutiques potentielles seront discutées dans la partie « Génétique des tumeurs productrices d'aldostérone ».

d) Causes de l'hyperaldostéronisme primaire

(1) Les hyperplasies idiopathiques bilatérales

Les hyperplasies surrénaliennes idiopathiques bilatérales sont à l'origine de la majorité des HP puisqu'elles sont retrouvées chez 60% des patients (Fagugli and Taglioni, 2011). Chez ces patients, l'hyperplasie surrénalienne implique l'ensemble de la zone glomérulée des deux surrénales. Cette forme d'HP n'est donc pas curable par exérèse chirurgicale qui peut toutefois, rétablir la pression artérielle chez certains patients (Sukor et al., 2009).

(2) Les adénomes producteurs d'aldostérone

Les adénomes producteurs d'aldostérone (APA) sont la seconde cause d'HP. La nature des cellules à l'origine de cette hypersécrétion d'aldostérone est difficile à déterminer. Même si l'ensemble des APA présente une expression de *CYP11B2* et de *Dab2* (Disabled homolog 2), deux marqueurs de la zone glomérulée, lors d'une étude sur 25 APA, il apparaît que les deux tiers des APA sont majoritairement constitués de cellules de type fasciculée (Boulkroun et al., 2010). De plus, sur la base du profil d'expression, 16 APA ont pu être classés en deux groupes :

- Un groupe qui surexprime les enzymes de la voie de stéroïdogenèse (*CYP11B2*, *CYP11A1*, *3ßHSD*, *CYP21*) et la *CaMKI*, un des régulateurs en amont de CYP11B2 (Lenzini et al., 2007). Ces cellules pourraient donc être de type glomérulée. Il a été démontré que l'augmentation d'expression de la *CaMKI* est associée avec sa localisation nucléaire et la phosphorylation de CREB, ce qui induit l'expression de *CYP11B2* en mimant l'activation du récepteur à l'angiotensine (Sackmann et al., 2011). Les altérations génétiques pouvant être à l'origine de cette activation seront discutées dans la partie « génétique des tumeurs productrices d'aldostérone ».

- Un groupe où l'expression de *CYP11B2* et des autres enzymes de la voie de stéroïdogenèse reste relativement faible et qui pourrait correspondre à des cellules de la zone fasciculée (Lenzini et al., 2007). Toutefois, malgré l'absence de surexpression de *CYP11B2*, le taux d'aldostérone plasmatique des patients est similaire à celui de l'autre groupe. Par conséquent, l'augmentation de la synthèse d'aldostérone doit être causée par l'augmentation du nombre de cellules productrices d'aldostérone

L'ensemble de ces données ne permet pas définitivement de déterminer si les cellules tumorales sont issues des cellules de la zone glomérulée ou fasciculée mais il semblerait que les deux hypothèses soient possibles.

Au delà des altérations propres au tissu tumoral, la présence d'un adénome induit de nombreux désordres dans le tissu adjacent. Dans une étude menée sur vingt-cinq APA, dix-sept présentent une hyperplasie de la zone glomérulée péri-tumorale qui peut être continue ou discontinue. Alors qu'il a longtemps été supposé qu'étant sous la suppression du système angiotensine/rénine, la zone glomérulée adjacente n'était pas fonctionnelle, elle exprime toujours *CYP11B2* et il semblerait qu'elle soit aussi capable de produire de l'aldostérone indépendamment de ses sécrétagogues naturels (Boulkroun et al., 2010). De plus, en 2010, Nishimoto et ces collaborateurs ont décrit l'existence de groupes de cellules sous-capsulaires qu'ils ont appelées APCC (Aldosterone Producing Cell Clustering) qui expriment constitutivement *CYP11B2*. Les auteurs ont alors proposé que ces cellules pouvaient être à

l'origine du développement d'un APA au travers de leur capacité de production autonome d'aldostérone (Nishimoto et al., 2010). D'autre part, le tissu adjacent présente une augmentation importante de son remodelage, observée au travers d'une plus grande formation de nodules (Boulkroun et al., 2010). L'ensemble des modifications du tissu adjacent des APA et la présence des APCC peuvent participer à l'HP. C'est pourquoi l'exérèse chirurgicale complète est préférable à l'énucléation afin de limiter le risque de récidive (Quinkler and Stewart, 2010).

e) Hyperaldostéronisme familial

Les formes familiales de l'hyperaldostéronisme primaire de type I, II et III ne représentent qu'environ 3% des cas d'HP diagnostiqués, mais peuvent apporter des informations précieuses concernant la génétique des tumeurs sporadiques.

(1) Hyperaldostéronisme familial de type I

L'hyperaldostéronisme de type I (HFI), aussi appelé aldostéronisme remédiable aux glucocorticoïdes est une forme monogénique d'hypertension héréditaire (Moraitis and Stratakis, 2011). L'HFI est hérité de manière autosomique dominante et causé par la présence d'un gène chimère issu de la recombinaison inégale entre les gènes *CYP11B1* et *CYP11B2*. Ce gène présente le promoteur et la partie 5' de la séquence du gène *CYP11B1*, induisant son expression dans l'ensemble du cortex surrénalien et la partie 3' du gène *CYP11B2* qui conduit à une synthèse inappropriée d'aldostérone mais également de deux stéroïdes rares : le 18-hydroxycortisol (18OHF) et le 18-oxocortisol (18oxoF). La présence du promoteur de CYP11B1 en amont de ce gène hybride rend son expression sensible aux sécrétagogues naturels du cortisol, dont l'ACTH. Par conséquent, l'administration de déxaméthasone, un glucocorticoïde puissant, induit un rétro-contrôle négatif sur l'ACTH, ce qui réduit la sécrétion d'aldostérone, de 18OHF et de 18oxoF. Ce test permet de distinguer l'HFI dite suppressible aux glucocorticoïdes des autres types de HP. Le diagnostic définitif peut également être réalisé grâce à l'identification du gène chimère dans l'ADN génomique des patients.

(2) Hyperaldostéronisme familial de type II

L'hyperaldostéronisme familial de type II (HFII) est héritable mais non suppressible aux glucocorticoïdes. L'HFII apparaît généralement à l'âge adulte. Hormis son côté héréditaire, la HFII est cliniquement, biologiquement et morphologiquement impossible à différencier d'un HP non familial et présente également de grandes similitudes avec une hypertension artérielle essentielle. Le diagnostic d'HFII est donc réalisé lorsqu'au moins deux ou trois membres de la

famille présentent un HP sans présence du gène hybride *CYP11B1/2*. Aucune mutation n'a été observée dans le gène de l'aldostérone synthase (*CYP11B2*) ou celui du récepteur à l'angiotensine II (*AT1R*). Toutefois, une recherche à grande échelle a mis en évidence un lien génétique avec le locus 7p22 chez la plupart des patients atteints de HFII (Lafferty et al., 2000). Bien que des gènes pouvant être impliqués dans la tumorigenèse ou dans la régulation du système angiotensine II/rénine aient été mis en évidence dans cette région, le gène causal reste à identifier (Carss et al., 2011). D'autre part, la présence de patients avec un HFII non lié à ce locus suggère que cette forme, tout comme l'HP en général, pourrait être d'origine génétique hétérogène.

(3) Hyperaldostéronisme familial de type III

Une nouvelle forme d'HP familiale appelé HFIII a été décrite en 2008 par Geller (Geller et al., 2008). Cet HF est associé avec une hypertension artérielle sévère résistante aux traitements, qui apparaît très jeune (entre 4 et 7 ans) mais qui est corrigée par l'exérèse chirurgicale bilatérale de surrénales pouvant atteindre 82g.

Tout comme HFI, cet HFIII est caractérisé par de très hauts niveaux de 18oxoF et 18OHF qui ne sont, par contre, pas remédiés par la dexaméthasone. La présence de ces deux stéroïdes rares résulte des activités concomitantes de CYP11B2 et de CYP17, ce qui coïncide avec l'hypertrophie des cellules de la fasciculée et l'atrophie de la zone glomérulée observées chez ces patients. Dans un premier temps, les causes génétiques de cet HP sont restées inconnues, aucune mutation des gènes *CYP11B2*, *AT1R*, *MC2R*, *DAX1* (Dosage sensitive adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1), *SF1* (Steroidogenic Factor-1), *NURR1* et *NUR77* n'ayant été identifiée. Toutefois, en 2011, des mutations affectant le gène *KCNJ5* qui code un canal potassique ont été décrites spécifiquement chez les patients atteints d'HFIII et dans certains cas sporadiques de HP (Charmandari et al., 2012; Choi et al., 2011; Mulatero et al., 2012; Scholl et al., 2012). Le rôle fonctionnel de ces mutations sera décrit dans la « Génétique des tumeurs productrices d'aldostérone ». Toutefois, il est intéressant de noter qu'alors que la première famille décrite avec une mutation *KCNJ5* présente un HP sévère, une autre famille pour laquelle Mulatero a identifié une nouvelle mutation possède un phénotype plus modéré avec des surrénales qui apparaissent normales au CT (Computed Tomography) scan. Pourtant, les deux mutations induisent les mêmes conséquences physiologiques sur la production d'aldostérone *in vitro* (Mulatero et al., 2012). Les HFIII causés par des mutations héréditaires de *KCNJ5* ont donc des phénotypes variables. Il reste maintenant à déterminer si cette différence est due à la mutation elle-même ou si elle dépend de facteurs encore méconnus.

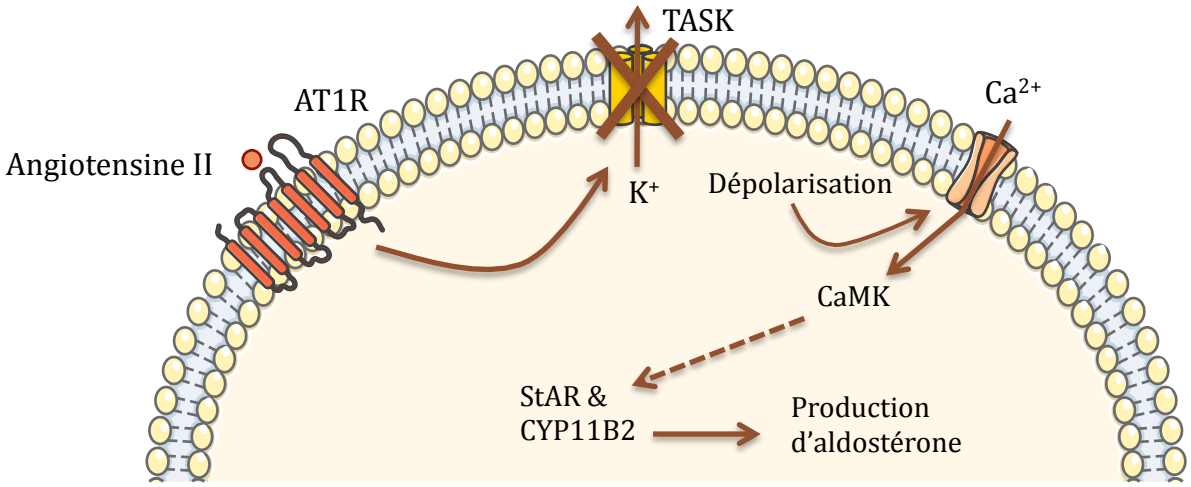


Figure 17 : Modèle de l'implication des canaux TASK (TWIK-related acid sensitive K+) dans la production incontrôlée d'aldostérone.

Les canaux TASK sont impliqués dans le maintien du potentiel de membrane à l'état de repos. Par conséquent, leur inhibition par l'activation d'AT1R ou par leur invalidation génique rend difficile la régulation de ce potentiel. La membrane est alors dépolarisée ce qui induit l'ouverture des canaux calciques de type (Transient) T et (Long-lasting) L. La concentration de calcium cytoplasmique augmente, le calcium se lie alors aux calmodulines et active les protéines kinases dépendantes des calmodulines (CaMK). Les CaMK induit alors la synthèse d'aldostérone en stimulant l'expression de StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) et de CYP11B2 (Aldostérone synthase) selon un processus similaire à celui qui est mobilisé par un de ses sécrétagogues naturels. D'après Nogueira et al., 2010.

f) Génétique des tumeurs productrices d'aldostérone

Les taux de morbidité et de mortalité étant plus élevés en cas d'hyperaldostéronisme primaire que pour une hypertension artérielle essentielle, des efforts conséquents ont été consentis pour comprendre la physiopathologie de cette maladie. Dans ce chapitre, les dernières avancées dans l'identification des altérations à l'origine de la production incontrôlée d'aldostérone et de la prolifération des cellules de la zone glomérulée vont être détaillées.

(1) Canaux potassiques

Comme il a été décrit précédemment, le contrôle de la polarité membranaire par les canaux potassiques est important pour la régulation de la biosynthèse d'aldostérone. C'est pourquoi, le passage anormal du K+ au travers de la membrane plasmique grâce à ses canaux est impliqué dans le développement d'HP. Il existe deux classes de canaux potassiques dont la dérégulation a été associée à l'HP :

- les canaux TASK qui sont peu ou pas voltage dépendants
- les canaux Kir qui sont voltage dépendants

(i) Les canaux TASK

Le rôle des canaux TASK a été mis en évidence par la caractérisation de souris transgéniques invalidées. Ces canaux TWISK-related acid sensitive K (TASK) sont des membres de la famille KCNK à 4 domaines transmembranaires et 2 pores. Deux sous-unités du canal sont exprimées dans la surrénale, TASK1 et TASK3 qui forment un canal homo ou hétérodimérique. Ces canaux ont pour rôle de maintenir la membrane des cellules de la zone glomérulée au potentiel de repos et sont donc des régulateurs négatifs de la synthèse d'aldostérone (Carey, 2012). En effet, il a été démontré dans les cellules H295R que la répression de *TASK1* par des ARN interférants se traduit par une augmentation de la concentration de calcium intra-cellulaire, probablement causée par une dépolarisation de la membrane (Figure 17). A son tour, le calcium intra-cellulaire active la signalisation des CaMK induisant l'expression de *StAR* et de *CYP11B2*, aboutissant à une production d'aldostérone accrue (Nogueira et al., 2010). Comme attendu au vu des résultats *in vitro*, la délétion des deux sous-unités *TASK1* et *TASK3* chez la souris aboutit à une dépolarisation (-20mV) de la membrane des cellules de la zone glomérulée. De plus, ces souris présentent l'ensemble des caractéristiques d'HP puisqu'elles ont une hypertension, une augmentation de la sécrétion d'aldostérone et une diminution du taux de rénine plasmatique. Tout comme chez l'Homme, leur sécrétion d'aldostérone n'est rétablie ni par une suppression en sodium, ni par des inhibiteurs d'AT1R (Davies et al., 2008). Ces souris reproduisent donc l'ensemble des caractéristiques cliniques d'un HP humain. Le phénotype des

souris uniquement invalidées pour *TASK3* est très similaire à celui des souris doublement invalidées puisqu'elles ont également une hypertension sensible au sodium, une surproduction d'aldostérone moyenne associée à une diminution de la rénine et une résistance à une suppression au sodium (Guagliardo et al., 2012; Penton et al., 2012). Seule la dépolarisation de la membrane n'est pas retrouvée chez les souris invalidées pour *TASK3*. Ceci pourrait être expliqué par un phénomène de compensation par TASK1.

De manière surprenante, le phénotype des souris invalidées pour *TASK1* est très différent puisqu'elles présentent une hypertension artérielle et une hypersécrétion d'aldostérone mais qui est cette fois, remédiable par les glucocorticoïdes (Heitzmann et al., 2008). La délétion de *TASK1* est donc à l'origine d'un phénotype proche de celui de l'HP de type HFI même si les causes génétiques sont différentes. La suppression à la dexaméthasone observée chez ces souris démontre que la sécrétion d'aldostérone est contrôlée par l'ACTH ce qui est en accord avec l'augmentation de l'expression de l'aldostérone synthase, observée dans la zone fasciculée (Heitzmann et al., 2008).

Quoi qu'il en soit, l'apparition d'un HP dans les souris invalidées pour les gènes TASK1 et/ou TASK3 suggère que des altérations des gènes *TASK* pourraient être à l'origine du développement d'HP chez l'Homme. Cependant, une analyse de transcriptome réalisée sur 14 APA ne montre pas de différences dans l'expression de *TASK1* et *TASK3* par rapport à des surrénales contrôles (Nogueira et al., 2010). Bien que l'analyse d'une plus grande cohorte soit nécessaire, ces données suggèrent que la transcription des gènes *TASK* n'est pas modifiée dans les APA humains. Toutefois, au delà de leur expression, la dérégulation des TASK pourrait être plutôt fonctionnelle. Il serait donc intéressant de séquencer les gènes *TASK* afin d'évaluer la présence de mutations ponctuelles dans le contexte des APA.

(ii) Les canaux Kir

En 2011, Choi et ces collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois deux mutations somatiques du gène *KCNJ5* chez 8 des 22 patients atteints d'un syndrome de Conn et une mutation germinale dans une famille atteinte d'HFIII. KCNJ5 semble avoir un rôle privilégié dans les APA puisqu'aucune mutation n'a été identifiée dans les autres membres de cette famille de canaux K+ (KCNK2, KCNK3, KCNK9) (Choi et al., 2011). Ces observations issues d'une petite cohorte de tumeurs ont ensuite été confirmées par l'analyse d'une large cohorte de 380 APA. Cette analyse a mis en évidence une prévalence de 34% (129/380) des mutations de *KCNJ5* dans les tumeurs sporadiques. Elle a également confirmé la prévalence accrue des mutations chez les femmes (49% versus 19% chez les hommes) et l'association avec un phénotype plus sévère et précoce (Boulkroun et al., 2012) .

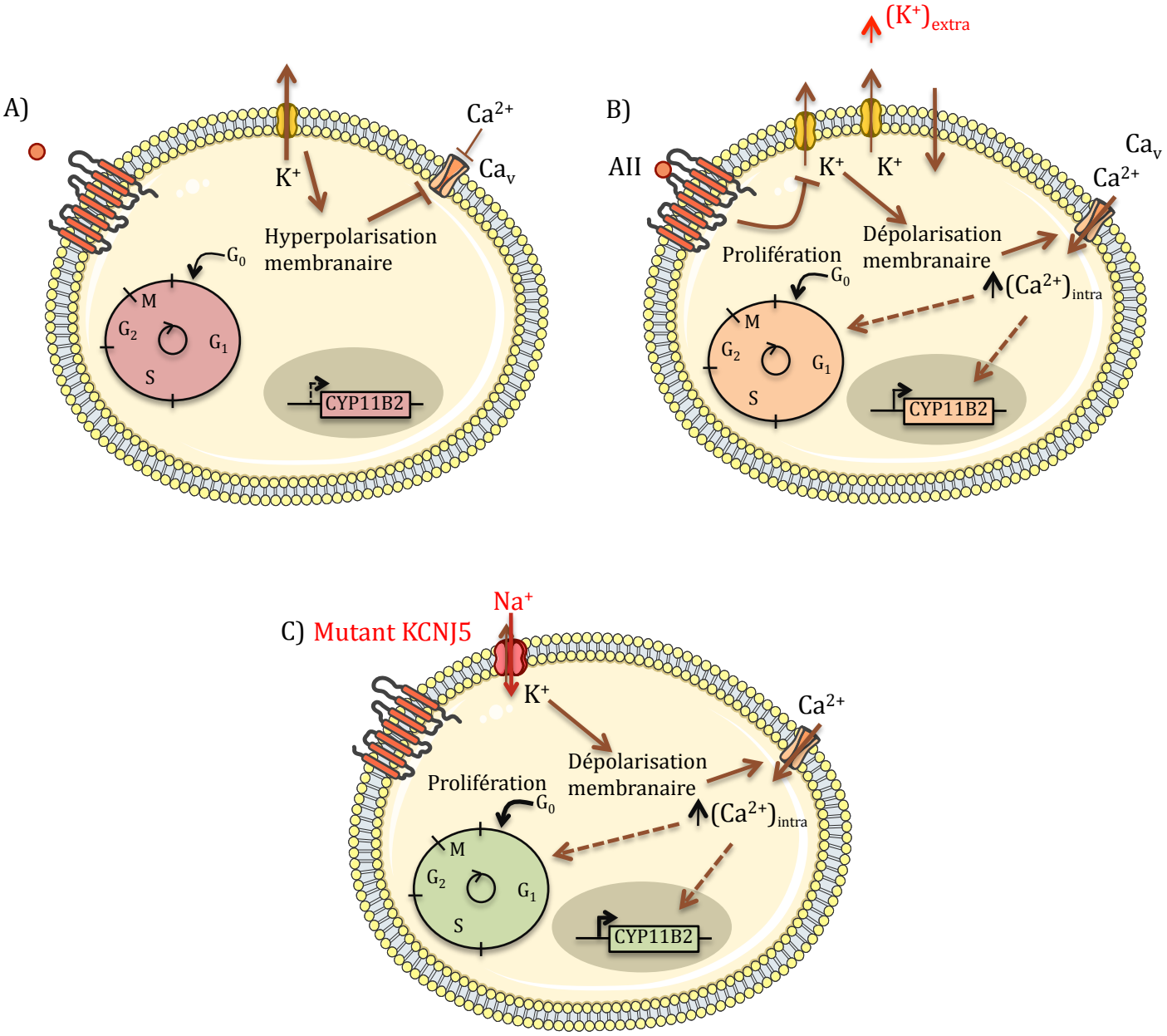


Figure 18 : Modèle du rôle des mutations de KCNJ5 dans l'apparition d'un hyperaldostéronisme primaire.
A) En absence de sécrétatogues, la polarité de la membrane des cellules de la zone glomérulée est maintenue au repos grâce à une conductance importante du potassium (K+). B) Quand la concentration extracellulaire de K+ augmente, ou que les canaux K+ sont inhibés par l'angiotensine II, cela entraine une dépolarisation de la membrane et l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. Par conséquent, la concentration en calcium cytoplasmique augmente; c'est le signal nécessaire pour l'augmentation de l'expression des enzymes de la voie de stéroidogenèse requises pour la synthèse d'aldostérone comme l'aldostérone synthase. Ceci pourrait également augmenter la prolifération. C) Les canaux KCNJ5 présentant une mutation (G151R, G151E, T158A, L168R, I157S, I157del) ont perdu leur sélectivité pour le potassium et laissent entrer du sodium ce qui dépolarise la membrane et induit une production d'aldostérone constitutive. Ces mutations pourraient également favoriser la prolifération cellulaire. Adaptée de Choi et al., 2011.

Le gène *KCNJ5* exprimé plus fortement dans la zone glomérulée (Monticone et al., 2012), code un canal potassique à rectification retardée, Kir3.4. Les mutations du gène *KCNJ5* initialement identifiées sont des substitutions hétérozygotes, G151R, L168R qui sont retrouvées respectivement dans 2 et 6 des 22 APA somatiques séquencés et la T158A qui est présente chez les 3 membres de la famille atteinte d'HFIII étudiée (Choi et al., 2011). Récemment, deux autres substitutions I157del et I157S induisant un phénotype similaire ont également été identifiées respectivement dans 1 des 73 APA sporadiques et chez deux membres d'une famille présentant un HFIII (Azizan et al., 2012b; Charmandari et al., 2012). L'ensemble des mutations identifiées, à ce jour, se situe dans (G151R, G151A) ou à proximité (L168R, T158A, I157del, I157S) du motif GYG qui est le motif de sélectivité des canaux K+ (Choi et al., 2011; Azizan et al., 2012b; Boulkroun et al., 2012; Charmandari et al., 2012; Monticone et al., 2012; Xekouki et al., 2012). Les analyses *in vitro* ont permis de montrer que ces mutations induisent une perte de la sélectivité de ces canaux pour le potassium. Lorsqu'ils sont mutés, ils laissent donc entrer le sodium ce qui dépolarise la membrane et provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation de la concentration de calcium intra-cellulaire active alors en cascade, l'expression des gènes de la synthèse d'aldostérone (Figure 18) (Choi et al., 2011; Monticone et al., 2012; Murthy et al., 2012).

L'apparition précoce du syndrome de Conn chez les patients portant des mutations *KCNJ5* (Choi et al., 2011; Boulkroun et al., 2012) suggère que celles-ci pourraient à elles seules être responsables du développement rapide de la pathologie. Conformément à cette hypothèse, les mutations de *KCNJ5* sont associées avec un groupe d'APA qui présente peu ou pas de pertes d'hétérozygoties (LOH), ce qui suggère que peu d'altérations se sont accumulées dans ces tumeurs (Choi et al., 2011). L'analyse du transcriptome de 24 APA (15 mutés et 9 sauvages) a mis en évidence une augmentation plus nette de l'expression de CYP11B2 dans les APA mutés pour *KCNJ5* que dans les APA sans mutation. Cette augmentation d'expression de CYP11B2 est également associée à la dérégulation de 24 autres gènes spécifiques des APA mutants (Monticone et al., 2012), et à un phénotype cellulaire plus proche de la zone fasciculée, caractérisé par la surexpression de CYP17 (Azizan et al., 2012a). Cette dernière observation est en accord avec l'accumulation de 18oxoHF et de 18OHF caractéristique des APA mutants pour *KCNJ5* et dont la production requiert l'expression de CYP17 (Choi et al., 2011). Globalement, ces données suggèrent que la mutation de *KCNJ5* est associée au développement d'un sous groupe spécifique d'APA, de phénotype plutôt fasciculé. Toutefois, l'analyse du transcriptome d'une large cohorte d'APA n'a pas permis de séparer les APA mutants des APA sauvages par un clustering non supervisé (Boulkroun et al., 2012). Le rôle des mutations du gène *KCNJ5* dans l'initiation de la pathologie et l'établissement d'un phénotype spécifique reste donc à déterminer.

TPA analysés	Mutations KCNJ5	% de mutations KCNJ5	G151R	G151E	L168R	I157del	I157S	T158A	Références
22 TPA sporadiques + 1 famille HFIII	8 sporadiques	33%	2 (9%)	-	6 (29%)	-	-	3 membres de la famille	Choi et al., 2011
46	20	44%	11 (24%)	-	8 (17%)	1 (2%)	-	-	Azizan et al., 2012a
73	30	41%	19 (26%)	-	10 (14%)	1 (1,3%)	-	-	Azizan et al., 2012b
380	129	34%	76 (20%)	-	53 (14%)	-	-	-	Boulkroun et al., 2012
1 famille HFIII	2	-	-	-	-	-	2	-	Charmandari et al., 2012
47	18	38%	8 (17%)	-	10 (21%)	-	-	-	Monticone et al., 2012
46 patients de 21 familles HFIII	5	-	1	2	1	-	-	1	Mulatero et al., 2012
16	2	12%	2 (12%)	-	-	-	-	-	Xekouki et al., 2012
10 individus de 4 familles HFIII	9 dont 1 non fourni	-	4	5	-	-	-	-	Scholl et al., 2012

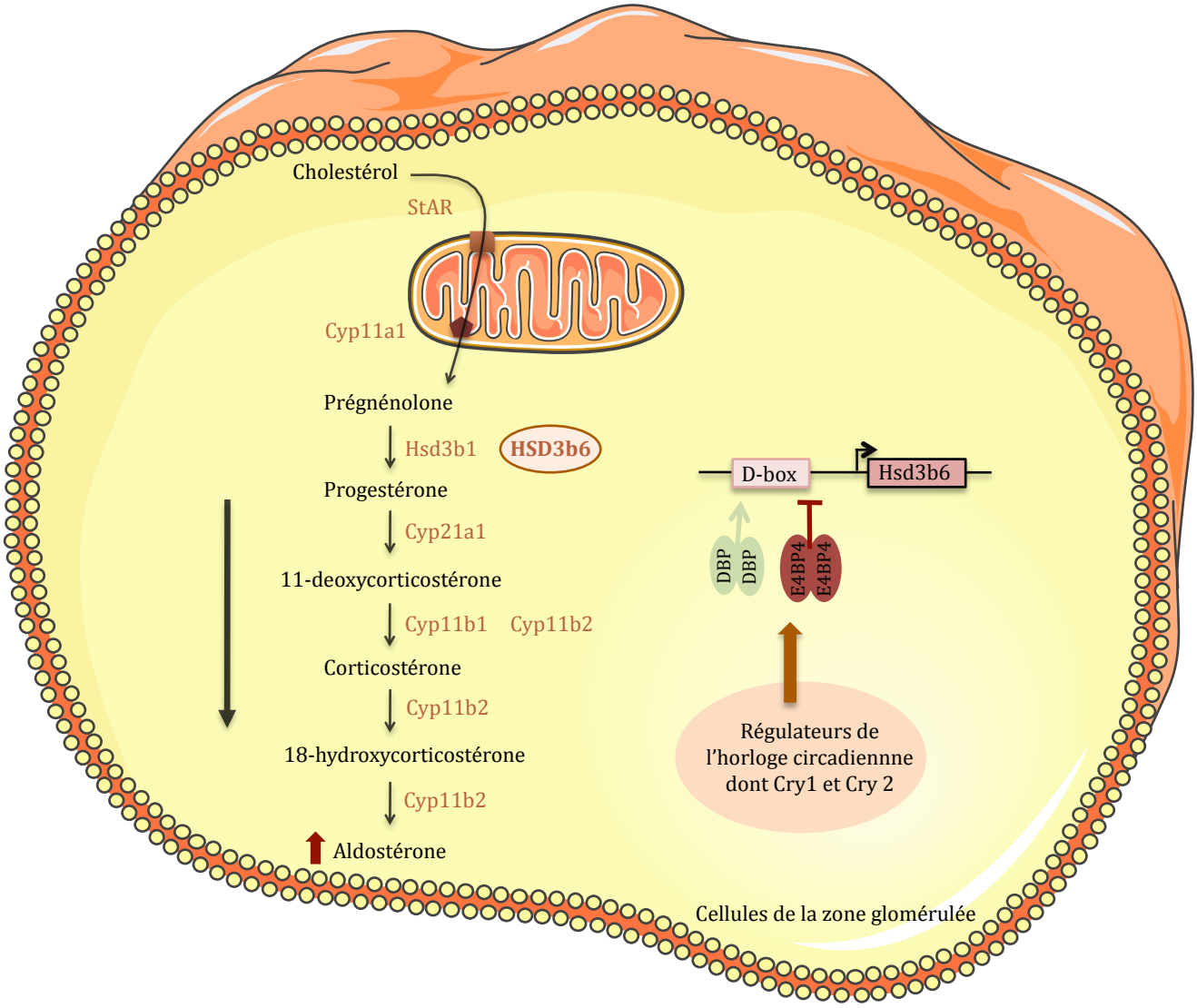
Figure 19 : Tableau récapitulatif des mutations de KCNJ5 retrouvées dans les APA sporadiques ou héréditaires de type HFIII
G151R/E : substitution de la glycine (G) en position 151 par arginine (R)/acide glutamique (E), L168R : substitution de la leucine (L) en position 168 par une arginine (R), I157del : délétion de l'isoleucine (I) en position 157, I157S : substitution de l'isoleucine (I) en position 157 par une sérine (S), T158A : substitution de la thréonine (T) en position 158 par une alanine (A).

Une autre question émergeant de ces analyses est le rôle potentiel des mutations dans le gène *KCNJ5* dans l'augmentation de la prolifération des cellules responsables du développement de l'APA. Les données concernant la taille des tumeurs mutantes par rapport aux tumeurs sauvages divergent en fonction des études : Choi et al., rapportent une taille inférieure des tumeurs mutantes (Choi et al., 2011), Boulkroun et al., ne mettent pas en évidence de différence significative (Boulkroun et al., 2012), alors que Azizan et al., rapportent une augmentation de la taille des tumeurs mutantes (Azizan et al., 2012b). Ces divergences pourraient s'expliquer par des biais de recrutement en fonction des centres cliniques. Une autre hypothèse intéressante tient à la nature même des mutations de *KCNJ5*, dont la distribution varie en fonction des études (Choi 2 x G151R et 6 x L168R ; Boulkroun 76 x G151R et 53 x L168R) (Figure 19). Alors que l'idée initiale était que l'augmentation de flux calciques induite par la perte de sélectivité du canal Kir3.4 pouvait stimuler la prolifération (Choi et al., 2011), une étude récente a mis en évidence un effet inhibiteur de la prolifération d'une nouvelle mutation de *KCNJ5*, G151E, et dans une moindre mesure de la mutation G151R. L'effet toxique de ces mutations résulte de l'entrée massive de sodium et peut être réversé quand les cellules sont cultivées dans un milieu déplété en sodium (Scholl et al., 2012). Conformément à ces analyses *in vitro*, les patients porteurs de la mutation G151E ont une évolution moins péjorative de la pathologie et répondent bien à la spironolactone alors que pour les autres patients, l'hyperaldostéronisme est difficilement contrôlable et progresse avec le temps (Scholl et al., 2012).

En conclusion, les mutations de *KCNJ5* sont vraisemblablement impliquées dans l'établissement de l'hyperaldostéronisme primaire et de caractéristiques tumorales particulières. Le rôle de chacune des mutations sur le contrôle de la prolifération reste toutefois à établir. Enfin, l'étude conduite sur la plus large cohorte d'APA disponibles (380 patients) a mis en évidence une prévalence de mutations de 34% (Boulkroun et al., 2012), indiquant qu'une vaste majorité d'APA se développe dans un contexte génétique différent, restant à définir.

(2) L'horloge circadienne

L'horloge circadienne est une horloge interne qui permet aux organismes d'anticiper les changements environnementaux et de s'adapter aux différents moments de la journée. Elle présente de nombreuses fonctions physiologiques et contrôle jusqu'à 10% des gènes du transcriptome (Panda et al., 2002). Des études épidémiologiques ont démontré que le dérèglement de cette horloge chez les travailleurs de nuit est associé avec une augmentation de la prévalence moyenne des maladies cardio-vasculaires telles que l'hypertension (Furlan et al., 2000; Scheer et al., 2009). La caractérisation de souris invalidées pour deux gènes essentiels de l'horloge, les gènes *Cry 1* et *Cry 2* (Cryptochrome) a permis de démontrer que le phénotype



<u>Figure 20</u> : Modèle du rôle de l'horloge circadienne dans l'apparition d'un hyperaldostéronisme primaire chez les souris Cry1-/- et Cry2-/-.

Représentation schématique du contrôle de la voie de synthèse d'aldostérone par les gènes cryptochrome 1 et 2 (Cry1, Cry2). Le promoteur hsd3b6 porte deux éléments en cis de type D box qui sont activés par la liaison de DBP et réprimés par E4BP4. La perte des gènes Cry induit une augmentation constitutive de DBP alors que E4BP4 reste modestement exprimé. L'augmentation de DBP induit donc une augmentation de l'expression des gènes qu'il contrôle, dont hsd3b6. Par conséquent, l'augmentation de l'expression de hsd3b6 favorise la synthèse de progestérone dans les cellules de la zone glomérulée et donc la synthèse d'aldostérone.

d'hypertension découle d'un hyperaldostéronisme primaire (Doi et al., 2010). En effet, l'invalidation de ces deux gènes chez la souris conduit à une augmentation de la sécrétion d'aldostérone qui est causée par la surexpression d'une des isoformes de la famille hsd3b spécifique de la zone glomérulée, à savoir le gène *hsd3b6*. L'expression de hsd3b6 est régulée par Dbp (D binding protein) un autre composant de l'horloge circadienne, contrôlé négativement par les gènes *Cry*. Par conséquent, le modèle proposé est que l'absence des gènes *Cry* lève la répression sur Dbp dont l'expression augmente et qui à son tour, active la transcription de *hsd3b6*, résultant en un hyperaldostéronisme primaire (Figure 20). Ce modèle est confirmé par la diminution de la production d'aldostérone observée suite à l'inhibition de l'activité de la famille hsd3b par un composé pharmaceutique, le trilostane, chez ces souris. Ces résultats démontrent l'importance de la surexpression d'*hsd3b6* dans l'apparition de l'HP et l'HA qui lui est associée. Chez l'homme comme chez la souris, *HSD3B1*, une autre isoforme de hsd3b est spécifiquement exprimée dans la zone glomérulée (Doi et al., 2010). Cette observation est intéressante d'un point de vue thérapeutique puisque le développement d'un inhibiteur spécifique de cette isoforme permettrait de contrôler l'HP sans modifier la synthèse des autres hormones surrénaliennes. Il reste maintenant à déterminer le rôle potentiel de HSD3B1 dans le développement de l'HP chez les patients.

(3) Voie Hedgehog

Les ligands de la famille Hedgehog (Shh, Dhh et Ihh) sont des protéines sécrétées agissant au travers du récepteur Patched pour contrôler de nombreux processus cellulaires impliqués dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes (Gupta et al., 2010). La voie hedgehog est dérégulée dans de nombreuses pathologies tumorales (Gupta et al., 2010). Des travaux récents ont mis en évidence le rôle essentiel du ligand Shh dans le renouvellement cellulaire du cortex en permettant le recrutement et la différenciation de cellules progénitrices indifférenciées (King et al., 2009). Chez la souris, Shh est exprimé par des cellules localisées à proximité de la zone glomérulée mais qui n'expriment ni *Cyp11b1* ni *Cyp11b2* (King et al., 2009). Dans le cortex surrénalien humain, comme chez la souris, l'expression de *Shh* est restreinte à quelques cellules de la partie extérieure de la zone glomérulée. Shh est également exprimé dans les APA, soit de manière homogène (4/14) soit de manière hétérogène (10/14) dans les nodules. Cette surexpression est corrélée à une signature génique spécifique pouvant témoigner de l'activation de la voie Hedgehog dans les APA par rapport aux surrénales normales (Boulkroun et al., 2011). Shh étant impliqué dans le développement de certaines tumeurs (Gupta et al., 2010), nous pouvons supposer que l'expression de *Shh* dans les APA puisse être un évenement initiateur de la tumorigenèse ou y participer au travers du micro-environnement. En effet, l'expression de *Shh* est fortement

augmentée dans la zone glomérulée hyperplasique péri-tumorale (Boulkroun et al., 2011). Cette surexpression de *Shh* pourrait favoriser le recrutement de cellules progénitrices et leur engagement aberrant vers la différenciation glomérulée, permettant de fait l'émergence d'un APA.

(4) Voie Wnt/ßcaténine

Dans le cortex surrénalien normal, l'activation de la voie Wnt/ßcaténine est restreinte à la zone glomérulée (Kim et al., 2008; Berthon et al., 2012). Même si l'ensemble des ligands impliqués dans l'activation de la voie dans la surrénale n'a pas été identifié, Wnt4 semble jouer un rôle essentiel pour l'établissement de la zone glomérulée. En effet, les souris invalidées pour *Wnt 4* présentent des défauts de différenciation de celle-ci, caractérisés par une réduction de l'expression des deux marqueurs *Cyp11b2* et *Pref-1* et une diminution de la sécrétion d'aldostérone (Heikkila, 2002). A l'inverse, la surexpression de *Wnt4* est retrouvée chez des patients atteints d'un HP (Kuulasmaa et al., 2008). Ces résultats suggèrent donc que la voie Wnt/ßcaténine peut contrôler, par des mécanismes qui restent méconnus, la synthèse d'aldostérone. En accord avec cette hypothèse, la surexpression de *Wnt4* dans des cellules cortico-surrénaliennes humaines induit l'expression de *CYP11B2* et la sécrétion d'aldostérone (Chen and Hornsby, 2006). De la même manière, des souris transgéniques présentant une activation constitutive de cette voie résultant d'une mutation hétérozygote de *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) présentent un hyperaldostéronisme (Just, 2009). Cette mutation étant d'origine germinale, il est impossible de conclure sur le caractère primaire de cet hyperaldostéronisme. Toutefois, l'absence d'une hypovolémie sanguine ou d'une hyperkaliémie (Just, 2009) suggère que le phénotype pourrait être d'origine surrénalienne. Conformément à cette hypothèse, deux cas d'HP ont été décrits chez des patients porteurs de mutations germinales de APC (Alexander et al., 2000; Pinés Corrales et al., 2006). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la voie Wnt/ßcaténine peut être impliquée dans le développement des APA. Toutefois, il ne peut être exclu que la surexpression de *Wnt4* et l'activation de la voie Wnt/ßcaténine observées chez des patients atteints d'HP soit uniquement le résultat de l'enrichissement en cellules de type glomérulée qui expriment naturellement *Wnt4* et la ßcaténine. Il est donc nécessaire de comprendre le rôle potentiel de la voie Wnt/ßcaténine dans le développement de l'hyperaldostéronisme primaire.

Conclusions

A ce jour, la présence de mutations du gène *KCNJ5* qui code Kir3.4 est clairement établie dans 34% des APA humain. Toutefois, il reste toujours à déterminer les causes génétiques de

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

Figure 21 : Classification de Mac Farlane

Critères	Scores (Somme des critéres de malignité présents)	Interprétation
Grade nucléaire (positif pour les grades III et IV) - Grade III : noyaux au contour irréguliers, diamètre de 20µm, nucléole apparent - Grade IV : aspect proche du grade III mais noyaux polylobés, chromatine hypercondensée	0	Tumeur bénigne
Nombreuses mitoses (> 5 pour 50 champs à fort grossissement)	2-3	Tumeur suspecte
Mitoses anormales	4-9	Tumeur maligne
Nécrose tumorale		
Architecture diffuse		
< 25% de cellules claires		
Franchissement capsulaire		
Invasion sinusoïdale		
Invasion veineuse		

Figure 22 : Critères histologiques définissant le score de Weiss

66% des APA sporadiques humains. La présence d'un HP dans les modèles de souris transgéniques invalidées pour les canaux potassiques TASK1/TASK3 ou pour les gènes *Cry* de l'horloge circadienne fait d'eux des candidats intéressants à analyser dans les APA humain. D'autre part, des données bibliographiques suggèrent que les voies Shh et Wnt/ßcaténine pourraient également être impliquées dans le développement des APA. De nombreuses études doivent donc encore être menées afin d'élucider les causes génétiques de l'ensemble des APA humains.

2. Lésions malignes

Les Carcinomes Cortico-Surrénaliens (CCS) sont des tumeurs épithéliales volumineuses rares avec une incidence estimée entre 0,5 et 2 nouveaux cas par an et par millions chez l'adulte (Wajchenberg et al., 2000). Ils représentent 0,02 à 0,4% des morts par cancer et surviennent le plus souvent entre 50 et 70 ans. Toutefois, ils présentent aussi un pic dans l'enfance où les carcinomes représentent 6% des tumeurs cortico-surrénaliennes de l'enfant (Latronico and Chrousos, 1997).

Le CCS est une pathologie grave, associée à un mauvais pronostic avec un taux de survie à 5 ans qui est compris entre 16 et 38% et qui diminue à 10% en présence de métastases (Stade IV) qui sont très fréquentes (Gicquel et al., 1997a; Luconi and Mannelli, 2012). Quarante pourcents de ces tumeurs sont non sécrétrices et seront alors diagnostiquées accidentellement ou pendant un examen pour douleur abdominale (Gicquel et al., 1997a). C'est pourquoi au moment du diagnostic, la taille moyenne des tumeurs est déjà de 10 cm avec des preuves de métastases chez 30 à 40% des patients.

A. Diagnostic

La distinction entre les ACS et les CCS, bien que difficile, est réalisée grâce à une étude histopathologique. La classification de Mc Farlane basée sur la taille et l'extension de la tumeur (Macfarlane, 1958) permet dans un premier temps de distinguer les tumeurs localisées, de celles présentant des métastases qui sont des CCS (Figure 21).

Le diagnostic du statut bénin ou malin des tumeurs localisées est ensuite déterminé grâce au score de Weiss, basé sur neuf critères histopathologiques micro ou macroscopiques (Figure 22). La présence de ces caractéristiques permet de calculer le score de Weiss, qui définit un carcinome, lorsqu'au moins trois critères sont présents. Toutefois, une ambiguïté subsiste pour les tumeurs qui obtiennent un score de Weiss de 2 ou 3. Ainsi, des tumeurs considérées

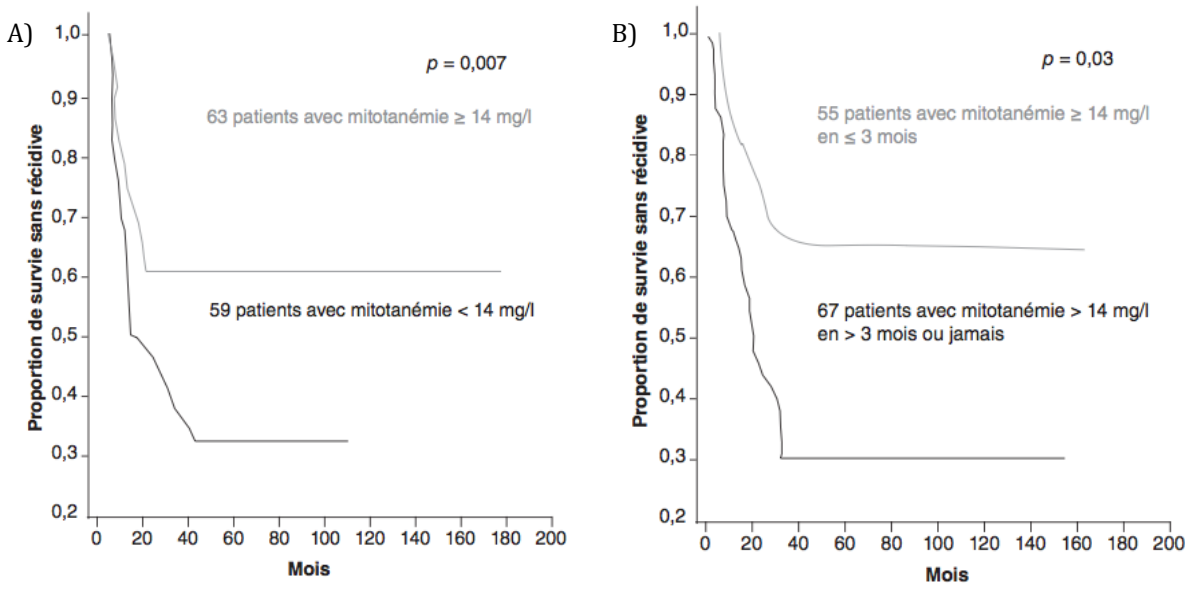
comme bénignes selon les critères de Weiss (2) peuvent dans certains cas, récidiver (Tissier, 2010).

De nouvelles approches telles que l'identification de marqueurs immunohistochimiques ont donc été mise au point ces dernières années pour aider au diagnostic de la malignité et à l'identification des tumeurs de mauvais pronostic (Tissier, 2010). Le calcul de l'index de prolifération, basé sur la détection de la protéine Ki67, est maintenant couramment utilisé puisqu'un index supérieur à 5% définit systématiquement un CCS même si tous les CCS n'ont pas une prolifération aussi élevée. Au delà de ce rôle diagnostic, cet index est également un facteur pronostic. Lorsqu'il est supérieur à 7%, il est associé à une diminution de la survie sans récidive (Morimoto et al., 2008). Toutefois, bien que cet index de prolifération permette de discriminer une partie des CCS, il ne permet pas de tous les identifier. Des études approfondies sont donc nécessaires pour mieux caractériser les CCS et identifier de nouveaux marqueurs immuno-histochimiques qui permettront de diagnostiquer la malignité.

B. Traitements des carcinomes cortico-surrénaliens

A ce jour, l'exérèse complète est le seul traitement curatif des CCS localisés. En effet, l'analyse de 283 patients a démontré que la survie globale et la survie sans récidive sont améliorées chez les 47 patients qui ont subi une exérèse complète associée avec un curetage ganglionnaire (Reibetanz et al., 2012).

Un traitement utilisant le dérivé d'un insecticide (DTT), le mitotane est utilisé en thérapie, à la fois suite à l'exérèse chirurgicale et en cas de CCS métastatiques. L'activité du mitotane dépend de sa transformation métabolique dans la mitochondrie par les enzymes de type P450 ce qui lui confèrent sa spécificité surrénalienne. Il a été démontré que l'administration du mitotane induit une atrophie surrénalienne dans des modèles animaux (Lin et al., 2012). L'effet cytotoxique du mitotane semble médié par sa liaison à des protéines mitochondriales et des dommages oxydatifs résultant de la génération de radicaux libres (Veytsman et al., 2009). De plus, le mitotane sensibilise les cellules H295R aux radiations ionisantes en diminuant la réparation des lésions de l'ADN et en bloquant la prolifération cellulaire (Cerquetti et al., 2010). En plus de ses actions anti-tumorales, il a été démontré que le mitotane inhibe à la fois la sécrétion basale et induite de cortisol dans les cellules H295R, en agissant de manière non spécifique sur l'expression de certaines enzymes de la voie de stéroïdogenèse (StAR, CYP11A1, CYP21) (Lin et al., 2012). L'ensemble de ces résultats démontre donc une double utilité du mitotane puisqu'il exerce à la fois une action anti-tumorale sur les CCS et un rôle inhibiteur des hypersécrétions surrénaliennes qui peuvent leur être associées.



<u>Figure 23</u> : Survie sans récidive pour 122 patients présentant un CCS et traités par du mitotane
A) Représentation de la survie sans récidive selon la concentration de mitotane
B) Représentation de la survie sans récidive selon le délai d'atteinte d'une mitotanémie supérieure à 14 mg/l
Reproduit d'après Grunenwald et al., 2011.

L'efficacité du mitotane sur la survie globale et sans récidive de patients a été démontrée en 2007 par Terzolo et collaborateurs (Terzolo et al., 2007). Toutefois, comme l'a récemment confirmé l'ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumours), des réponses objectives nécessitent que la mitotanémie des patients soit supérieure à 14 mg/l (Hermsen et al., 2011). Or, des effets secondaires du mitotane sur le système nerveux central sont observés pour une mitotanémie >20 mg/l. Il est donc nécessaire d'atteindre la fenêtre thérapeutique du mitotane entre 14 et 20 mg/l. Afin de déterminer le bénéfice du mitotane comme traitement adjuvant après l'exérèse, une analyse rétrospective sur 122 patients a été réalisée. Cette étude confirme qu'une mitotanémie > 14 mg/l chez plus de 75% des patients améliore la survie sans récidive (Figure 23) (Fassnacht and Allolio, 2009). Toutefois, bien que ces chiffres semblent encourageants, il faut savoir qu'en cas de CCS métastatiques, la réponse partielle observée ne concerne que 25 à 30% des patients sous mitotane (Kirschner, 2012). En effet, un grand nombre d'entre eux n'atteint pas une mitotanémie suffisante pour obtenir un effet bénéfique du mitotane à cause des effets secondaires lourds sur le tractus gastro-intestinal et le système nerveux central qui peuvent apparaitre. Il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies permettant de cibler un plus grand spectre de patients. Pour cela, deux grandes voies de recherche sont à ce jour explorées :

- La « pharmaco-génomique » c'est-à-dire trouver la thérapie la plus appropriée en fonction des patients. Par exemple, des critères pouvant permettre de déterminer quels sont les patients sensibles au mitotane sont en cours de recherche (Hahner and Fassnacht, 2005). D'autre part, il a été démontré que la réponse limitée des CCS aux chimiothérapies basées sur le platine était associée avec une augmentation de la protéine ERCC (Excision Repair Cross Complementation group 1) qui est impliquée dans la réparation de l'ADN. Cela pourrait permettre d'identifier des thérapies cytotoxiques plus adaptées aux CCS (Kirschner, 2012).
- L'identification des altérations génétiques à l'origine du développement de ces tumeurs, qui seront des cibles thérapeutiques potentielles.

C. Génétique des tumeurs cortico-surrénaliennes

La plupart des tumeurs sporadiques sont monoclonales suggérant l'apparition d'une altération génétique somatique précocement dans le développement de la tumeur (Gicquel et al., 1995). L'analyse génétique de syndromes héréditaires prédisposant aux CCS a permis l'identification d'altérations génétiques pouvant être à l'origine des tumeurs cortico-surrénaliennes aussi bien familiales que sporadiques (Libé and Bertherat, 2005). En effet, les CCS sont associés au syndrome de Li-Fraumeni et de Beckwith-Wiedmann qui sont

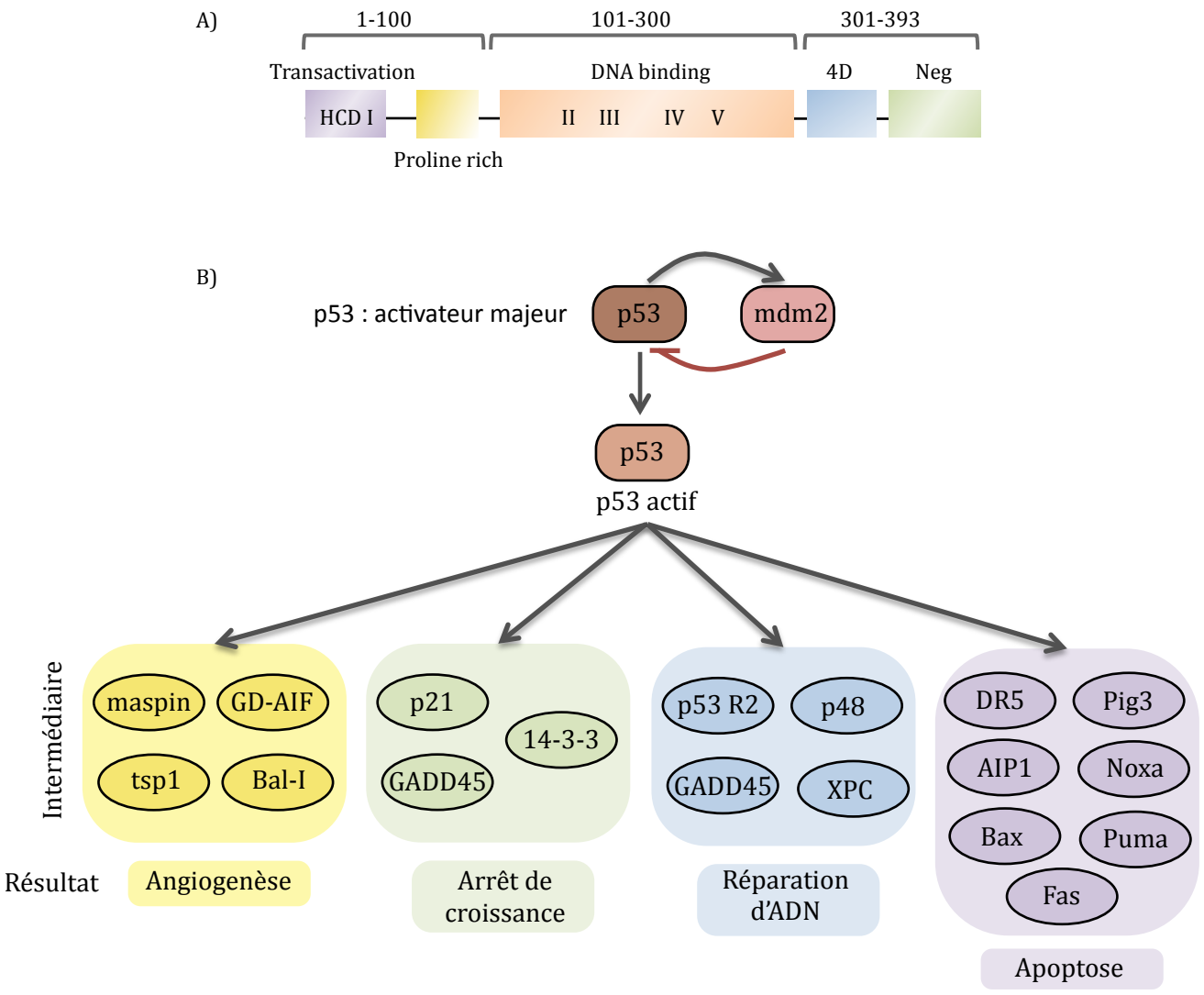


Figure 24: Structure et fonction de p53

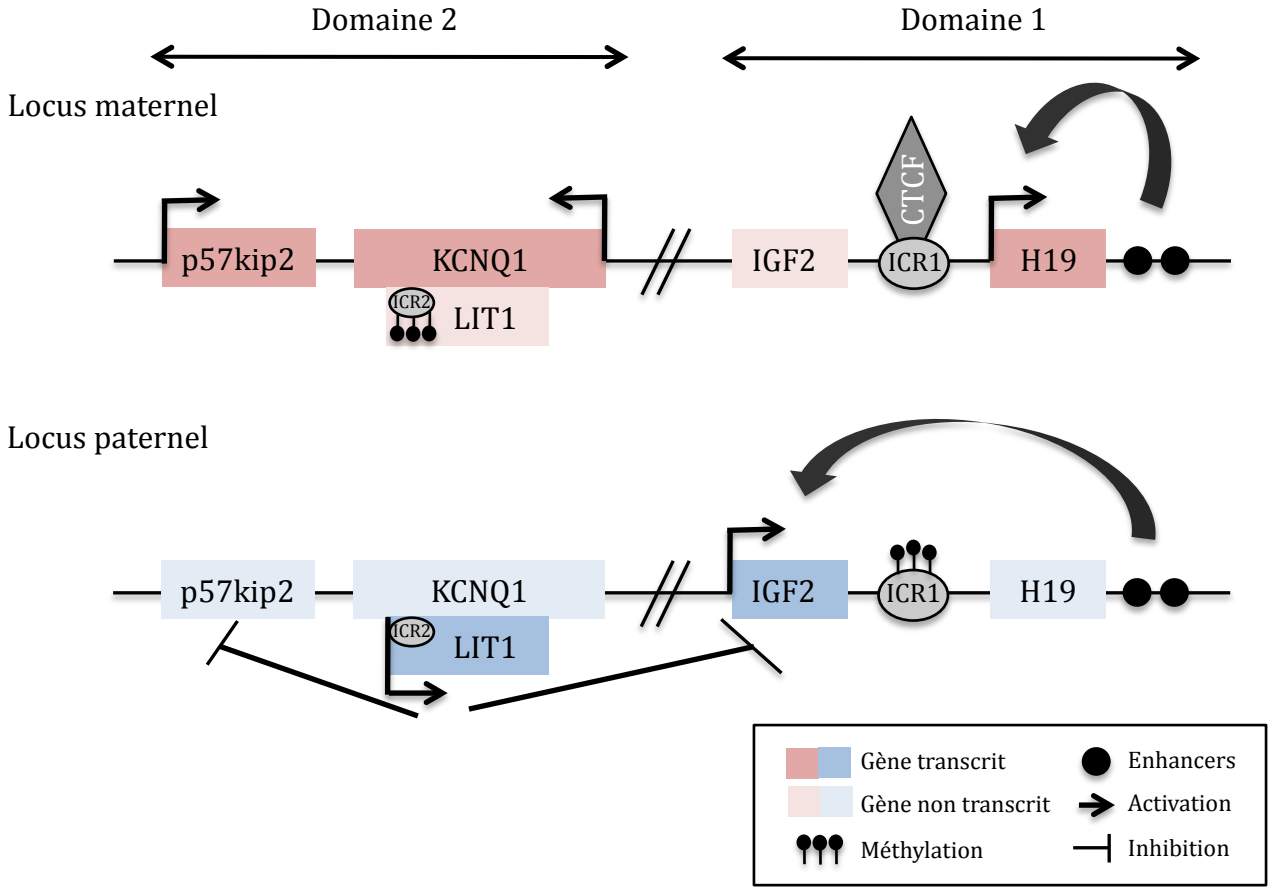
A) Représentation schématique de la protéine p53. Le domaine amino-terminal HCD (Highly Conserved Domain) I contient le domaine acide de transactivation et le domaine de liaison à la protéine mdm2. Le domaine riche en proline contient un second domaine de transactivation. La région centrale contient les domaines de liaison à l'ADN qui sont cibles de 90% des mutations de p53 dans les cancers humains. Le domaine 4D est nécessaire pour sa dimérisation et contient un domaine d'export nucléaire. La partie carboxy-terminale (domaine Neg) contient 3 domaines de localisation nucléaire et un domaine de liaison à l'ADN non spécifique, permettant la liaison à l'ADN endommagé. B) La quantité de p53 est régulée négativement par mdm2. Présentation de différents acteurs en aval de p53, activés soit de manière transcriptionnelle, soit par une interaction protéine-protéine. Cela permet à p53 de contrôler différents processus cellulaires tels que l'angiogenèse, la croissance cellulaire, l'apoptose et la réparation d'ADN.

respectivement causés par une inactivation du suppresseur de tumeurs *p53* et la dérégulation du locus soumis à empreinte 11p15 incluant *H19* et *IGF2* (Insulin-like Growth Factor 2).

a) La protéine P53

Le syndrome Li-Fraumeni (LF) qui est causé dans 70% des cas par une mutation germinale dans le gène *TP53* est caractérisé par une susceptibilité à de nombreux cancers dont les CCS (Hisada et al., 1998). Le suppresseur de tumeur p53, dont le gène est localisé au locus 17p13, est un facteur de transcription homo-tétramérique multi-domaines qui a plus de 100 cibles transcriptionnelles connues à ce jour (Figure 24) (Riley et al., 2008). Il est au centre d'un réseau de voies de signalisation essentielles au contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, de la différenciation, de l'angiogenèse, de la sénescence et de l'apoptose (Levine, 1997; Vousden and Lu, 2002). Dans le sud du Brésil, des familles présentent un syndrome de type LF qui prédispose majoritairement aux CCS pédiatriques même si d'autres cancers ont également été retrouvés. Cette forme du LF est causée par la mutation R337H qui altère la formation du tétramère actif de *TP53,* uniquement lorsque le pH cellulaire augmente. Il est supposé que l'augmentation de 20000 fois du risque de CCS chez ces patients serait due à l'environnement biochimique spécifique du cortex surrénalien, résultant de son activité stéroïdogène (Wasserman et al., 2012).

Dans les CCS adultes sporadiques, une perte d'hétérozygotie du locus 17p13, caractéristique de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs est retrouvée dans plus de 50% des tumeurs mais une mutation somatique de *TP53* n'est retrouvée que dans 25% d'entre elles. Ceci suggère que d'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont potentiellement présents au locus 17p13 (Assie et al., 2012). Des analyses transcriptomiques ont permis de démontrer que ces mutations de *TP53* sont retrouvées dans un sous-groupe de CCS agressifs de profil transcriptionnel distinct (Ragazzon et al., 2010). L'inactivation de *p53* conduirait donc à la tumorigenèse d'un sous-type spécifique de CCS de haut grade. Toutefois, le faible taux de mutations *TP53* retrouvé suggère qu'il n'est pas un gène suppresseur de tumeurs majeur dans l'initiation tumorale de la cortico-surrénale. Conformément à cette hypothèse, la perte d'hétérozygotie de *p53* n'est que rarement retrouvée dans les ACS (Gicquel et al., 2001). La perte de fonction de p53 interviendrait donc dans un contexte tumoral et favoriserait la progression maligne agressive de ces tumeurs.



<u>Figure 25</u> : Organisation de la région génomique 11p15 (locus IGF2) chez l'Homme

La région 11p15 soumise à l'empreinte parentale est organisée en deux domaines fonctionnels, contrôlés par des centres de l'empreinte (ICR).

Dans le domaine 1, IGF2 est exprimé à partir de l'allèle paternel alors que H19 est exprimé par l'allèle maternel. Ceci est du à l'absence de méthylation au niveau de l'ICR1 de l'allèle maternel, ce qui permet le recrutement des protéines CCCTC binding factor (CTCF), bloquant ainsi l'action des enhancers de IGF2. Par contre, au niveau du locus paternel, l'ICR1 est méthylé, empêchant l'interaction avec CTCF. Les enhancers permettent alors l'activation de la transcription de IGF2.

Dans le domaine 2, LIT1 n'est pas exprimé au niveau maternel à cause de la méthylation de l'ICR2 présent dans son promoteur. Ceci permet l'expression de $p57^{kip2}$ et KCNQ1. Au niveau paternel, l'absence de méthylation au niveau de l'ICR2 permet l'expression de LIT1 qui réprime celle de $p57^{kip2}$ et KCNQ1.

b) Surexpression de IGF2

Le syndrome de Beckwith-Wiedmann (BW) entraine une surcroissance embryonnaire. Il est causé par des remaniements chromosomiques et des modifications d'empreinte au locus 11p15 (Figure 25) qui aboutissent à la dérégulation de plusieurs gènes dont le gène codant pour le facteur de croissance IGF2 qui se trouve surexprimé. Au delà du phénotype de surcroissance, ce syndrome prédispose au développement de CCS, suggérant un rôle potentiel de la surexpression de *IGF2* dans la physiopathologie surrénalienne.

L'analyse transcriptomique des tumeurs cortico-surrénaliennes a mis en évidence une surexpression de *IGF2* dans 80 à 90% des CCS sporadiques mais dans moins de 10% des ACS (Gicquel et al., 1997a; Liu et al., 1997). *IGF2* est l'un des gènes les plus surexprimés dans les CCS (Giordano et al., 2003; de Fraipont et al., 2005) et sa surexpression est associée avec un phénotype agressif et une augmentation de 5 fois du risque de récidive (Gicquel et al., 2001). Cette augmentation du niveau d'expression de l'ARNm se traduit par une augmentation de la protéine IGF2 dont l'analyse en immunohistochimie peut fournir un nouveau marqueur de malignité des tumeurs cortico-surrénaliennes (Schmitt et al., 2006). Toutefois, les difficultés d'utilisation des anticorps anti-IGF2 expliquent pourquoi il n'est pas largement utilisé à ce jour comme marqueur (Tissier, 2010).

Tout comme pour le BW, la surexpression de *IGF2* dans les CCS sporadiques est causée par des remaniements chromosomiques (Gicquel et al., 1997b) ou des modifications du profil de l'empreinte (Ragazzon et al., 2011). Outre IGF2, l'expression d'autres composants de sa voie de signalisation est également altérée. Ainsi, son récepteur IGF1R (Insulin-like Growth Factor Receptor I) et la protéine de liaison, IGFBP2 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2) sont surexprimés dans CCS (Weber et al., 1997). L'ensemble de ces données suggère donc que l'activation de la voie de signalisation IGF2 pourrait intervenir dans la carcinogenèse cortico-surrénalienne. Conformément à cette hypothèse, des antagonistes de IGF1R induisent une diminution de la prolifération dans les cellules cortico-surrénaliennes humaines en culture et dans des modèles murins de xénogreffes (Barlaskar et al., 2008).

Cependant, dans des modèles de souris surexprimant *Igf2*, aucune tumeur cortico-surrénalienne n'a été décrite même si dans l'un d'entre eux, cette surexpression entraine une hyperplasie de la zone fasciculée (Eggenschwiler et al., 1997; Sun et al., 1997; Weber et al., 1999). De plus, lors d'analyses transcriptomiques, la surexpression de IGF2 n'est pas associée à un profil d'expression génique particulier qui permettrait de caractériser les CCS par clustering non supervisé (Assie et al., 2012). Ceci suggère donc que les mécanismes moléculaires à l'origine du développement des tumeurs surexprimant *IGF2* ne sont pas différents de ceux mobilisés dans

les tumeurs où *IGF2* n'est pas surexprimé. La surexpression de *IGF2* ne serait donc pas un évènement initiateur de la tumorigenèse mais elle pourrait favoriser la progression tumorale en présence d'autres altérations.

Ainsi les candidats identifiés à ce jour ne semblent pas être des acteurs initiateurs de la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Il demeure donc nécessaire d'identifier les oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs à l'origine du développement des tumeurs cortico-surrénaliennes afin de faciliter le diagnostic mais surtout de proposer des traitements ciblés. Récemment, l'analyse immuno-histochimique des ACS et CCS a mis en évidence des dérégulations de la voie Wnt/ßcaténine, accompagnées dans certains cas, de mutations activatrices de la ßcaténine (Tissier et al., 2005). La ßcaténine étant impliquée dans le développement de nombreuses tumeurs (Polakis, 2000; Polakis, 2012), elle apparaît donc comme un candidat potentiel pour l'induction d'hyperplasies bénignes et malignes de la cortico-surrénale.

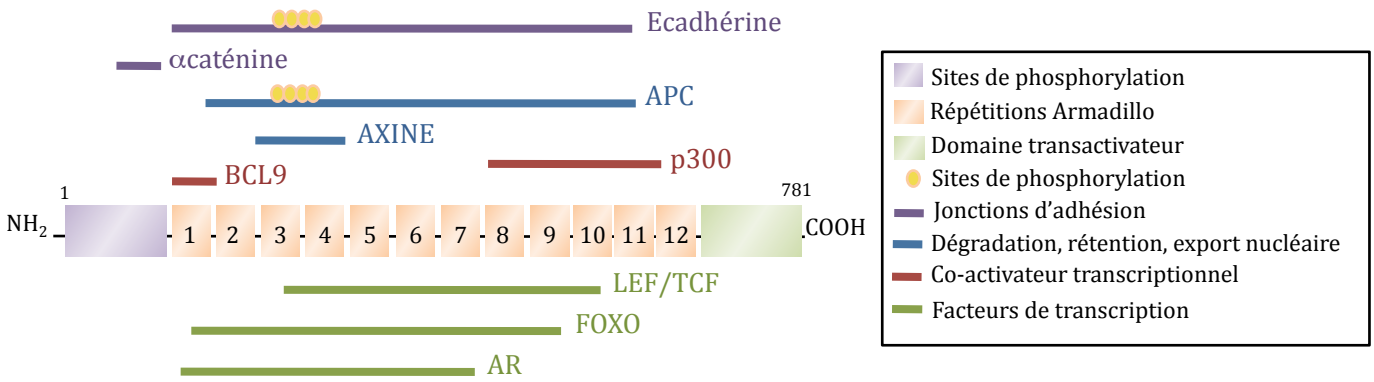


Figure 26 : La ßcaténine est une protéine multi-fonctionnelle qui interagit avec divers partenaires
Représentation schématique de la protéine ßcaténine, constituée de 12 répétitions Armadillo entourées d'un domaine amino-terminal où elle est phosphorylée et d'un carboxy-terminal qui assure la fonction de transactivation. Les traits colorés montrent les différents sites d'interaction de la ßcaténine avec certains de ses partenaires. APC : Adenomatous Polyposis Coli, TCF/LEF1 : T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor, AR : Androgen Receptor, BCL9 : B cell lymphoma. D'après Valenta et al., 2012.

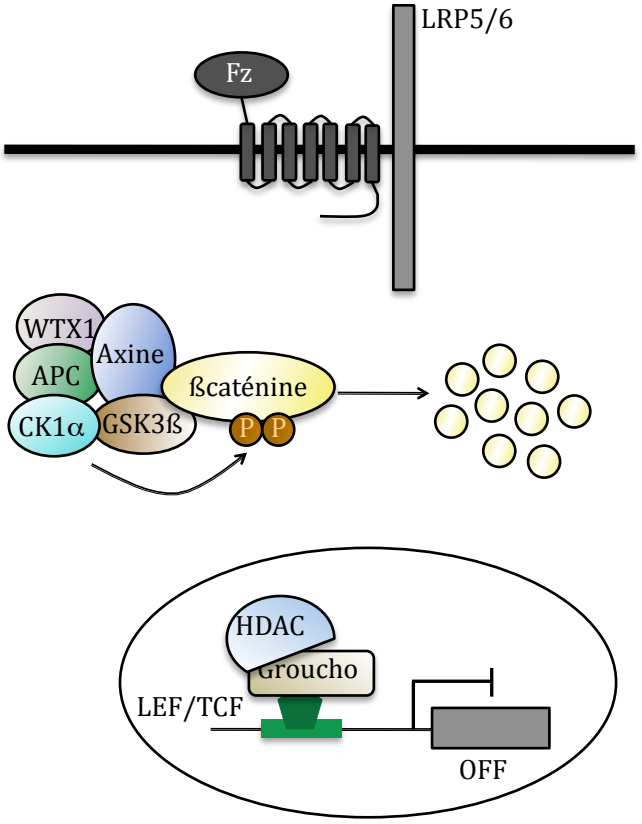


Figure 27: Signalisation Wnt/ßcaténine en absence du ligand
En absence de ligand, la ßcaténine cytoplasmique est phosphorylée sur des résidus sérine, thréonine conservés dans sa région amino-terminale, par le complexe de destruction composé d'Axine, Adenomatous Polyposis Coli (APC), Wilms Tumour gene on the X chromosome 1 (WTX1), de la Glycogène Synthase Kinase 3ß (GSK3ß) et la Caséine Kinase 1α (CK1α). La ßcaténine phosphorylée est ciblée pour une dégradation protéosomale, qui maintient la ßcaténine à de faibles niveaux cytoplasmiques. En absence de ligand, les protéines LEF/TCF liées sur le promoteur des gènes cibles de la ßcaténine, sont directement associées avec des répresseurs transcriptionnels de la famille Groucho et des histones déacéthylases (HDAC).

V) Rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne

1. Activités de la voie Wnt/ßcaténine

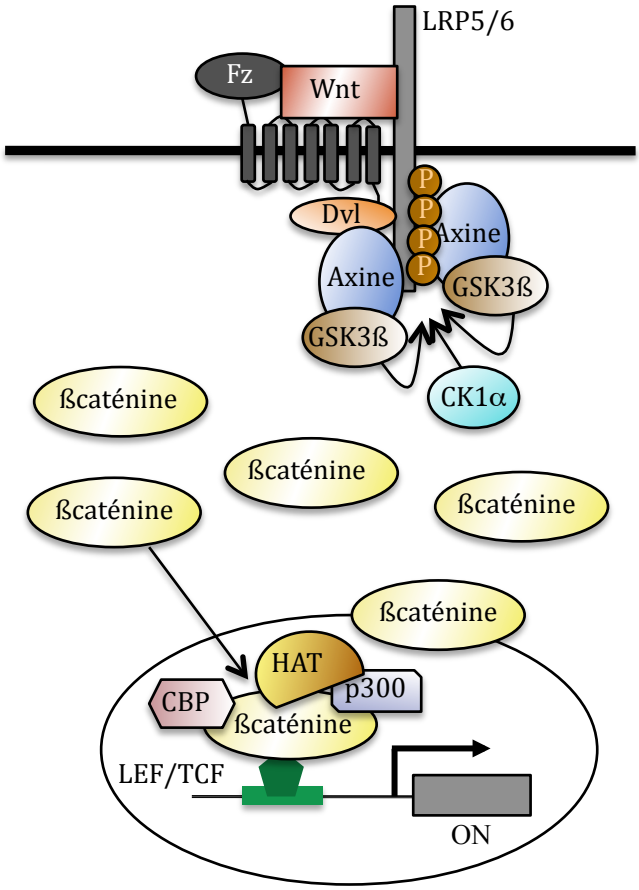
La voie de signalisation Wnt/ßcaténine est contrôlée par des ligands glycoprotéiques sécrétés de la famille Wingless (Wnt) et régule de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie et/ou l'apoptose. Il existe trois voies Wnt : la voie de planar cell polarity (PCP) impliquée dans la ciliogenèse, la voie Wnt/Ca^{2+} intervenant dans le contrôle du mouvement et du comportement cellulaire et la voie Wnt/ßcaténine, dite canonique. Ces voies Wnt sont essentielles pour le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes. Dans ce manuscrit, nous nous focalisons sur la voie Wnt/ßcaténine, dont l'activité réside dans la régulation de l'accumulation nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine.

La ßcaténine est un des membres de la famille Armadillo (Arm). Elle contient un domaine central composé de 12 répétitions Arm qui agissent comme une plateforme d'interactions avec de multiples protéines, qui lui permet d'assurer ses différentes fonctions (Figure 26) (Jamieson et al., 2012). La ßcaténine a d'abord été identifiée au niveau de la membrane plasmique où elle interagit directement avec la queue cytoplasmique de la E-cadhérine, qui est un composant clé de la jonction d'adhésion. Ce complexe est essentiel pour l'adhésion cellules-cellules et son abolition à la membrane est associée avec la progression maligne de tumeurs épithéliales telles que les cancers colo-rectaux (Buda and Pignatelli, 2011). Outre ce rôle, il existe un pool de ßcaténine cytoplasmique indépendant de la E-cadhérine qui est contrôlé par l'activation des récepteurs transmembranaires Frizzled par les ligands Wnt. En réponse à ces ligands, la ßcaténine cytoplasmique peut entrer dans le noyau où elle agit comme un co-activateur transcriptionnel. C'est alors un effecteur clé de la voie canonique.

2. Mécanismes de contrôle de la voie Wnt/ßcaténine

A. Inactivation en absence de ligand

En absence de ligand, la ßcaténine cytoplasmique est associée à un complexe dit «complexe de destruction» qui se compose de trois gènes suppresseurs de tumeurs : Axine, Adenomatous Polyposis Coli (APC), Wilms Tumour gene on the X chromosome 1 (WTX1) et deux sérine thréonine kinases, la Glycogène Synthase Kinase 3ß (GSK3ß) et la Caséine Kinase I (CKI) (Clevers and Nusse, 2012). La liaison de la ßcaténine cytoplasmique à ce complexe induit sa phosphorylation au niveau des résidus sérine en position 33, 37, 45 et de la thréonine 41 conservés, localisés dans sa partie amino-terminale (Liu et al., 2002) (Figure 27). La ßcaténine phosphorylée est alors reconnue par les répétitions F box de ß-TrCP, une E3 ubiquitine ligase qui cible la ßcaténine vers une dégradation protéosomale rapide (Aberle et al., 1997). Cela



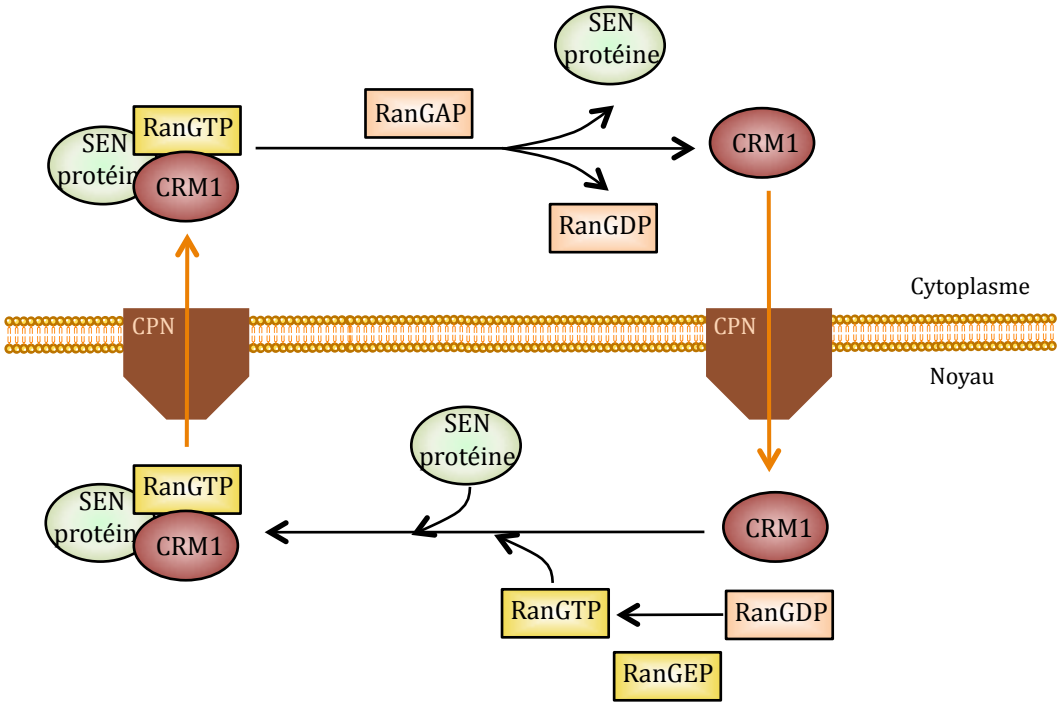
<u>Figure 28</u>: Signalisation Wnt/ßcaténine en présence du ligand
La signalisation Wnt est initiée par la liaison des ligands Wnt sécrétés sur leur co-récepteur composé de Frizzled (Fz) et d'un membre de la famille des low-density lipoprotein (LDL), LRP5/6. Cette liaison inhibe le complexe de destruction par recrutement de Dishevelled sur le domaine cytoplasmique de Fz. Cette association induit la délocalisation de l'Axine du cytoplasme à la queue cytoplasmique de LRP, après une phosphorylation dépendante de GSK3ß, du co-récepteur. La séquestration à la membrane du «complexe de destruction», empêche la phosphorylation et la dégradation de la ßcaténine. Ceci résulte en une accumulation de la ßcaténine active dans le cytoplasme, qui migre dans le noyau où elle agit comme un co-activateur transcriptionnel des facteurs T cell-specific factor (TCF)/lymphoid enhancer-binding factor (LEF). L'association de la ßcaténine avec LEF/TCF recrute des histones acétylases, les Legless family docking proteins (Bcl9) et CBP/P300 qui convertissent LEF/TCF en activateurs transcriptionnels de leurs gènes cibles.

maintient la ßcaténine à de faibles niveaux cytosoliques empêchant sa migration dans le noyau et donc la transcription de ses gènes cibles. Les protéines de liaison à l'ADN T cell-specific factor (TCF)/lymphoid enhancer-binding factor (LEF) toujours présentes sur le promoteur des gènes cibles de la voie sont alors associées avec des inhibiteurs transcriptionnels de la famille Groucho et des histones déacétylases (Cavallo et al., 1998). Le rôle central du complexe de destruction dans le contrôle de l'activité de la voie est mis en évidence dans le contexte de la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF). Ce syndrome causé par une mutation germinale inactivatrice du gène *APC*, induit la formation de centaines de polypes dans le gros intestin. Certains d'entre eux acquièrent une seconde mutation inactivatrice d'APC (souvent une perte d'hétérozygotie) et progressent vers la malignité (Polakis, 1997; Colnot et al., 2004; Strate and Syngal, 2005). Cette inactivation de APC prévient la dégradation de la ßcaténine qui est alors anormalement accumulée et qui migre dans le noyau pour activer ses gènes cibles de manière illégitime (Munemitsu et al., 1995). Des modèles de souris transgéniques mutantes pour APC sont capables de reproduire l'ensemble de la progression tumorale observée chez les patients, confirmant le rôle de l'inactivation de APC dans la dérégulation de la voie Wnt et le développement tumoral (MCCART et al., 2008).

B. Activation en présence de ligand

a) <u>Inhibition de la dégradation</u>

Lorsqu'un ligand Wnt est sécrété, il se lie au complexe récepteur constitué du récepteur de la famille Frizzled (Fz) et d'un membre de la famille des récepteurs à lipoprotéines de faibles densités, LRP5/6 (Bhanot et al., 1996). Chez les mammifères, il existe dix protéines Fz qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires avec un large domaine amino-terminal riche en cystéine (CRD) où se lient les ligands Wnt (Clevers and Nusse, 2012). L'interaction du ligand avec le co-récepteur Fz-LRP5/6 entraine le recrutement de Dishevelled (Dvl) au niveau du domaine cytoplasmique de Fz et une phosphorylation dépendante de GSK3ß au niveau de la queue cytoplasmique de LRP (Yang-Snyder et al., 1996). Cette dernière induit la délocalisation de l'Axine à la membrane ce qui constitue l'étape clé de la signalisation (Figure 28). L'ensemble de ces évènements aboutit à la séquestration du complexe de destruction au niveau de la membrane plasmique empêchant la phosphorylation et la dégradation de la ßcaténine. La ßcaténine s'accumule alors dans le cytoplasme et migre dans le noyau (Sugioka et al., 2011).



<u>Figure 29</u> : Système dépendant de CRM1 et du Ran-GTP pour exporter les protéines présentant un signal d'export nucléaire (SEN) au travers du complexe du pore nucléaire (CPN).

CRM1 (chromosome maintenance protein 1) se lie au SEN des protéines avec du RanGTP, ce qui induit son changement de conformation. Le complexe ainsi formé est ensuite exporté dans le cytoplasme au travers du CPN où RanGTP est hydrolysé par les RanGTPases en RanGDP. Le complexe se dissocie alors libérant la protéine qui présente le SEN, dans le cytoplasme. D'après Turner et al., 2012.

b) Trafic nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine

Etant dépourvue de signal de localisation nucléaire, la ßcaténine ne peut pas entrer dans le noyau grâce aux exportines/importines (Valenta et al., 2012). Récemment, il a été démontré que l'interaction directe et transitoire de la ßcaténine avec des composants des pores nucléaires, les nucléoporines permet sa translocation dans le noyau (Sharma et al., 2012). Toutefois, il existe également d'autres mécanismes moléculaires conduisant à son import nucléaire. Par exemple, le facteur de transcription FoxM1 (Forkhead-box) a des effets régulateurs multiples sur la ßcaténine. Ainsi, l'interaction entre ces deux protéines induit l'import nucléaire du complexe. Une fois dans le noyau, FoxM1 peut rester lié à la ßcaténine. Il empêche alors son export et module l'expression de ses gènes cibles (Sharma et al., 2012).

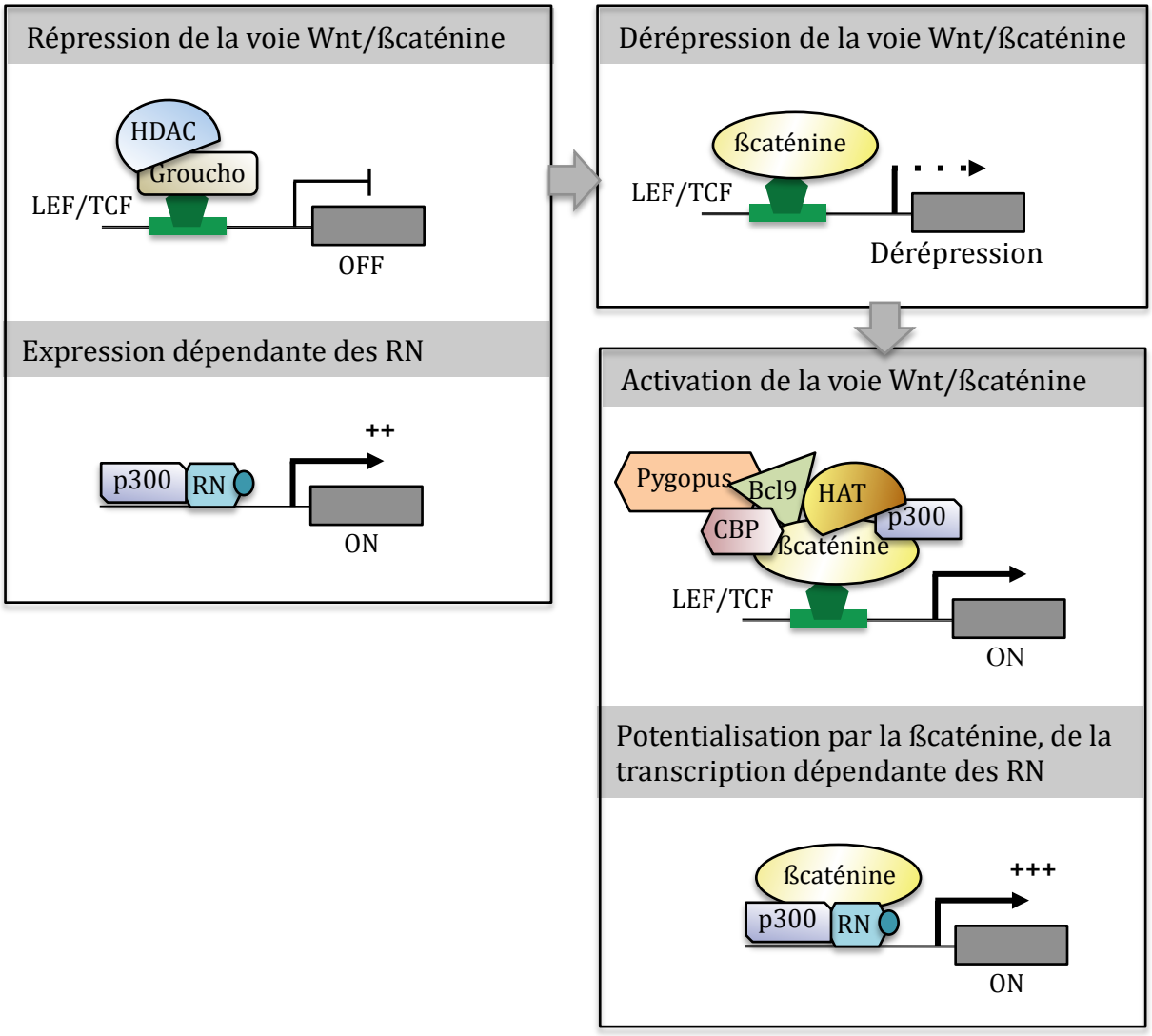
APC, qui participe à la formation du complexe de destruction est également capable de contrôler le trafic nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine. En effet, APC qui porte 2 signaux d'export nucléaires (NES) est capable de s'associer à la ßcaténine dans le noyau et de l'exporter activement, hors de ce compartiment (Sharma et al., 2012). Cette activité est dépendante de la protéine CRM1 (chromosome maintenance protein 1) qui se lie au RanGTP et à APC grâce à son NES et permet son transport au travers du pore nucléaire. Dans le cytolasme, RanGTP est hydrolysé en RanGDP par une RanGTPase ce qui entraine la dissolution du complexe et la libération de APC dans le cytoplasme (Figure 29) (Turner and Sullivan, 2008).

La ßcaténine peut également sortir du noyau indépendamment de CRM1 et d'APC en interagissant directement avec un cofateur de l'export médié par CRM1, Ran binding protein (RanBP3), qui agit donc comme un antagoniste de la voie Wnt/ßcaténine (Hendriksen et al., 2005). Ces mécanismes complexes et multiples de régulations nucléaires représentent la dernière ligne de défense avant une activation de la voie Wnt/ßcaténine.

c) Activité nucléaire de la ßcaténine

Une fois dans le noyau, la ßcaténine doit interagir avec la partie N-terminale des facteurs LEF/TCF pour stimuler la transcription de leurs génes cibles (Eastman and Grosschedl, 1999). Toutefois, la présence d'APC dans le noyau peut prévenir la laison de la ßcaténine à LEF1, par un mécanisme de compétition. En effet, si APC a été phosphorylé par la CKI, il se liera préférentiellement à la ßcaténine, induisant alors sa séquestration et empêchant la transcription de ses gènes cibles (Neufeld, 2009).

En absence de phosphorylation de APC par CKI, la ßcaténine se lie au complexe LEF/TCF pour permettre le recrutement des histones acétylases, des protéines de docking de la famille Legless (BCL9) et de CBP/p300 afin d'activer la transcription de ses gènes cibles (Figure 30). Cependant, la ßcaténine nucléaire agit également de manière indépendante des facteurs



<u>Figure 30</u> : La ßcaténine, un co-activateur transcriptionnel des facteurs LEF/TCF et de certains récepteurs nucléaires (RN)
En absence de stimulation, les facteurs LEF/TCF sont associés à Groucho et aux HDAC qui agissent comme des répresseurs transcriptionnels. La transcription dépendante des RN est quant à elle activée en présence du ligand de ces RN. La liaison de la ßcaténine aux facteurs LEF/TCF déplace les co-répresseurs et favorise donc la dérépression transcriptionnelle. La ßcaténine permet alors le recrutement de co-activateurs au niveau des facteurs LEF/TCF ce qui activent la transcription des gènes Wnt dépendants de TCF. D'autre part, la ßcaténine se lie au niveau des promoteurs contrôlés par certains RN activés par leur ligand, afin de potentialiser leur transcription.

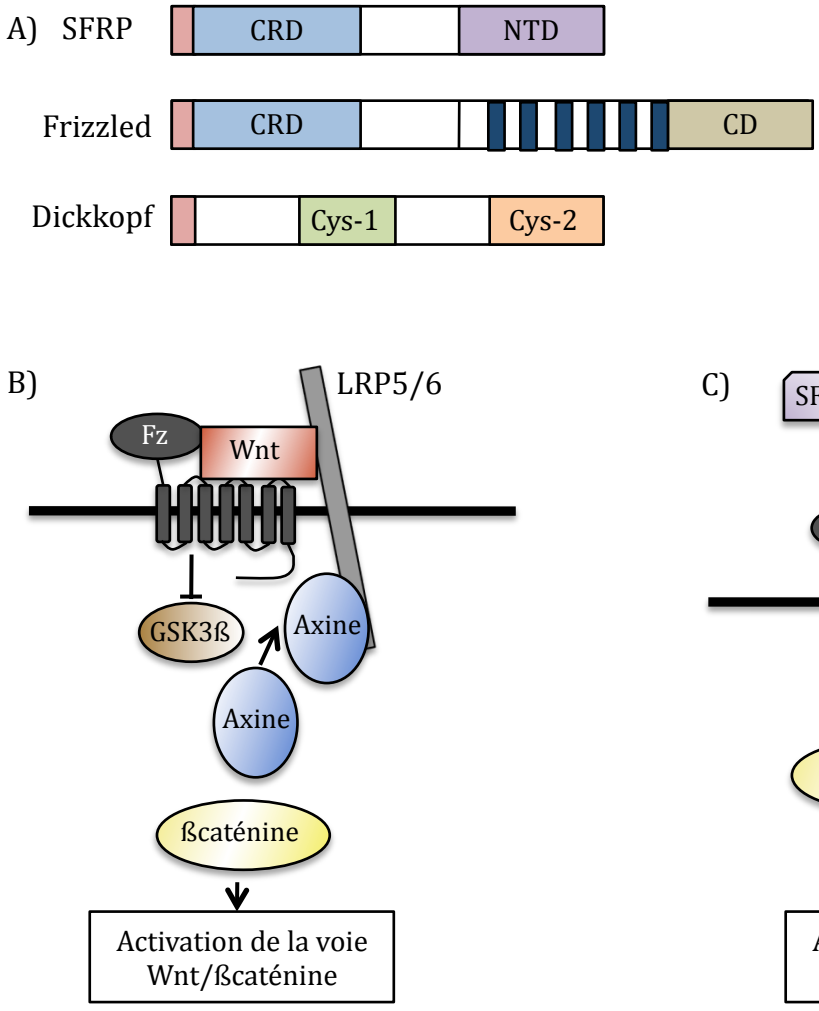
LEF/TCF. Elle interagit par exemple avec le récepteur nucléaire des androgènes, AR pour potentialiser la transcription de ses gènes cibles. Réciproquement, AR favorise sa translocation nucléaire (Figure 30) (Valenta et al., 2012). Il existe donc des effets réciproques entre certains récepteurs nucléaires et la ßcaténine ce qui induit une complexité d'action et une compétition entre ces différents partenaires. En effet, la transfection d'un facteur TCF4 dominant négatif, dépourvu de domaine de liaison à l'ADN, favorise la transcription au travers de la liaison de la ßcaténine avec des récepteurs nucléaires tels que Sf1, au détriment des cibles de LEF/TCF (Kennell et al., 2003). Sf1 est un gène clé dans le développement et la stéroïdogenèse surrénalienne. L'effet stimulateur de la ßcaténine sur certains promoteurs induits par Sf1 tels que celui de StAR (Schinner et al., 2007) permet donc d'accroitre son activité surrénalienne, en contrôlant l'expression d'un gène cible essentiel de la stéroïdogenèse. Contrairement à AR, Sf1 semble quant à lui exercer un effet négatif sur la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ßcaténine, dépendante des facteurs LEF/TCF, dans les cellules H295R (Ehrlund et al., 2012). L'interaction entre la ßcaténine et Sf1 pourrait donc jouer un rôle essentiel dans le développement et l'homéostasie surrénalienne.

En conclusion, la ßcaténine contrôle de manière dépendante ou indépendante des facteurs TCF, une grande variété de gènes cibles connues pour intervenir dans un large panel de fonctions biologiques ce qui explique son rôle essentiel dans le développement embryonnaire et pathologique de nombreux tissus.

C. Modulation de la voie par les inhibiteurs extracellulaires

L'activation de la signalisation Wnt peut être modulée par des inhibiteurs naturels de la voie. Ils sont classés en deux catégories selon qu'ils agissent (1) au niveau du ligand ou (2) au niveau du récepteur (Figure 31).

Les membres de la famille SFRP pour Secreted Frizzled Related Protein font partie de la première classe. Ils possèdent un domaine homologue au domaine CRD du récepteur Fz ce qui leur permet d'interagir avec les ligands Wnt. Cependant, ils n'ont pas de segments transmembranaires nécessaire à un ancrage à la membrane et sont par conséquent, des facteurs sécrétés. Les SFRP titrent alors les ligands empêchant leur liaison sur le co-récepteur Fz-LRP5/6 et inhibent donc l'activation de la voie (Figure 31) (Kawano and Kypta, 2003). Par conséquent, la diminution d'expression des *SFRP*, causée par une perte allélique ou une méthylation de leurs promoteurs est associée à une activation de la voie Wnt/ßcaténine dans de nombreux carcinomes humains (Huang et al., 2007; Ko et al., 2002). En accord avec ce rôle suppresseur de tumeurs, la réexpression des SFRP dans des lignées cellulaires de cancers diminue la stabilité de



<u>Figure 31</u> : Régulation de la voie Wnt/ßcaténine par les antagonistes

A) Les protéines SFRP ont un domaine CRD (Cysteine-rich domain) en commun avec le récepteur Frizzled (Fz) et un NTR (Netrin-like domain). Les protéines de la famille Dickkopf ont deux domaines de 10 résidus cystéine conservés, le Cys-1 (Cysteine-rich domain-2) et Cys-2. B) Quand Wnt se lie au co-récepteur Fz-LRP5/6, cela induit la liaison d'Axine à LRP5/6 et empêche la formation du complexe de destruction. La voie est alors activée. C) SFRP peut se lier au ligand Wnt ou à Fz afin d'inhiber l'activation de la voie. D) DKK1 interagit avec LRP5/6 et son récepteur Kremen, ce qui déclenche l'endocytose de LRP5/6, empêchant la formation du complexe Fz-Wnt-LRP5/6. La ßcaténine est alors dégradée et la voie Wnt/ßcaténine est inactivée.

la ßcaténine, réduit leurs capacités tumorales et induit l'apoptose cellulaire, même en présence de mutations activatrices en aval de la voie (Suzuki et al., 2004; Zi et al., 2005).

Les cinq membres de la famille des glycoprotéines Dickkopf (DKK) appartiennent à la seconde classe d'inhibiteurs. DKK1, 2 et 4 inhibent la voie Wnt/ßcaténine par interaction avec leur récepteur de la famille Kremen (Krm) et LRP5/6, l'un des membres du co-récepteur de la voie Wnt (Figure 31). La formation du complexe tripartite DKK, Krm et LRP induit l'internalisation du récepteur Wnt ce qui inhibe l'activation de la voie Wnt/ßcaténine (Niehrs, 2006). Tout comme pour la famille SFRP, l'expression de *DKK1* est diminuée à cause de l'hyperméthylation de son promoteur dans certains cancers dont le cancer du colon où son expression est inversement corrélée à la progression tumorale (Qi et al., 2012). De plus, la surexpression de *DKK1* dans des cellules de cancer du colon réduit elle aussi la formation de colonies et la croissance tumorale en modèles de xénogreffes. DKK1 semble donc avoir lui aussi une fonction de suppresseur de tumeurs (Aguilera et al., 2006).

3. La voie Wnt/ßcaténine dans les tumeurs cortico-surrénaliennes sporadiques

L'hypothèse que la voie Wnt pouvait jouer un rôle dans le développement de tumeurs cortico-surrénaliennes (TCS) a été initialement émise sur la base d'une fréquence accrue de TCS chez les patients porteurs de mutations germinales de APC (Marchesa et al., 1997; Smith et al., 2000). Par la suite, l'accumulation nucléo-cytoplasmique anormale de la ßcaténine, qui caractérise l'activation constitutive de la voie Wnt a été mise en évidence dans 21 des 39 TCS sporadiques étudiées et dans les cellules issues d'un carcinome cortico-surrénalien humains, les H295R (Tissier et al., 2005). Cette activation n'est pas associée à des mutations du gène codant *APC* (Gaujoux et al., 2010) mais une mutation activatrice du gène *Ctnnb1* qui code pour la ßcaténine a été retrouvée dans une proportion significative de 11 des 39 TCS étudiées (Tissier et al., 2005). La plupart de ces mutations sont retrouvées au niveau l'exon 3 et entraine une substitution de la sérine en position 45 qui est un des résidus phosphorylés par le complexe de destruction. L'analyse fonctionnelle de cette mutation, également retrouvée dans les cellules H295R, a démontré une activation constitutive du rapporteur de la voie Wnt/ßcaténine, le TOPFLASH. Cette activation est diminuée par la transfection d'un dominant négatif de TCF confirmant que la mutation du codon du gène *CTNNB1* codant pour le sérine en position 45 active la transcription dépendante de la ßcaténine (Tissier et al., 2005). Compte-tenu du rôle de la ßcaténine dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans des processus biologiques tels que la croissance cellulaire et la prolifération, nous pouvons supposer que son activation constitutive pourrait participer au phénomène de tumorigenèse dans la surrénale. En accord avec cette hypothèse, le PKF115-584 qui est un antagoniste de l'activité transcriptionnelle de la

ßcaténine (Lepourcelet et al., 2004) est capable d'inhiber la prolifération des cellules H295R (Doghman et al., 2008).

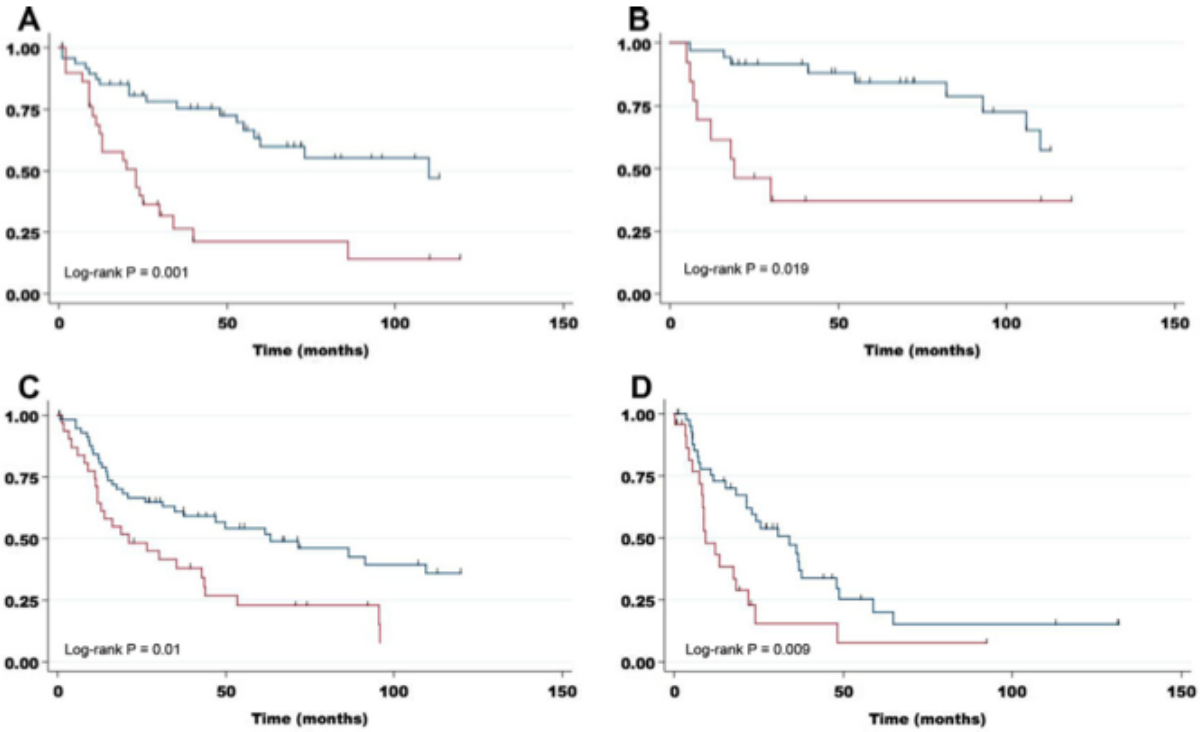
A. La voie Wnt/ßcaténine dans les adénomes cortico-surrénaliens

Les résultats du Dr Tissier mettant en évidence une activation de la voie Wnt/ßcaténine dans 10 des 26 ACS étudiés ont depuis été confirmés sur de plus larges cohortes (Tissier et al., 2005). En effet, l'activation constitutive de cette voie est retrouvée dans 51 des 100 adénomes cortico-surrénaliens testés (Bonnet et al., 2011). En accord avec les données précédentes, les mutations de la ßcaténine touchant principalement la sérine 45 du gène *CTNNB1* sont uniquement retrouvées dans des tumeurs présentant une accumulation anormale de la ßcaténine (Bonnet et al., 2011). Ces études ont également permis de corréler l'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine et les mutations de la ßcaténine avec les ACS non sécréteurs puisqu'elles sont retrouvées aux proportions respectives de 47,1% et 61,1% de ces ACS (Bonnet et al., 2011). L'activation de la voie Wnt/ßcaténine semble donc principalement associée avec les ACS non fonctionnels même si elle est également retrouvée dans 31,4% des ACS sécréteurs de cortisol (Tissier et al., 2005; Bonnet et al., 2011) et que l'état de cette voie n'a pas été analysé dans des ACS producteurs d'androgènes ou d'aldostérone.

Il est intéressant de noter que les mutations de *CTNNB1* sont associées avec des ACS de taille et de poids (4,2 cm (+1,3) et 28,4 g (+21,4)) significativement plus élevés que les ACS sans mutation du gène *CTNNB1* (3,4 cm (+0,9) et 18,2 g (+8,2) $p<0,01$) (Bonnet et al., 2011). Ces données suggèrent donc que les mutations du gène *CTNNB1* sont associées avec des tumeurs moins différenciées et plus agressives. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de 9 PPNAD où les mutations du gène *CTNNB1* sont uniquement retrouvées dans les macronodules de 2 PPNAD de plus de 10mm (Gaujoux et al., 2008). De plus, dans une tumeur mixte présentant une composante bénigne et une composante maligne, la mutation de *CTNNB1* est seulement retrouvée dans la partie maligne de la tumeur, même si l'accumulation anormale de la ßcaténine est retrouvée dans les deux composantes (Gaujoux et al., 2008). Ce cas particulier illustre donc la corrélation entre la mutation du gène *CTNNB1* et l'agressivité des tumeurs cortico-surrénaliennes.

B. La voie Wnt/ßcaténine dans les carcinomes cortico-surrénaliennes

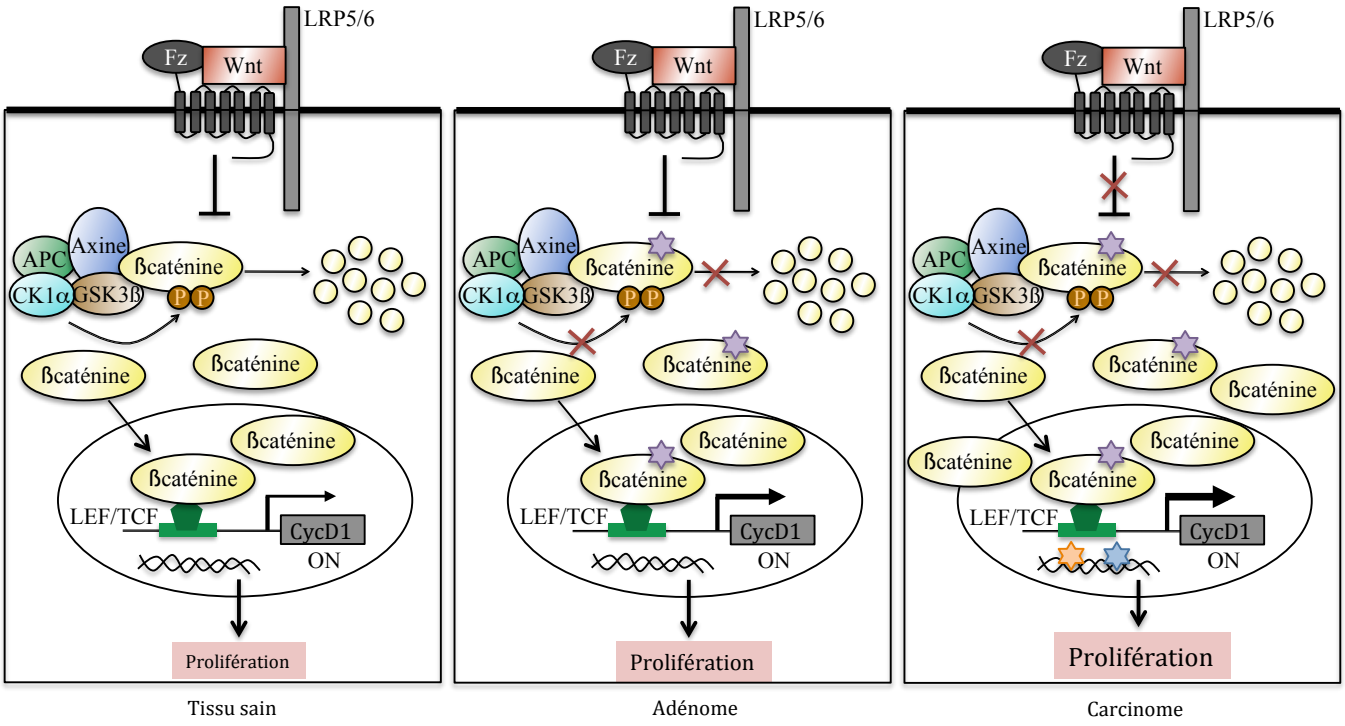
Les premières indications d'une activation de la voie Wnt/ßcaténine dans les CCS sont issues de l'analyse du transcriptome des CCS dans lequel une surexpression des gènes cibles de la ßcaténine a été mise en évidence (Giordano et al., 2003). A la suite de ce travail, les analyses immunohistochimiques de l'expression de la ßcaténine ont démontré une accumulation



<u>Figure 32</u> : Survie sans récurrence et globale, en présence ou non d'un marquage nucléaire pour la ßcaténine, dans deux cohortes indépendantes de CCS.

A) Survie globale des 79 patients de la cohorte Cochin-COMETE en absence (bleu) et en présence (rose) d'un marquage nucléaire de la ßcaténine. B) Survie sans récurrence après une exérèse chirurgicale complète pour les 50 patients de la cohorte Cochin-COMETE en fonction de l'absence (bleu) ou de la présence (rose) d'un marquage nucléaire de la ßcaténine. C) Survie globale des 92 patients de la cohorte Allemande-ENSAT en absence (bleu) ou en présence (rose) d'un marquage nucléaire pour la ßcaténine. D) Survie sans récurrence suite à une résection chirurgicale complète pour les 67 patients de la cohorte Allemande-ENSAT en absence (bleu) ou en présence (rose) d'un marquage nucléaire pour la ßcaténine. Reproduit de Gaujoux et al., 2011.

anormale de la protéine dans 87 des 236 (37%) CCS analysés (Tissier et al., 2005; Ragazzon et al., 2010; Gaujoux et al., 2011). Toutefois, le patron d'accumulation nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine est plus drastique dans les CCS et son marquage nucléaire est significativement associé avec la présence d'une maladie métastatique locale ou avancée (Gaujoux et al., 2011). Cette accumulation anormale est par ailleurs corrélée avec la présence de deux critères de Weiss : la nécrose et un haut compte mitotique par rapport aux autres CCS. Par conséquent, la survie globale et sans récurrence des patients est significativement plus faible dans les CCS avec activation de la voie Wnt/ßcaténine (Figure 32) (Gaujoux et al., 2011). La classification moléculaire des CCS par une analyse de transcriptome, a mis en évidence un sous-groupe de tumeurs présentant une activation de la voie Wnt sur la base d'une augmentation de l'expression des gènes cibles de la ßcaténine (Ragazzon et al., 2010). Ce sous-groupe présente un profil génique spécifique et se caractérise par un mauvais pronostic, conformément à l'hypothèse du caractère aggravant de l'activation de la voie Wnt.



<u>Figure 33</u> : Modèle hypothétique du rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans l'oncogenèse surrénalienne
Dans un tissu sain, la quantité de ßcaténine cytoplasmique est contrôlée par le complexe de destruction composé d'APC, Axine, CK1α et GSK3β. Elle n'active l'expression de ses gènes cibles qu'en réponse aux ligands Wnt. Lorsqu'une mutation somatique activatrice de la ßcaténine apparait, elle empêche le contrôle de la ßcaténine par le complexe de destruction. La ßcaténine s'accumule alors et active la transcription de ses gènes cibles dont la cycline D1, indépendamment des ligands. L'indice de prolifération augmente, un adénome est formé. La prolifération excessive et incontrôlée constitue alors un terrain favorable à l'accumulation d'autres mutations (étoiles) responsable de la progression maligne.

VI) Projet de recherche

Le cortex surrénalien peut développer des tumeurs bénignes ou malignes, qui sont soit sécrétrices, soit non sécrétrices. Alors que les tumeurs bénignes sont fréquentes, les carcinomes cortico-surrénaliens sont rares. Cependant, les CCS sont associés à un mauvais pronostic, le taux de survie à 5 ans étant de seulement 16 à 38% (Luconi and Mannelli, 2012). Il apparaît donc nécessaire de développer des thérapies plus ciblées de ces tumeurs. C'est pourquoi ces dernières années, des efforts considérables ont été fournis pour mieux comprendre l'étiologie moléculaire des CCS.

Les deux premières altérations considérées comme des événements initiateurs possibles de la tumorigenèse surrénalienne sont la perte de p53 et la surexpression de *IGF2*. Toutefois, différents arguments bibliographiques développés dans l'introduction suggèrent que ces altérations ne sont pas initiatrices du développement tumoral mais qu'elles participent plutôt à la progression vers la malignité.

Peu de temps avant le début de ma thèse, un autre candidat, la voie Wnt/ßcaténine, est apparu. Cette voie de signalisation avait été retrouvée constitutivement activée dans 17 des 39 tumeurs analysées (Tissier et al., 2005). Compte-tenu de sa fonction connue dans la régulation de nombreux processus biologiques dont la prolifération, nous pouvons supposer que son activation constitutive induit la prolifération excessive des cellules cortico-surrénaliennes. Contrairement aux autres mutations déjà identifiées jusque là, qui sont retrouvées majoritairement soit dans les ACS (R1α) soit dans les CSS (p53, IGF2), la prévalence des mutations de la ßcaténine est similaire dans les adénomes et dans les carcinomes avec respectivement 27% et 31% (Tissier et al., 2005). Ces résultats suggèrent donc que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine serait un évenement initiateur du développement d'un carcinome cortico-surrénalien à partir d'un adénome par un processus multi-étapes (Figure 33). De plus, le fait que la localisation de la ßcaténine devient majoritairement nucléaire dans les CCS (Gaujoux et al., 2011) suggère que d'autres régulateurs de l'activité de la voie Wnt/ßcaténine peuvent être altérés au moment de la progression tumorale.

L'élaboration de ce modèle à partir des données bibliographiques disponibles à l'époque a été le point de départ de mon travail. Nous avons alors décidé d'analyser le pouvoir oncogénique de la ßcaténine grâce au développement et à la caractérisation d'un modèle de souris transgéniques (les souris ΔCat) présentant une activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine, spécifiquement dans le cortex surrénalien.

Présentation des résultats

Article 1 : Constitutive ßcatenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Human Molecular Genetics, 2010.

La caractérisation des souris ΔCat a permis de démontrer que l'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine induit une hyperplasie et une dysplasie du cortex visualisée au travers de l'accumulation de cellules stéroïdogènes dans la medulla et de cellules de type fibroblastique dans l'ensemble du cortex. Les souris ΔCat présentent donc des tumeurs qui restent dans un premier temps bénignes même si la présence d'une néovascularisation importante suggère une progression possible vers la malignité. En effet, environ 30% des souris ΔCat développent un carcinome cortico-surrénalien caractérisé par la présence de métastases loco-régionales à 18 mois. L'ensemble de ces résultats a donc permis de démontrer que la ßcaténine est un oncogène surrénalien. La faible pénétrance de carcinomes démontre que comme dans le modèle proposé au départ, l'activation de la voie Wnt/ßcaténine induit le développement de tumeurs et favorise la progression maligne mais que d'autres altérations génétiques sont nécessaires pour favoriser la transition maligne.

Nous avons également étudié les conséquences de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine sur la fonction et la différenciation du cortex surrénalien au travers de dosages hormonaux et de l'étude *in situ* des marqueurs des différentes zones surrénaliennes. Ceci nous a permis de démontrer que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine induit une hyperproduction d'aldostérone causée par la différenciation d'une zone glomérulée ectopique.

Article 2 : Constitutive Wnt/ßcatenin signaling is a major contributor to the development of aldosterone producing adenomas in patients.

Compte tenu des résultats obtenus lors de la caractérisation des souris ΔCat, l'activation de la voie Wnt/ßcaténine semble jouer un rôle important dans le contrôle de la différenciation et/ou de la fonction des cellules de la zone glomérulée. Nous avons donc décidé d'analyser le rôle de la voie Wnt/ßcaténine sur le contrôle de la synthèse d'aldostérone *in vitro* dans les cellules H295R. Des transfections d'ARN interférants dirigés contre la ßcaténine qui est constitutivement activée dans cette lignée cellulaire et des traitements avec un inhibiteur de la voie Wnt, le PKF115-584 ont permis de montrer que la voie Wnt/ßcaténine participe au contrôle de la synthèse d'aldostérone en condition basale et en réponse à l'angiotensine II. Pour cela, la ßcaténine régule l'expression de deux enzymes de la voie de stéroidogenèse, *CYP21* et *CYP11B2* et du récepteur à l'angiotensine, *AT1R*.

D'autre part, comme les souris ΔCat présentent un hyperaldostéronisme primaire, nous nous sommes demandé si l'activation de la voie Wnt/ßcaténine peut être responsable d'un syndrome de Conn chez l'Homme. Cette hypothèse était étayée par la présence de cas d'HP décrits chez des patients atteints du syndrome héréditaire causé par une activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine (PAF) (Alexander et al., 2000; Pinés Corrales et al., 2006). Nous avons donc analysé l'expression de la ßcaténine par immunohistochimie ainsi que l'expression de ses gènes cibles en RTqPCR dans des adénomes producteurs d'aldostérone, auxquels nous avons eu accès grâce à des collaborations avec l'hôpital Cochin, l'hôpital européen Georges Pompidou et le CHU de Rouen. Ces analyses nous ont permis d'établir que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine est retrouvée dans près de 70% des tumeurs analysées. Il semble donc que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine soit une dérégulation majeure dans les syndromes de Conn et qu'elle participe directement à l'établissement du phénotype endocrinien.

<u>Article 3</u> : Analysis of the role of IGF2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. PLos ONE, 2012.

Suite au premier article, nous avons démontré que des altérations secondaires sont nécessaires pour induire la progression maligne des tumeurs cortico-surrénaliennes. La surexpression de *IGF2* qui est retrouvée dans 80% des CCS humains mais pas dans les ACS est de fait un candidat intéressant (Gicquel et al., 1997a; Liu et al., 1997). Nous avons donc croisé des souris présentant une surexpression de *IGF2* spécifiquement au niveau du cortex surrénalien, disponibles au laboratoire, avec les souris ΔCat afin de déterminer si la surexpression de *IGF2* accélère et augmente la prévalence des CCS. Au stade bénin des tumeurs, la surexpression de *IGF2* n'induit pas d'aggravation du phénotype. Dans des stades plus tardifs, elle est associée avec une augmentation de la prolifération et du score de Weiss. En effet, la surexpression de *IGF2* induit l'apparition de caractéristiques du score de Weiss tels que le haut grade nucléaire, la formation d'oédeme et une augmentation de l'index de KI67 au delà de 5%, chez les souris double-transgéniques par rapport aux souris ΔCat. Cependant, il n'y a pas de claire augmentation de la prévalence des CCS chez les souris ΔCat ;AdIgf2 par rapport aux souris ΔCat seules. La surexpression de *IGF2* ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne.

Etant donné que IGF2 ne semble pas être responsable de la progression corticosurrénalienne maligne, nous avons cherché à identifier une nouvelle altération pouvant être impliquée dans cette progression à partir de l'étude des souris ΔCat. Nous nous sommes intéressés à EZH2, une histone méthyltransférase responsable de la triméthylation de la lysine

27 de l'histone H3 (H3K27me3) dans le complexe polycomb. Nous avons alors observé qu'une surexpression de *EZH2*, qui est associée à divers cancers (Chang and Hung, 2012) est retrouvée majoritairement dans les tumeurs malignes des souris ΔCat, par rapport aux tumeurs bénignes et que ceci s'accompagne d'une augmentation globale de la marque H3K27me3 dans les tumeurs. De plus, nous avons démontré que la surexpression de *EZH2* est retrouvée dans les CCS humains. Des transfections d'ARN interférents dirigés contre EZH2 ont également permis de démontrer que EZH2 participe au contrôle du cycle cellulaire dans les H295R. L'ensemble de ces résultats fait donc de EZH2, un candidat potentiel pour la progression tumorale.

RÉSULTATS

&

DISCUSSION

Article 1 :

L'activation de la voie Wnt/ßcaténine est un oncogène surrénalien

Présentation succincte du contexte scientifique

Les carcinomes cortico-surrénaliens (CCS) sont agressifs et 30% à 40% sont métastasés au moment du diagnostic. Dans ce cas, l'exérèse chirurgicale qui reste, à ce jour, la meilleure option thérapeutique, n'est alors pas curative et les CCS étant en grande majorité résistants à la chimiothérapie, les patients sont placés sous mitotane. Le mitotane agit sur la croissance cellulaire *in vitro* dans les cellules H295R (Cerquetti et al., 2008) et *in vivo* dans des modèles de cancer surrénalien du chien (Schteingart et al., 1993). De plus, il est capable d'inhiber la production de cortisol, le stéroïde majoritairement produit par les CCS (Latronico and Chrousos, 1997), en inhibant la synthèse de stéroïdes par une action non spécifique sur la transcription des enzymes de la voie de stéroidogenèse (Lin et al., 2012). Cependant, malgré ces différentes actions *in vitro*, il ne présente qu'un effet modéré ou partiel chez 25 à 30% des patients. Bien que l'association avec des adjuvants améliore le taux de survie sans récurrence, la majorité des patients ne répond pas à ces traitements (Kirschner, 2012). Il est donc nécessaire de développer des thérapies plus ciblées de ces tumeurs en identifiant les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs à l'origine de leur développement.

De nombreuses données bibliographiques suggèrent que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine peut être impliquée dans le développement de tumeurs cortico-surrénaliennes agressives. En effet, l'activation de cette voie de signalisation contrôle la prolifération des cellules H295R (Doghman et al., 2008) et est associée avec les CCS de mauvais pronostic (Ragazzon et al., 2010). La voie Wnt/ßcaténine serait donc une candidate intéressante pour le traitement des CCS. Toutefois, il est au préalable nécessaire de confirmer son implication dans le développement tumoral. Pour cela, nous avons généré et caractérisé des souris transgéniques qui présentent une activation de la voie Wnt/ßcaténine, spécifiquement dans le cortex surrénalien, appelées les souris ΔCat.

Cette analyse avait pour but de répondre à deux questions majeures :

- L'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine dans le cortex surrénalien peut-elle induire le développement de tumeurs ?
- Est-ce que ces tumeurs progressent vers la malignité ?

Article 1 :

Constitutive ß-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development.

Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P.

Hum Mol Genet. 2010 Feb 6.

Human Molecular Genetics, 2010, Vol. 19, No. 8 **1561–1576**
doi:10.1093/hmg/ddq029
Advance Access published on January 27, 2010

Constitutive β-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development

Annabel Berthon[1,2], Isabelle Sahut-Barnola[1,2], Sarah Lambert-Langlais[1,2], Cyrille de Joussineau[1,2], Christelle Damon-Soubeyrand[1,2], Estelle Louiset[3], Mark M. Taketo[4], Frédérique Tissier[5,6,7], Jérôme Bertherat[5,6,7], Anne-Marie Lefrançois-Martinez[1,2], Antoine Martinez[1,2,†] and Pierre Val[1,2,*,†]

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France, [2]CNRS, UMR 6247, GReD, F-63177 Aubiere, France, [3]INSERM, U413, EA4310, Laboratory of Differentiation and Neuronal and Neuroendocrine Communication, University of Rouen, Mont Saint Aignan, France, [4]Department of Pharmacology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, [5]Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France, [6]INSERM, U567, Paris, France and [7]Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Paris, France

Received November 13, 2009; Revised and Accepted January 20, 2010

Adrenocortical carcinoma is a rare but aggressive cancer with unknown aetiology. Constitutive activation of β-catenin is the most frequent alteration in benign and malignant adrenocortical tumours in patients. Here, we show that constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex of transgenic mice resulted in progressive steroidogenic and undifferentiated spindle-shaped cells hyperplasia as well as dysplasia of the cortex and medulla. Over a 17 months time course, transgenic adrenals developed malignant characteristics such as uncontrolled neovascularization and loco-regional metastatic invasion. These oncogenic events were accompanied by ectopic differentiation of glomerulosa at the expense of fasciculata cells, which caused primary hyperaldosteronism. Altogether these observations demonstrate that constitutively active β-catenin is an adrenal oncogene which triggers benign aldosterone-secreting tumour development and promotes malignancy.

INTRODUCTION

Adrenal cortex tumours are classified as benign adenomas and malignant carcinomas. Adrenocortical carcinomas (ACC) are rare tumours (0.5–2 cases per million per year) but with poor prognosis (1). Clinical management of ACC relies on complete resection and adjuvant therapy with the adrenolytic compound mitotane. However half of the patients present with metastatic disease which results in 5-year survival rates of $<10\%$ (2,3). Most sporadic adrenal cortex tumours appear to be monoclonal but their molecular aetiology is still unknown (4,5).

Consistent with occurrence of adrenal tumours in Beckwith–Wiedmann syndrome, the growth factor IGF2 was found up-regulated in 80–90% of ACC (6–9), suggesting that it may be involved in adrenal tumourigenesis. In agreement, growth of xenografts derived from human IGF2-overexpressing ACC cell lines, was inhibited by drugs targeting type 1 IGF receptor signalling (10). However, mouse models of IGF2 overexpression failed to develop adrenal tumours (11, and our unpublished observations). Similarly, although genetic alterations of the tumour suppressor P53 were found in ACC (12,13), P53 mutant mouse models did not develop adrenal tumours (14). These observations suggest that both factors are unlikely to play a decisive role in adrenal tumour initiation in patients, although they may be involved in tumour progression.

*To whom correspondence should be addressed at: CNRS UMR 6247, GReD, 24 avenue des Landais, 63177 Aubiere Cedex, France. Tel: +33 473407412; Fax: +33 473407042; Email: pierre.val@univ-bpclermont.fr
†The authors wish it to be known that, in their opinion, the last two authors should be regarded as joint Last Authors.

© *The Author 2010. Published by Oxford University Press. All rights reserved.*
For Permissions, please email: journals.permissions@oxfordjournals.org

Increased occurrence of adrenal tumours in patients with germinal mutations of adenomatous polyposis coli (*APC*), suggested that deregulation of the Wnt/β-catenin pathway could be involved in adrenal tumourigenesis (15).

The Wnt/β-catenin pathway is essential for embryonic development and cell renewal, but its ectopic constitutive activation is associated with cancer development in a number of tissues (16–19). Canonical Wnt signalling relies on accumulation of the multifunctional β-catenin protein which is involved in both transcriptional regulation and interaction of E-cadherins with cytoskeletal proteins. In the absence of extra-cellular Wnt ligands, β-catenin is phosphorylated on N-terminal serine/threonine residues, by a multi-protein destruction complex composed of Casein Kinase I (CKI), GSK3β, AXIN and APC. Phosphorylated β-catenin is then ubiquitinylated and degraded by the proteasome. Upon binding of Wnt ligands to the Frizzled/Lrp co-receptor, the destruction complex is inhibited and β-catenin is stabilized. It can then translocate to the nucleus where it interacts with transcription factors of the LEF/TCF family to stimulate transcription of target genes (16). Illegitimate activation of the pathway can result from mutations in *APC*, as observed in familial adenomatous polyposis (20), or mutations of the third exon of *CTNNB1 (*β-*catenin* gene) which encodes the amino-acid targets of phosphorylation by the destruction complex. These mutations prevent β-catenin phosphorylation and induce constitutive nucleo-cytoplasmic accumulation of the protein. This results in constitutive activation of β-catenin target genes and eventually tumour formation (19).

Gene inactivation experiments have shown that β-catenin was required for embryonic development and cell renewal in the adult adrenal cortex (21). In normal adult adrenals, β-catenin expression and activity were restricted to outer cortical cells that roughly corresponded to the zona glomerulosa and potential progenitor cells. In contrast, Tissier *et al*. (22) showed abnormal nucleo-cytoplasmic β-catenin staining in both ACA and ACC tissue samples (45% of all tumours). Nucleo-cytoplasmic β-catenin expression was also found with high frequency in PPNAD samples (23,24), suggesting that β-catenin activation was a common feature of different types of adrenal tumours. Interestingly, in some cases, abnormal β-catenin accumulation was associated with activating mutations in the third exon of *CTNNB1*. These mutations were found in benign and malignant tumours as well as in H295R cells, derived from a human ACC (22–25). Consistent with a causal effect of β-catenin activation in the tumorigenic process, treatment of H295R cells with an antagonist of β-catenin/Tcf interactions inhibited their proliferation (26). In contrast to other mutations that were either present in benign (*PRKAR1A* in ACA) or in malignant neoplasias (*TP53*, *IGF2* in ACC), β-catenin mutations were found with similar frequency in ACA and ACC and represented the most frequent genetic event in adrenal tumours (22). These observations suggested that β-catenin activating mutations could initiate adrenal tumorigenesis and promote progression towards malignancy.

In order to test this hypothesis, we have developed a mouse model of adrenal-restricted constitutive activation of β-catenin. These were obtained by mating *Catnb$^{lox(ex3)}$* mice with LoxP sites flanking the third exon of β-*catenin* (27) with *0.5 akr1b7:Cre mice* that express Cre recombinase in steroidogenic cells of the adrenal cortex (28). Our histological and molecular analyses show that constitutively active β-catenin is an adrenal oncogene. It triggers adrenal hyperplasia and dysplasia and promotes development of malignant tumours over a 17 months time course. Constitutive β-catenin activation also causes profound changes in cellular and zonal identity which translate into primary hyperaldosteronism. These observations establish the Wnt signalling pathway as a potential therapeutic target in patients with benign and malignant tumours with abnormal β-catenin accumulation.

RESULTS

Constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex of genetically engineered ΔCat mice

In order to assess the role of β-catenin in adrenal tumorigenesis we have developed a mouse model of constitutive β-catenin activation in the adrenal cortex. For this, Catnb$^{lox(ex3)}$ mice harbouring a floxed allele of β-catenin (27) were mated with 0.5 akr1b7:Cre mice (28) expressing the Cre recombinase in steroidogenic cells of the adrenal cortex (Fig. 1A). As expected, mice heterozygous for both loci (0.5 akr1b7:Cre/+; Catnb$^{lox(ex3)}$/+), thereafter referred to as ΔCat mice, presented recombination of the floxed β-*catenin* allele which resulted in excision of the third exon of the *Ctnnb1* gene. This was readily detected by genomic PCR (Fig. 1B top panel) and western-blotting (Fig. 1B bottom panel) on extracts from whole adrenal glands. Consistent with the published expression pattern of the Cre recombinase, recombination was not observed in the liver, ovary or testis (Fig. 1B and data not shown). Although the Cre transgene was also active in kidney glomeruli (28), we did not observe any gross structural defects in the kidneys of ΔCat mice (data not shown). The third exon of β-*catenin* encodes serine and threonine residues which are targets of phosphorylation by GSK3β (19). Deletion of this sequence results in β-catenin stabilization and has been shown to induce constitutive activation of the pathway in multiple tissues (27). We assayed activation of the Wnt/β-catenin pathway in the adrenals of ΔCat mice by measuring mRNA accumulation of *Axin2*, a direct target gene of β-catenin (29). Reverse-transcription/real-time quantitative PCR (RTqPCR) showed a significant 1.5-fold and 2.0-fold induction of *Axin2* expression in 5- and 10-month-old ΔCat adrenals, respectively (Fig. 1C). This suggested that recombination of the third exon of β-*catenin* resulted in activation of the pathway in the adrenal gland of transgenic mice. This was further analysed by immuno-histochemical detection of β-catenin on sections of wild-type and ΔCat adrenals of 5- and 10-month-old mice (Fig. 1D). β-Catenin was expressed in the outer region of the wild-type adrenal cortex which roughly corresponded to the zona glomerulosa (Fig. 1D, a–c). Higher magnification of this region (Fig. 1D, c) showed nucleo-cytoplasmic β-catenin staining, indicating activation of the pathway in that area. Five-month-old ΔCat mice already displayed a dramatic expansion of β-catenin expression domain: there was still evidence of nucleo-cytoplasmic staining in the outer

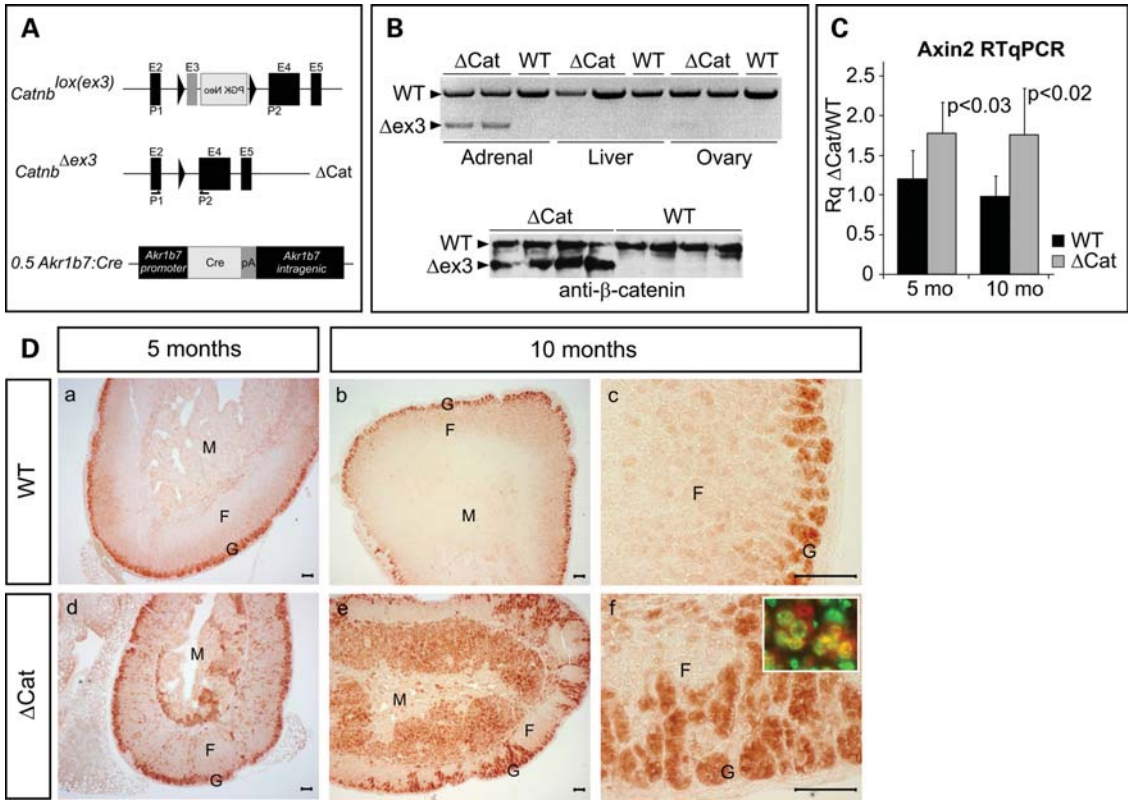


Figure 1. Adrenal-specific constitutive activation of β-catenin. (**A**) Sketching of *Catnb$^{lox(ex3)}$, recombined Catnb$^{\Delta ex3}$(ΔCat)* and *0.5 akr1b7:cre* loci. (**B**) Cre-mediated recombination of the *Catnb$^{lox(ex3)}$* locus results in the production of a truncated β-catenin protein. Top panel: genomic PCR with primers P1 and P2 (A) shows adrenal-restricted recombination of the *Catnb$^{lox(ex3)}$* locus (Δex3) in *0.5 akr1b7:cre; Catnblox(ex3)/+* mice. These will be referred to as ΔCat mice, thereafter. Bottom panel: recombination induces production of a truncated protein (Δex3) that can be readily detected by western blotting on adrenal extracts from ΔCat mice ($n = 4$). (**C**) β-Catenin target gene *Axin2* is up-regulated in ΔCat adrenals. *Axin2* expression was evaluated by real-time quantitative PCR (RTqPCR) on mRNAs from 5- and 10-month-old wild-type (WT) and ΔCat adrenals. Bars represent the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of at least six individual adrenals ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. (**D**) Nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin in the adrenal gland of ΔCat mice. Immuno-histochemistry shows nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin in the zona glomerulosa of 5 ($n = 10$) and 10-month-old ($n = 10$) wild-type adrenals (a–c). Nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin gradually progressed throughout the cortex and at the cortex/medulla boundary in ΔCat adrenals (d–f). Inset in (f) shows immunofluorescent detection of β-catenin (red) in the inner adrenal cortex merged with nuclear Hoechst staining (green). Yellow colour confirms nuclear accumulation of β-catenin in some cortical cells. G, zona glomerulosa; F, fasciculata; M, medulla. Scale bar: 50 μm.

cortex but β-catenin-positive cells were also found scattered throughout the cortex and in clusters at the boundary between the cortex and medulla (Fig. 1D, d). This phenotype amplified over time and by 10 months whole areas of the cortex and most of the central region of the adrenal harboured cells expressing high levels of β-catenin (Fig. 1D, e). Most of these cells had nucleo-cytoplasmic β-catenin staining (Fig. 1D, f, inset), consistent with constitutive activation of the pathway. This phenotype was bilateral and totally penetrant although individual differences in the severity could be observed, especially at late stages (data not shown and Supplementary Material, Fig. S4). Males consistently showed slower progression of the disease compared with females (data not shown). Unless otherwise stated, experiments presented in this manuscript were conducted on female mice. Consistent with the dominant effect of the mutation (27), zygosity of the *Catnb$^{lox(ex3)}$* locus had no obvious effect on the extent of β-catenin activation as evaluated by immunohistochemistry and *Axin2* expression (data not shown). We thus concluded that mating of *Catnb$^{lox(ex3)}$* with *0.5 akr1b7:Cre mice* resulted in an efficient constitutive activation of the Wnt/β-catenin pathway in the adrenal of transgenic offspring.

Constitutive activation of β-catenin induces adrenal hyperplasia and dysplasia

We then analysed the effect of this activation on adrenal morphology by hematoxylin/eosin staining on sections of ΔCat adrenals at five ($n = 20$) and 10 months ($n = 30$) (Fig. 2A). Five-month-old ΔCat adrenals showed accumulation and infiltration of fibroblast-like spindle-shaped cells originating from the outer cortex (Fig. 2A, c and g, arrows). We also observed few clusters of cells with histological features of spongiocytes (Fig. 2A, k, eosinophilic cells, white arrowheads) inside the adrenal medulla that could be distinguished from chromaffin cells (Fig. 2A, k, black arrowheads). These features were never observed in stage-matched control adrenals (Fig. 2A, a). One prominent phenotype of 10-month-old ΔCat adrenals was pronounced accumulation of spongiocytes inside the central area of the cortex (Fig. 2A, d–f, j, l–m white arrowheads). This resulted in structural disruption of the adrenal

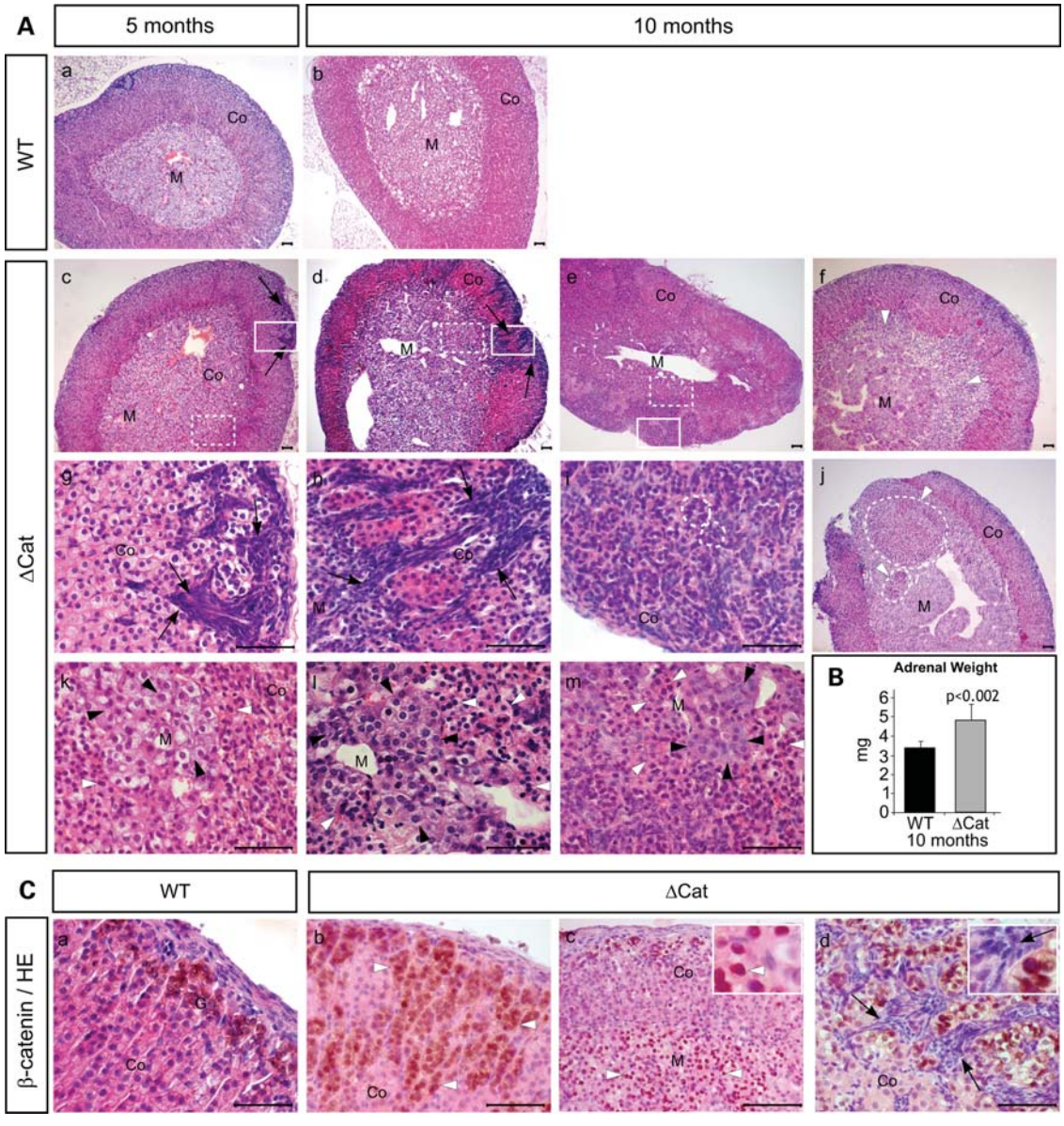


Figure 2. Constitutive activation of β-catenin induces adrenal hyperplasia and dysplasia. (**A**) Hematoxylin/eosin staining of adrenals at different stages. (a–b) Wild-type adrenals at 5 ($n = 20$) and 10 months ($n = 30$). (c–m) ΔCat adrenals. Arrows point at spindle-shaped cells that invade the cortex from outer cortical areas, in ΔCat adrenals. White arrowheads point at spongiocytes that accumulate in the central area of the gland. Black arrowheads point at chromaffin cells. Dashed circles highlight tumour masses in the cortex and medulla of ΔCat adrenals (i and j). (g–i) Higher magnification of the cortical areas highlighted by white box in (c–e). (k–m) Higher magnification of central areas highlighted by dashed white box in (c–e). (f and j) Adrenals from two other 10-month-old ΔCat mice. Scale bar: 50 μm. (**B**) Adrenal weight is increased in 10-month-old ΔCat mice. Left adrenals were weighed after dissection of peri-adrenal adipose tissue. Bars represent the mean value of six adrenals in WT (black bar) and ΔCat (grey bars) mice ± standard deviation. *P*-value was determined by Student's *t*-test. (**C**) Hematoxylin/eosin counter-staining after immunohistochemical detection of β-catenin. β-Catenin is accumulated in cells with features of spongiocytes (white arrowheads) in both the cortex (b) and central region of the adrenal (c, inset, white arrowhead) in ΔCat mice. In contrast, invasive spindle-shaped cells do not accumulate β-catenin (d, inset, arrows). Scale bar: 50 μm.

medulla (Fig. 2A, d–f, j, l–m, black arrowheads) and in some individuals, formation of tumour masses (Fig. 2A, j, dashed circles). Cortical features showed a higher degree of variability. In some individuals fibroblast-like cells invaded the entire span of the cortex from the outer cortical area and accumulated at the cortex/medulla boundary (Fig. 2A, d, h, arrows). In others, compact rounded cells with dense nuclei accumulated as numerous clusters of nodules in the cortex, disrupting its trabecular organization (Fig. 2A, e and i, dashed circles). Despite this histological variability, the adrenal cortex was always dysplastic and hyperplasia, characterized by a 1.5-fold increase in adrenal weight, was a prominent feature of the phenotype at this stage (Fig. 2B). Altogether these observations showed that constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex resulted in progressive dysplasia and hyperplasia of the adrenal cortex and medulla. In later stages these profound disruptions of adrenal architecture induced formation of nodular tumour masses in both the cortex and medulla.

We then evaluated the direct contribution of β-*catenin* expression to the induced phenotypic changes by detection of β-catenin by immunohistochemistry, followed by hematoxylin–eosin staining (Fig. 2C). As expected, both hyperplastic invasive cells with spongiocytic appearance and the smaller cells with dense nuclei that formed nodules in 10-month-old adrenals accumulated nuclear β-catenin (Fig. 2C, b and c, white arrowheads). Surprisingly though, fibroblast-like cells that accumulated at earlier stages were devoid of β-catenin (Fig. 2C, d, arrows). This suggested that the effect of β-catenin on induction of hyperplasia could be both direct and indirect.

Identification of hyperplastic cells in ΔCat adrenals

Identity of hyperplastic cells was determined by immunohistochemistry for Sf-1, a marker of steroidogenic differentiation (30) (Fig. 3A, a–d). As expected, Sf-1 was expressed in all cortical cells in wild-type adrenals and was excluded from adrenal medulla (Fig. 3A, a and b). In contrast, Sf-1-positive cells with features of spongiocytes were found in the central adrenal area in 5-month-old ΔCat mice (Fig. 3A, c, white arrowheads). This cell population expanded and colonized most of the central adrenal region by 10 months (Fig. 3A, d, white arrowheads). Interestingly, invasive fibroblast-like basophilic cells found in ΔCat adrenals were negative for Sf-1 expression (Fig. 3A, d, black arrows). Sf-1-negative cells with similar histological features were proposed to play an essential role in tumorigenesis in mouse and ferret models of castration-induced adrenal neoplasia (31). One molecular characteristic of these cells was expression of the transcription factor Gata4 which was also overexpressed in human adrenal cancer (32). As previously published, Gata4 was barely detectable in adult wild-type adrenals (Fig. 3A, e–f). Strikingly, Gata4 was strongly expressed in some but not all the spindle-shaped cells that invaded the adrenal cortex of ΔCat mice (Fig. 3A, g and h, black arrows). We thus concluded that β-catenin constitutive activation resulted in adrenal hyperplasia by at least two distinct mechanisms: expansion of outer cortical spindle-shaped cells (Sf-1 negative, Gata4 positive or negative) and accumulation of ectopic steroidogenic cells (Sf-1 positive, Gata4 negative) in the central region of the gland. This area is normally occupied by chromaffin cells that form the adrenal medulla. These could easily be identified in wild-type adrenals by Tyrosine Hydroxylase (TH) expression (Fig. 3A, i and j). In contrast, adrenal medulla architecture was completely disrupted in 10-month-old ΔCat mice: chromaffin cells were scarce and formed small clumps of cells (Fig. 3A, l, black arrowheads) interspersed with large areas of ectopic steroidogenic cells (Fig. 3A, l, white arrowheads). Immuno-histochemical analysis of cleaved Caspase 3 expression demonstrated the presence of apoptotic cells (Fig. 3B, b, black arrowheads) in the central adrenal region of ΔCat but not wild-type (Fig. 3B, a) 10-month-old mice. Most of these cells had histological features of chromaffin cells. This suggested that constitutive activation of β-catenin, through accumulation of ectopic steroidogenic cells, indirectly resulted in adrenal medulla dysplasia and chromaffin cell death.

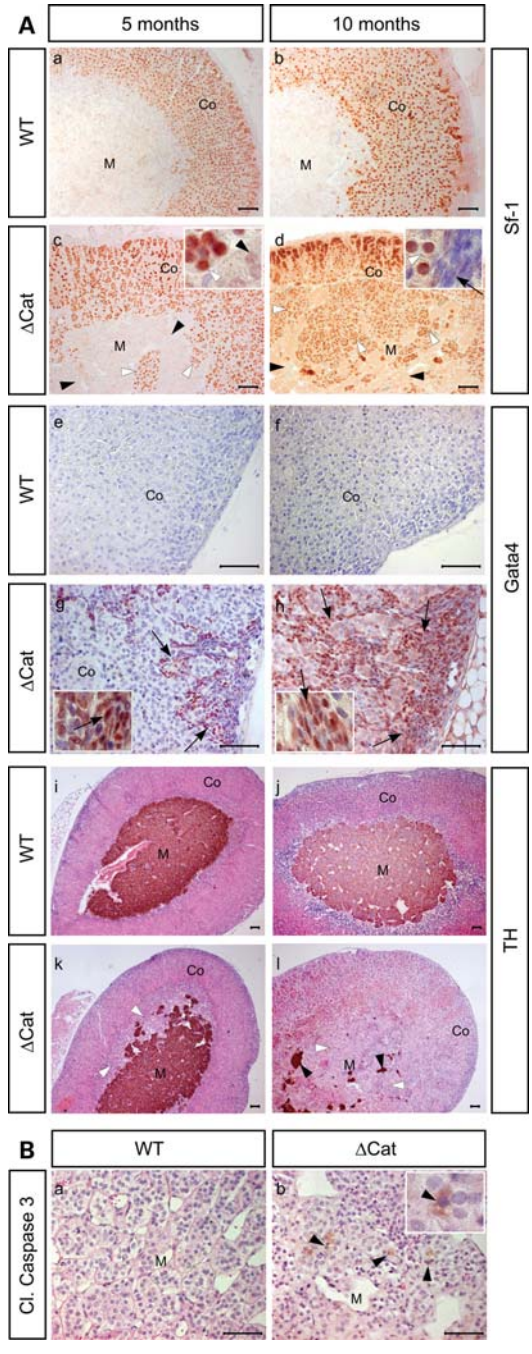


Figure 3. Identity of hyperplastic cells in ΔCat adrenals. (**A**) Analysis of Sf-1, Gata4 and TH expression. Immunohistochemical detection of Sf-1 (a–d) shows that invasive spongiocytes (white arrowheads) have a steroidogenic identity (c–d). In contrast, invasive spindle-shaped cells do not express Sf-1 (d, arrows). Insets show higher magnification pictures of spongiocytes (c) and spindle-shaped cells (d). A subset of the spindle-shaped cells expresses Gata4 (brown staining on hematoxylin counterstaining), a proposed marker of malignancy in the adrenal (e–h, arrows). Insets show higher magnification pictures of spindle-shaped cells in 5- (g) and 10- (h) month-old ΔCat adrenals. Immunohistochemical detection of tyrosine hydroxylase (TH) shows progressive disruption of medullary organization (black arrowheads) as invasion by spongiocytes (white arrowheads) proceeds (i–l). Scale bar: 50 μm. (**B**) Apoptosis in the central adrenal region. Cleaved Caspase 3, a marker of apoptosis, is expressed in cells with histological features of chromaffin cells (black arrowheads) in the central adrenal region of 10-month-old ΔCat (b) but not wild-type adrenals (a). Inset shows a high magnification picture of an apoptotic nucleus.

Constitutive activation of β-catenin induces adrenal hyperproliferation

The role of proliferation in the establishment of the hyperplastic and dysplastic phenotypes was analysed by immunohistochemistry for Ki67 (Fig. 4A). These experiments showed that proliferation was significantly increased in the central area of 5-month-old ΔCat adrenals but not in the cortex (Fig. 4A, a and c, Fig. 4B). In contrast, 10-month-old adrenals displayed increased proliferation in both areas (Fig. 4A, b and d), although inter-individual variability resulted in decreased significance ($P < 0.1$) in Student's *t*-test (Fig. 4B). We then sought to determine identity of proliferating cells by double immuno-histochemistry for Ki67 and β-catenin (Fig. 4C, a–d) in 10-month-old adrenals. These experiments showed that a small proportion of proliferative cells in the cortex was positive for β-catenin expression in wild-type adrenals (Fig. 4C, a, white arrowheads, $20 \pm 9\%$ of Ki67-positive cells also expressed β-catenin). The number of double-positive cells significantly increased in the cortex (Fig. 4C, b, white arrows, $31 \pm 10\%$ double-labelling, $P < 0.009$ in Student's *t*-test) and central area of ΔCat adrenals (Fig. 4C, d, white arrows, $20 \pm 6\%$ double-labelling), although the majority of Ki67-positive cells did not express β-catenin (Fig. 4C, b and d, white arrowheads). These observations suggested that constitutive activation of β-catenin stimulated proliferation in the adrenal through both cell-autonomous and non-cell-autonomous effects. Co-labelling for Ki67 and Sf-1 at the same stage, showed that most proliferative cells in the wild-type adrenal cortex were steroidogenic (Fig. 4C, e, white arrows, $68 \pm 15\%$ of Ki67-positive cells also expressed Sf-1). In ΔCat adrenals, although proliferation was increased in the cortex (Fig. 4B), the cortical proportion of proliferative Sf-1-positive cells was not significantly altered (Fig. 4C, f, white arrows $68 \pm 15\%$) compared with wild-type (Fig. 4C, e, $65 \pm 16\%$). This suggested that constitutive activation of β-catenin in steroidogenic cells could stimulate proliferation of non-steroidogenic cells in the cortex. In contrast to wild-type adrenals in which all Ki67-positive cells in the medulla did not express Sf-1 (Fig. 4C, g, white arrowheads), some of the proliferative cells found in the central area of the gland in ΔCat mice were steroidogenic (Fig. 4C, h, white arrows). This showed that constitutive activation of β-catenin stimulated proliferation of ectopic steroidogenic cells in the adrenal medulla.

β-Catenin has been shown to directly stimulate transcription of the G1/S transition *CyclinD1* (33). Accordingly, *CyclinD1* mRNA accumulation was significantly up-regulated in 5- and 10-month-old ΔCat adrenals (Fig. 4D). This indicated that the proliferative effect of β-catenin activation in the adrenal cortex could be mediated by increased *CyclinD1* expression.

Changes of cellular identity upon β-catenin activation

One frequent feature of tumour development is the loss of cell differentiation that can be associated with cell identity changes. We thus investigated the effect of β-catenin constitutive activation on adrenal differentiation by co-immunohistochemistry for β-catenin and Sf-1 in 10-month-old mice. In both wild-type and ΔCat adrenals all cells positive for β-catenin also expressed Sf-1 (Fig. 5, a–c). However, as already shown in Figures 1 and 2, β-catenin positive cells were found in all areas of the cortex and medulla in ΔCat adrenals (Fig. 5, b and c, white arrows). These observations showed that ectopic β-catenin activation was not antagonizing the initial step of steroidogenic cell differentiation, characterized by *Sf-1* expression. We then analysed co-expression of Sf-1 and Akr1b7, a zona fasciculata differentiation marker (Fig. 5, d–f). In wild-type adrenals, Akr1b7 was expressed in all Sf-1-positive cells of the fasciculata (Fig. 5D). In contrast, there were very few cells expressing Akr1b7 in ΔCat adrenals, despite normal Sf-1 expression in the cortex (Fig. 5, f, white arrows). This suggested that ectopic β-catenin activation in the zona fasciculata was preventing steroidogenic differentiation of the zone. We tested this hypothesis by performing co-immunohistochemistry for β-catenin and Akr1b7. In animals with milder phenotypes, most cortical cells positive for β-catenin did not express Akr1b7 (Fig. 5, h and i, white arrowheads). However, cells with expression of both β-catenin and Akr1b7 were present in the cortex and central region (Fig. 5, h and i, white arrows). In animals with advanced phenotypes, the two markers became mutually exclusive in all areas of the gland (Fig. 5, j and k). This showed that ectopic β-catenin activation could progressively inhibit zona fasciculata differentiation. Wnt4 has been shown to be required for differentiation of the zona glomerulosa (34). This suggested that β-catenin may play a role in the differentiation of this cortical zone. Consistent with this idea β-catenin expression overlapped with expression of aldosterone synthase (Cyp11b2) in wild-type adrenals (Fig. 5, n, white arrows). This overlap was still evident in the zona glomerulosa of ΔCat adrenals (Fig. 5, o, white arrows). However, numerous Cyp11b2 and β-catenin-positive cells were ectopically located in the zona fasciculata (Fig. 5, m and o, white arrows) and in the central region of the gland (Fig. 5, m and p, white arrows). Altogether, these observations showed that constitutive activation of β-catenin in the whole cortex had a profound impact on adrenal differentiation and resulted in the development of an ectopic zona glomerulosa at the expense of zona fasciculata.

β-Catenin activation induces hyperaldosteronism

In agreement with histological data, there was an almost 3-fold increase in plasma aldosterone concentration although it was within normal range in 5-month-old mice (Fig. 6A). This was consistent with a 3-fold increase in Cyp11b2 accumulation in whole adrenal protein extracts at 10 months (Fig. 6B). There was a concomitant significant decrease in plasma renin concentration in 10-month-old ΔCat mice (8 ± 1.6 pg/l versus 21 ± 13 pg/l, $n = 6$, $P < 0.05$ in Student's *t*-test). This observation confirmed that abnormal adrenal function was causing primary hyperaldosteronism in ΔCat mice. Surprisingly, corticosterone concentration was unaffected (Fig. 6C). Ectopic accumulation of steroidogenically competent zona fasciculata cells could account for this unexpected result. Consistent with this idea some of the ectopic

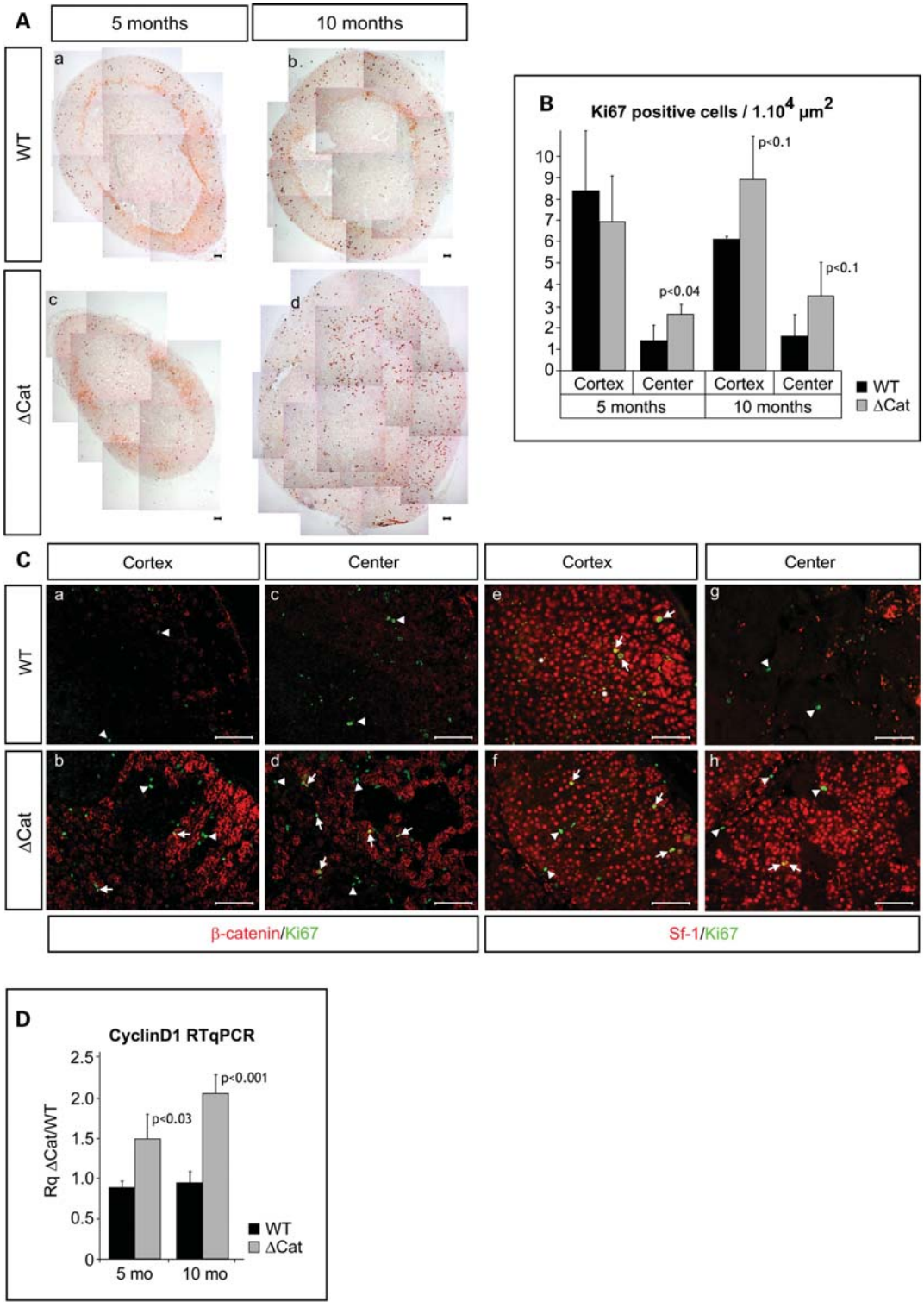


Figure 4. Constitutive activation of β-catenin induces adrenal hyperproliferation. (**A**) Increased Ki67 staining in ΔCat adrenals. Expression of the proliferation marker Ki67 was detected by immunohistochemistry in wild-type and ΔCat adrenals at 5 and 10 months. Pictures show scaled reconstitutions of whole adrenals. Note the increase in adrenal size at 10 months. Scale bar: 50 μm. (**B**) Quantification of proliferation. Ki67 positive cells were counted in four individuals of each genotype at 5 and 10 months. Countings were conducted separately in the cortex and central adrenal area. Bars represent the mean number of Ki67 positive cells per 1.10^4 μm^2 ± standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test. (**C**) Identity of proliferative cells in 10-month-old adrenals. Ki67 was co-immunodetected with β-catenin (a–d) and Sf-1 (e–h). Arrows highlight cells with double-labelling, arrowheads highlight cells with single Ki67 labelling. Asterisks point out non-specific fluorescence from erythrocytes. Scale bar: 50 μm. (**D**) CyclinD1 is up-regulated in ΔCat adrenals. *CyclinD1* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from 5- and 10-month-old wild-type and ΔCat adrenals. Bars represent the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of at least six individual adrenals ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.

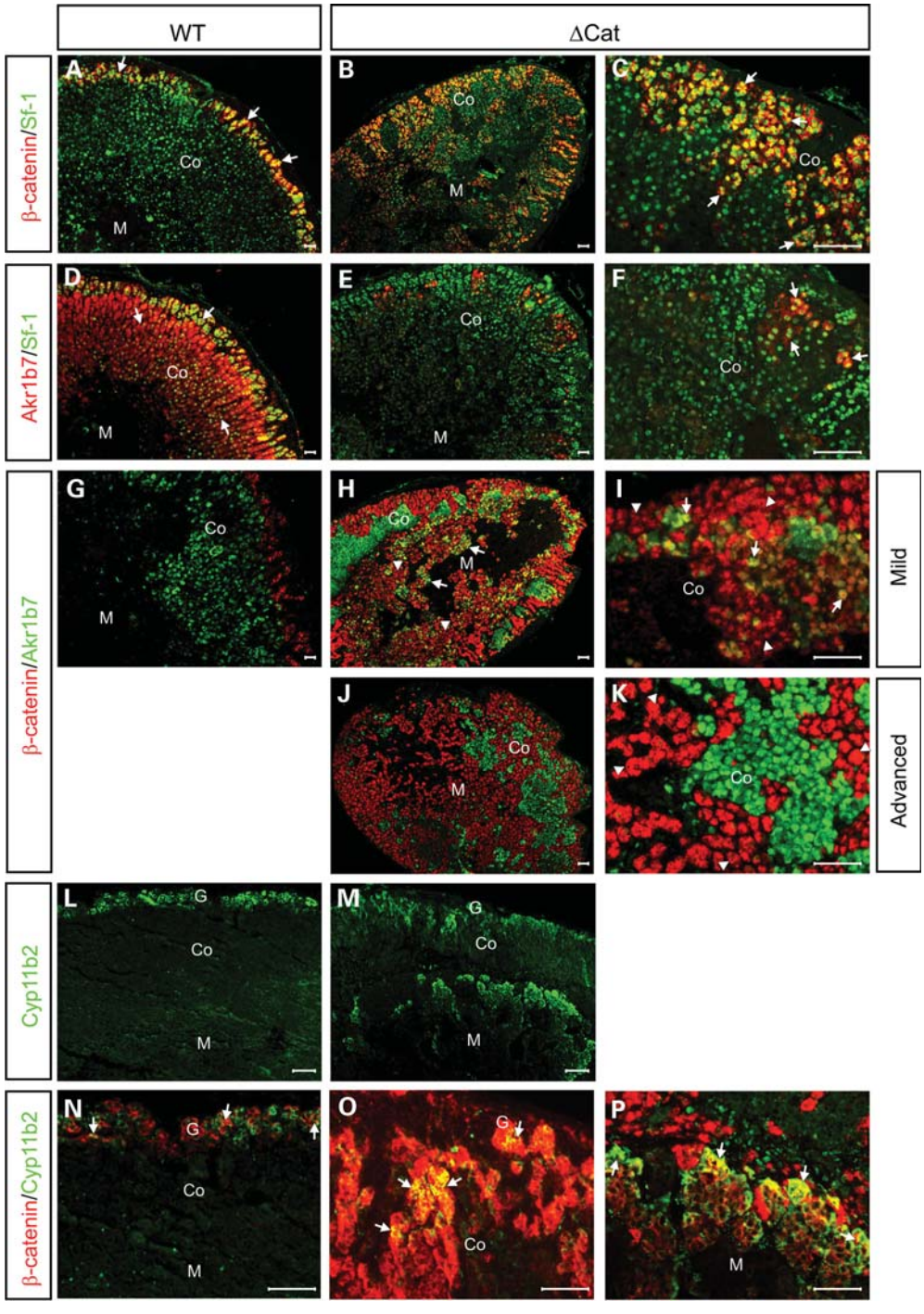


Figure 5. Changes of cellular identity upon β-catenin activation. (**A**–**C**) β-Catenin activation does not prevent initial steroidogenic differentiation. Co-immunohistochemistry for β-catenin (red) and Sf-1 (green) on 10-month-old adrenals sections shows that all cells expressing β-catenin also express Sf-1 (arrows). Note that while accumulation of β-catenin is restricted to zona glomerulosa in wild-type adrenals (A), it spreads throughout the cortex and medulla in ΔCat adrenals (B and C). (**D**–**F**) ΔCat adrenals have decreased expression of the zona fasciculata marker Akr1b7. Co-immunohistochemistry for Akr1b7 (red, cytoplasmic) and Sf-1 (green, nuclear) shows co-localization of the two markers in the zona fasciculata in wild-type adrenals (D, arrows). In contrast, most Sf-1-positive cells are negative for Akr1b7 expression in ΔCat adrenals (E and F). (**G**–**K**) β-Catenin accumulation progressively prevents fasciculata differentiation. In wild-type adrenals, β-catenin (red) and Akr1b7 (green) expression domains are mutually exclusive (G). In 10-month-old ΔCat adrenals with a mild phenotype (H and I), some cells co-express Akr1b7 and β-catenin in the zona fasciculata (H and I, arrows), although most cells either express β-catenin or Akr1b7 (H and I, arrowheads). In ΔCat adrenals with an advanced phenotype (J and K) the two markers become mutually exclusive in all areas of the gland (arrowheads). (**L** and **M**) Differentiation of an ectopic zona glomerulosa in ΔCat adrenals. Cyp11b2 is expressed in the zona glomerulosa of wild-type adrenals (L). Cyp11b2 expression is also found in the cortex and central area of the adrenal in ΔCat mice (M). (**N**–**P**) β-Catenin accumulation is responsible for ectopic glomerulosa differentiation. β-Catenin (red) and Cyp11b2 (green) are co-expressed in wild-type zona glomerulosa (N, arrows). In ΔCat adrenals, ectopically located Cyp11b2-positive cells in the cortex (O) and in the central area of the gland (P), also co-express β-catenin (arrows). Co, cortex; M, medulla; G, zona glomerulosa. Scale bar: 50 μm.

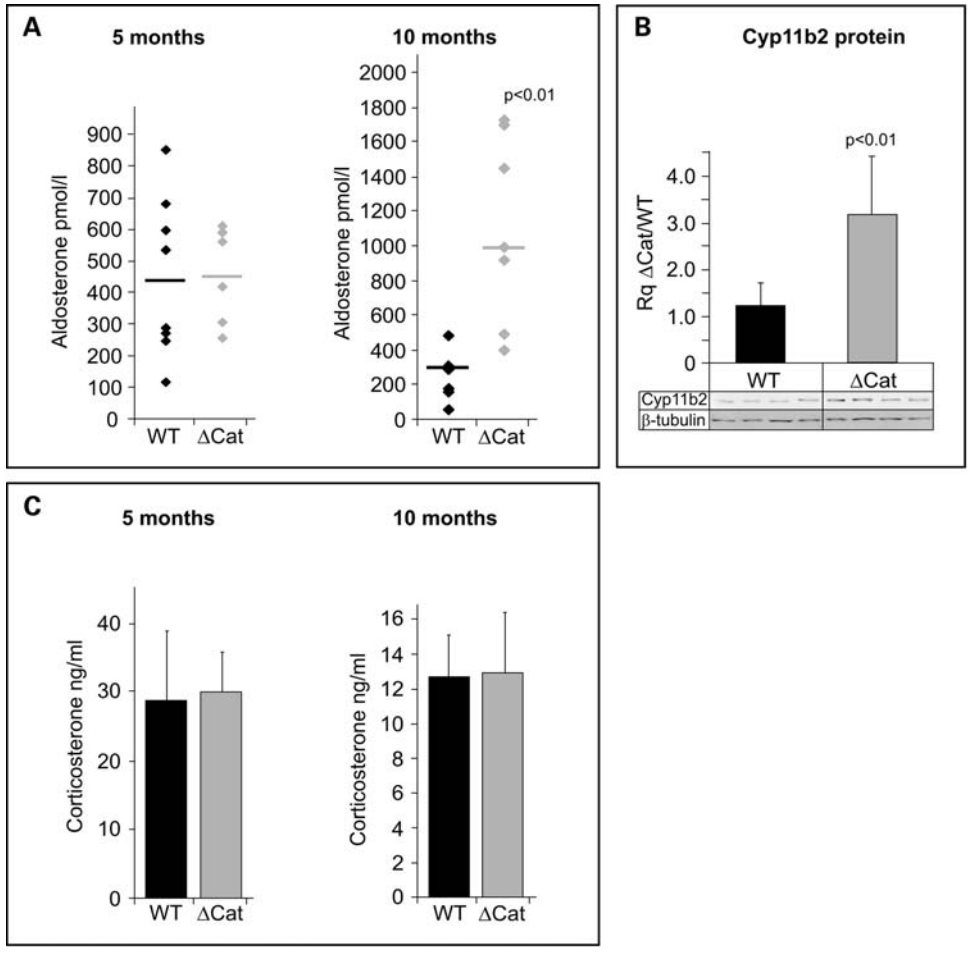


Figure 6. β-Catenin activation induces hyper-aldosteronism. (**A**) Aldosterone concentration is increased in 10-month-old ΔCat mice. Plasma aldosterone concentrations were measured by RIA in 5- and 10-month-old wild-type and ΔCat mice. Each individual value was plotted on the graph. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. (**B**) Cyp11b2 expression is increased in 10-month-old ΔCat mice. Cyp11b2 protein expression was measured by western blotting and normalized to β-tubulin (blots of four individuals in each group). Graph shows the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of Cyp11b2 expression in four adrenals of each genotype, normalized to expression of β-tubulin. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. (**C**) Corticosterone concentration is unaltered in ΔCat mice. Plasma corticosterone concentrations were measured by RIA in 5- and 10-month-old wild-type and ΔCat mice. Bars represent the mean corticosterone concentration of at least eight individuals in each group.

spongiocytes in the central adrenal area expressed 3βHSD (Supplementary Material, Fig. S1, a–d, white arrowheads) and Akr1b7 (Supplementary Material, Fig. S1, e–h, white arrowheads). Another non-exclusive possibility was that the remaining fasciculata cells had increased steroidogenic capacity. These two hypotheses were somewhat corroborated by increased accumulation of the transcripts for *StAR*, *Hsd3b1* and *Cyp21a1* in whole mRNA extracts from ΔCat adrenals, although overall accumulation of *Cyp11b1* and *Akr1b7* was decreased (Supplementary Material, Fig. S2 A and B). Surprisingly, *Cyp11b2* mRNA accumulation was not altered (Supplementary Material, Fig. S2 A and B). This suggested that increased Cyp11b2 protein accumulation may result from a post-translational effect of β-catenin activation. We concluded that constitutive activation of β-catenin in the adrenal resulted in primary hyper-aldosteronism through differentiation of an ectopic zona glomerulosa and increased Cyp11b2 expression.

β-Catenin activation induces anarchic vascularization in the adrenal cortex

Anarchic vascularization is frequently observed in malignant adrenal tumours and is known to play a role in tumour progression in various tissues (35,36). The adrenal vascular network was assessed by immuno-histochemistry for Pecam/CD31, an endothelial cells marker. In 10-month-old control mice, vasculature was organized centripetally in the cortical area (Fig. 7A, a). In ΔCat adrenals the number of CD31-positive cells was dramatically increased. These formed numerous clusters that severely compromised the centripetal organization of the network (Fig. 7A, b). In human adrenal carcinoma, the pro- and anti-angiogenic factors VEGF-A and Thrombospondin-1 (TSP-1) are up and down-regulated, respectively (37). Interestingly, *VEGF-A* is a direct target of β-catenin in some tissues (38). This suggested that these factors may play a role in the vascular phenotype of

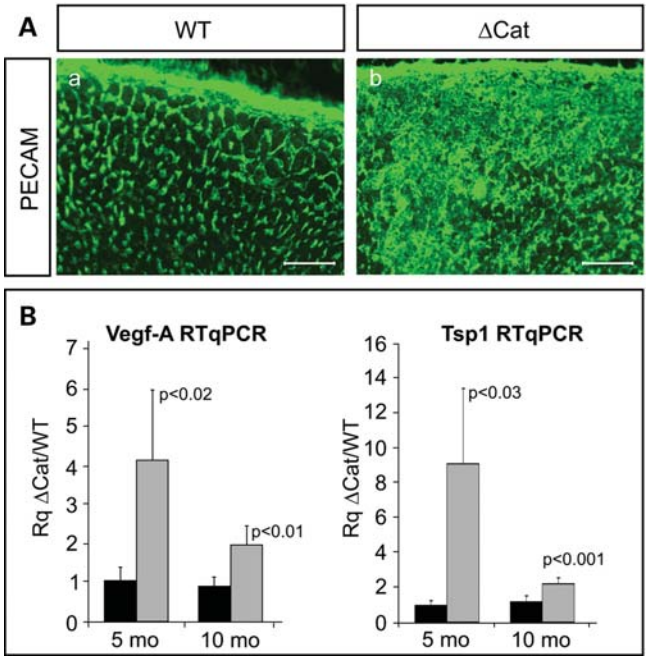


Figure 7. β-Catenin activation induces anarchic vascularization in the adrenal cortex. (**A**) Expression of Pecam/CD31. Endothelial cells marker Pecam was detected by immunohistochemistry in 10-month-old wild-type and ΔCat adrenals. Scale bar: 50 μm. (**B**) Expression levels of *Vegf-A* and *Thrombospondin 1* are increased in ΔCat adrenals. *Vegf-A* (left panel) and *Thrombospondin-1* (*Tsp1*, right panel) expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from 5- and 10-month-old wild-type and ΔCat adrenals. Bars represent the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of at least six individual adrenals ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. Black bars, wild-type; grey bars, ΔCat.

ΔCat mice. Indeed, *Vegf-A* mRNA accumulation was dramatically increased in 5 and to a lesser extent, 10-month-old ΔCat adrenals (Fig. 7B). *Tsp-1* initially followed a similar trend (Fig. 7B), although its expression levels returned to normal in 18-month-old ΔCat adrenals (Supplementary Material, Fig. S3A) in which *Vegf-A* was still over-expressed (Supplementary Material, Fig. S3B). Altogether these results suggested that up-regulation of *Vegf-A* in the adrenals of 10 and 18-month-old ΔCat mice, resulted in the formation of an anarchic vascular network. Increased *Tsp-1* expression at 10 months may reflect initial resistance of the tissue to the pro-angiogenic effect of *Vegf-A*. The later decrease is either the consequence of a disruption of resistance mechanisms or the reflection of the advanced tumour status.

β-Catenin activation promotes adrenal carcinoma development in ageing mice

Altogether, our results showed that constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex led to severe defects in the organization, proliferation, differentiation and vascularization of the gland. However, its impact on carcinogenesis had yet to be elucidated. The presence of malignant characteristics in 10-month-old ΔCat adrenals, although histological features were mostly benign (Weiss score ≤ 2), prompted analysis of mutant adrenals in 17-month-old animals. Consistent with our analysis at earlier stages, none of the 10 analysed males had obvious features of malignancy, although they had signs of adrenal hyperplasia (data not shown). Out of nine analysed females (Supplementary Material, Fig. S4A), two had overt features of adrenal carcinoma with massive tumour masses (Fig. 8d, individual #65, 300mg versus 4.5 ± 1 mg in controls) spreading into the peritoneal cavity and signs of vascular invasion (Fig. 8b, adrenal #65a, arrowhead). In one animal, tumour masses were bilateral (Supplementary Material, Fig. S4A), whereas in the other, the left contralateral adrenal showed a moderate increase in size (Fig. 8e, adrenal #65b, 33 mg versus 4.5 ± 1 mg). Hematoxylin/eosin staining of the strongly hyperplastic adrenal #65a showed complete disruption of both cortical and medullary structures (Fig. 8h). The tumour was composed of densely packed cells with basophilic nuclei. Cells at the periphery of the tumour were mostly organized as concentric layers, whereas cells in internal regions of the tissue formed small clusters surrounded by a dense vascular network (Supplementary Material, Fig. S4B, b). Most cells in the tumour expressed very low levels of Sf-1 (Fig. 8l) and barely accumulated β-catenin (Fig. 8p), but had a very high proliferation rate as revealed by a 16% labelling index for Ki67 (Fig. 8t). This suggested that the tumour mass originated from undifferentiated adrenal cells, the proliferation of which, had indirectly been stimulated by constitutive β-catenin activation. In contrast, the contralateral adrenal #65b was mostly composed of spongiocytes and spindle-shaped subcapsular cells (Fig. 8i). Most cells in this adrenal expressed Sf-1 (Fig. 8m) and β-catenin (Fig. 8q), although Sf-1 expression in the innermost cortical cells was low when compared with wild-type (Fig. 8k). As expected, proliferation was rather low with a 2.5% Ki67 labelling index (Fig. 8u). Interestingly, although adrenal from individual #66 was relatively small (Fig. 8f, 10 mg), adrenal capsule was ruptured (Fig. 8j, arrowhead) and compact cells with basophilic nuclei (Supplementary Material, Fig. S4B, c) invaded adjacent adipose tissue. These cells expressed Sf-1 (Fig. 8n) but did not accumulate β-catenin (Fig. 8r). Proliferation in invasive tissue was very high with 35% of Ki67 labelling (Fig. 8v). Adrenal #66 itself was relatively normal, although some cortical cells had low Sf-1 expression (Fig. 8n). These observations suggested that in this case, constitutive activation of β-catenin had indirectly stimulated proliferation and metastasis of Sf-1 positive cells in periadrenal adipose tissue.

DISCUSSION

The molecular mechanisms involved in the initiation and progression of adrenal cortex tumours have long been unidentified. In this paper, we report analysis of a mouse model of adrenal carcinogenesis based on Cre-mediated adrenal-restricted constitutive activation of β-catenin. Our observations provide compelling evidence for a role of β-catenin as an adrenal oncogene: (a) ΔCat adrenals showed progressive steroidogenic and sub-capsular cells hyperplasia caused at least in part by hyperproliferation; (b) ectopic expansion of spongiocytes and sub-capsular cell populations resulted in cortical and medullary dysplasia. In aged animals, structural features of the adrenal were absent and tumour masses were frequent; (c) β-catenin activation caused marked

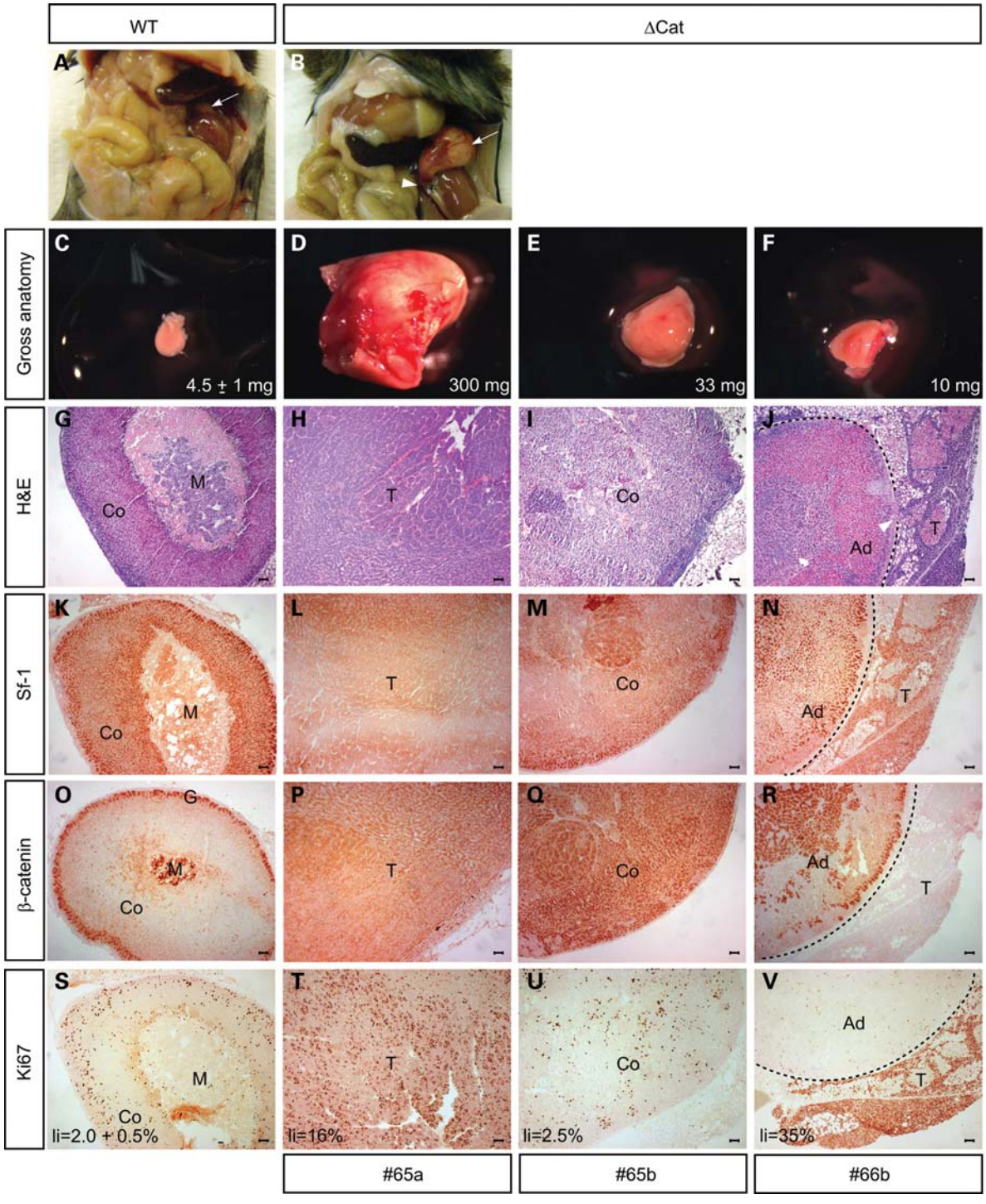


Figure 8. β-Catenin activation promotes aggressive adrenal carcinoma development in ageing mice. (**A**–**B**) Aspect of adrenals in wild-type and ΔCat mice at autopsy. Arrows, adrenal; arrowhead, vascular invasion. (**C**–**F**) Gross adrenal anatomy in a wild-type (C) and two 17-month-old ΔCat mice (D–F). Adrenal in (D) is the same as in (B) (mouse #65). Adrenal in (E) is the contralateral adrenal in mouse #65. Adrenal in (E) is from another individual (mouse #66). All pictures were taken with the same magnification. Numbers indicate mean wild-type adrenal weight ± standard deviation ($n = 6$) or individual ΔCat adrenal weight. (**G**–**J**) Hematoxylin/eosin staining of sections through corresponding adrenals in (C–F). Dashed line in (J) highlights the separation between adrenal (Ad) and invasive tumour tissue (T). Arrowhead points at the ruptured adrenal capsule. (**K**–**N**) Immunodetection of Sf-1. Note that most cells in (L) have no or low Sf-1 expression. Tumour tissue (T) in (N) has strong Sf-1 expression, indicating that invasive cells are of adrenal origin. (**O**–**R**) Immunodetection of β-catenin. β-Catenin expression is rather low in the massively hyperplastic adrenal #65a (P), compared with contralateral adrenal #65b (Q). Although β-catenin is accumulated throughout the cortex and medulla in adrenal #66 (R), there is no β-catenin expression in the surrounding invasive adrenal tumour tissue. (**S**–**V**) Immunodetection of Ki67. Ki67 labelling index (li) in 17-month-old adrenals is 2.0 ± 0.5% (S). Proliferation is strongly increased in adrenal #65a (T, 16%) and in the invasive tumour tissue surrounding adrenal #66 (V, 35%). There is only a mild increase in proliferation in adrenal #65b (U, 2.5%). Co, cortex; M, medulla; Ad, adrenal; T, tumour tissue. Scale bar: 50 μm.

differentiation defects characterized by ectopic zona glomerulosa differentiation and dedifferentiation of the orthotopic zona fasciculata. This resulted in primary hyperaldosteronism in 10-month-old mice; (d) ΔCat mice developed malignant characteristics such as uncontrolled neovascularization and local invasion over a 17 months time course.

To our knowledge, this is the first demonstration of a role of β-catenin in adrenal tumourigenesis. The relatively slow progression of adrenal disease and low penetrance of the malignant phenotype in aged ΔCat mice may seem at odds with the supposed effect of β-catenin as an oncogene. However, most mouse models of ectopic β-catenin activation or *APC* inactivation essentially develop benign tumours that can acquire a malignant phenotype only after a second genetic hit as occurred (39). A good example of this two step model for β-catenin-induced tumourigenesis, is the essential role of KRAS activation which is required for β-catenin nuclear localization and malignant progression of intestinal polyps, following loss of *APC* (40). The broad range of abnormal adrenal phenotypes in 17-month-old ΔCat adrenals is consistent with the idea that constitutive activation of β-catenin initiates benign tumour development but is not sufficient to trigger malignant evolution. However, it establishes a cellular context which is prone to the accumulation of aggressive secondary alterations. This is in perfect agreement with the clinical observation that β-catenin activating mutations are recorded at similar frequencies in benign and malignant adrenal tumours (22). IGF2 is a good candidate as a secondary factor involved in malignant progression: it is almost invariably overexpressed in adrenal carcinomas (6–9) and reciprocal interactions between IGF signalling and β-catenin have been described in different cellular systems (41–44). In this context, IGF2 overexpression may account for the observed increase in nucleo-cytoplasmic staining of β-catenin in adrenal carcinomas compared with adenomas (22). Surprisingly though, we did not observe *Igf2* up-regulation in 10- (data not shown) or 17-month-old ΔCat adrenals (Supplementary Material, Fig. S4C). One possible explanation is that ΔCat adrenals did not reach a sufficient degree of malignancy to express high levels of Igf2. However, we observed overexpression of Gata4 (Fig. 3) and *Vegf-A* (Fig. 7 and Supplementary Material, Fig. S3B) as well as down-regulation of *Nov/Ccn3* and *Connexin α43* (Supplementary Material, Fig. S4C), four independent hallmarks of adrenal carcinomas (32,37,45–47). Therefore, it is likely that spontaneous overexpression of IGF2 is a specific feature of human adrenal cancer development. Accordingly, overexpression of Igf2 has never been reported in other mouse models of adrenal tumourigenesis (31,48–52). We are currently investigating this issue by mating ΔCat mice with mice that overexpress Igf2 under the control of *Akr1b7* regulatory regions.

One unexpected finding of our study is the marked primary hyperaldosteronism in 10-month-old ΔCat mice, a feature reminiscent of Conn's syndrome. This is in agreement with the recently described primary hyperaldosteronism in mice expressing a defective allele of *APC* (53). Conn's syndrome may account for up to 12% of secondary hypertension in patients (54), but its molecular aetiology is unknown. Our data strongly suggest that ectopic activation of the Wnt/β-catenin pathway can initiate Conn's syndrome development. These observations warrant thorough evaluation of Wnt/β-catenin pathway activation in patients with primary hyperaldosteronism.

Although some aldosterone-secreting carcinomas have been reported (55–58), the majority of malignant adrenal tumours are hormonally silent or secrete increased amounts of either cortisol and/or androgens (1). Up to 10 months, ΔCat mice did not show signs of increased corticosterone secretion (Fig. 6), nor did they ectopically express Cyp17 (data not shown). However, there was a trend towards increased corticosterone and decreased aldosterone plasmatic concentrations in 17 months ΔCat mice (Supplementary Material, Fig. S4A). This is in line with reports of changes in hormonal secretion profiles in evolutive Conn's tumours (55,56). This observation suggests that transient hyper-secretion of aldosterone may be a feature of malignant adrenal tumours with β-catenin activation, regardless of their hormonal status at the time of diagnosis.

Our analysis of differentiation markers expression shows that constitutive activation of β-catenin in steroidogenic cells of the adrenal result in profound adrenocortical zonation defects. Adrenal cortex zonation is characterized by establishment of the centripetal organization of three functionally and histologically distinct zones: glomerulosa, fasciculata and reticularis, from capsule to medulla. The molecular mechanisms involved in the establishment of the appropriate zonal differentiation pattern of the cortex are currently unknown (59). Ectopic activation of β-catenin throughout the cortex of ΔCat mice induces ectopic activation of the zona glomerulosa differentiation programme and inhibition of orthotopic zona fasciculata differentiation. This suggests that in wild-type adrenals, restriction of β-catenin activation to sub-capsular regions and in particular zona glomerulosa, is necessary for the establishment of cortical zonation. How this is achieved is still unclear. The Wnt family ligand Wnt4 is also expressed in the outer cortex and its genetic ablation hampers zona glomerulosa differentiation and decreases aldosterone output. However, persistence of Cyp11b2-positive cells in *Wnt4−/−* adrenals suggests that other Wnt ligands could be involved in adrenocortical zonation (34). Another non-exclusive hypothesis is the involvement of a centrifugal gradient of APC protein expression. Indeed, APC was proposed to play an essential role in metabolic zonation of the liver by preventing perivenous differentiation of periportal hepatocytes, through β-catenin inhibition (60). Whether similar mechanisms contribute to adrenal cortex zonation is currently under investigation.

Interestingly, mice with genetic ablation of the potassium channel Task1 (*Kcnk3*) also show hyperaldosteronism resulting from ectopic expression of *Cyp11b2* in zona fasciculata cells (61). Task1 is one of the background potassium channels which make membrane voltage strictly follow K^+ equilibrium potential in zona glomerulosa. Despite the overlapping phenotypes, *Task1* is unlikely to be involved in ectopic zona glomerulosa differentiation in our case, as its expression is increased in 10-month-old ΔCat adrenals (Supplementary Material, Fig. S5).

Histological analysis of ΔCat adrenals has shown centripetal invasion of the adrenal cortex by spindle-shaped cells originating from outer cortical areas. Some of these cells

expressed Gata4 (Fig. 3) but none of them expressed Sf-1 (Fig. 3), the master gene in steroidogenic differentiation. Adrenal cell renewal is thought to occur through amplification, centripetal migration and differentiation of initially undifferentiated sub-capsular mesenchymal progenitor cells (62). β-Catenin is involved in cell renewal, maintenance and commitment of progenitor cells in numerous tissues (62). It is therefore tempting to speculate that accumulation of spindle-shaped cells in ΔCat adrenals results from uncontrolled amplification of the progenitor pool. Consistent with this hypothesis, cortical cell renewal is impaired in mice with decreased β-catenin expression in the adrenal (21). One interesting aspect of this scenario is that the putative progenitors do not express β-catenin. This indicates that recruitment of these cells in response to β-catenin activation is dependent on a secondary signal. Recent genetic analyses have shown that hedgehog signalling is involved in the recruitment of adrenal progenitor cells (63). It is therefore tempting to speculate that hedgehog signalling, known to cooperate with Wnt signalling in similar processes in other tissues (64), is implicated in the accumulation of spindle-shaped cells in ΔCat adrenals.

In conclusion, we have shown that uncontrolled activation of β-catenin is an oncogenic event that triggers benign aldosterone-secreting tumour development and promotes malignancy in the adrenal. These observations support a new role for uncontrolled β-catenin activation in the development of Conn's syndrome and malignant aldosteronoma. Our observations also unveil novel functions of β-catenin in the establishment of adrenal cortex zonation and provide further data in support of a role in adrenal progenitor cells recruitment and commitment. This report establishes ΔCat mice as a good genetic model to evaluate new therapeutic options against a rare but aggressive cancer.

MATERIALS AND METHODS

Mice

All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare. ΔCat mice were generated by mating *Catnb*$^{lox(ex3)}$ mice on a C57/Bl6 background (27) with *0.5 akr1b7:Cre* mice on a mixed C57/Bl6;B6D2 background (28). Control mice originated from the same matings. They were homozygous wild-type at the *Ctnnb1* locus and indifferently positive or negative for Cre. Mice were euthanized by decapitation and blood was collected on 5 μl of 0.5 M EDTA. Adrenals were either immediately frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Genotyping was performed by PCR according to standard protocols. Excision of the third exon of β-catenin in ΔCat mice was confirmed by genomic PCR with primers Ex4 5′-GGGATGAGCAGCGTC AAACT-3′ and 523R 5′-GACACCGCTGCGTGGACAATG-3′.

Histology and immuno-histochemistry

All immunodetection procedures were carried out on an Intavis InSitu Pro VSi automated processor (Intavis AG, Germany). Immunodetection of β-catenin 1/500 (610153, BD Biosciences Pharmingen), Sf-1/Ad4BP 1/1000 (kind gift of Dr Ken Morohashi, Fukuoka, Japan), Gata4 1/200 (Sc 1237, Santa Cruz), TH 1/1000 (AB1512, Chemicon Millipore), Ki67 1/200 (RM9106-SO, Neomarkers/Interchim), Akr1b7 1/1000 (65), 3βHSD 1/1000 (kind gift of Dr Michael Thomas, Inserm U878, Grenoble, France) Cyp11b2 1/50 (Kind gift of Dr Celso Gomez-Sanchez, Jackson MS, USA) and cleaved Caspase 3 1/200 (#96615, Cell Signalling) was performed on paraffin-embedded tissues. These were prepared by fixing adrenals overnight in 4% PFA. After two washes in PBS, adrenals were dehydrated through ethanol series and incubated for 2 h in Histoclear, before inclusion in paraffin. Five micrometers sections were cut and deparaffinized in Histoclear. These were rehydrated through ethanol series. All epitopes were retrieved by 20 min boiling in sodium citrate 10 mM pH6.0 with the exception of Sf-1 which was detected after 20 min boiling in Vector Antigen Retrieval Solution (H3300, Vector Labs).

PECAM 1/50 (BD Biosciences Pharmingen) was detected on OCT-embedded tissues. These were prepared by fixing adrenals for 30 min in 4% PFA. After two washes in PBS, adrenals were successively processed for 20 min in 10, 15 and 20% sucrose solutions. After overnight incubation in a volume:volume solution of 20% sucrose:OCT, adrenals were snap frozen in OCT. Ten micrometers sections were cut and vacuum dried for 10 min. Slides were rehydrated twice in PBS and sections were post-fixed with 4% PFA for 10 min, before immuno-histochemistry processing.

Primary antibodies were detected with the appropriate secondary antibodies, coupled to biotin (1/500, Jackson Immunoresearch). Biotin was then complexed with streptavidin coupled to Horse Radish Peroxidase (HRP) (016-030-084, Jackson Immunoresearch). HRP activity was detected with the chromogenic substrate Novared (SK4800, Vector Labs).

Double-immunohistochemistry experiments were performed following a similar protocol. When the two primary antibodies were raised in different species, the two proteins were sequentially detected by amplification with TSA-Alexa488 (Molecular Probes) and TSA-Alexa555 (Molecular Probes) flurorescent HRP substrates. To avoid cross-reaction, HRP was inactivated by incubation with 0.02% HCl for 20 min after detection of the first antibody. When the two primary antibodies were raised in the same species, one primary antibody was sufficiently diluted to prevent direct immunodetection and was detected by amplification with TSA-Alexa488 or TSA-Alexa555. The other antibody was subsequently detected by direct immunofluorescence with secondary antibodies coupled to Alexa488 or Alexa555 (Molecular probes).

Hematoxyilin/eosin staining was conducted on sections of paraffin embedded tissues on a Microm HMS70 automated processor (Microm Microtech, France), according to standard procedures.

Microscope image acquisition

Images were acquired at room temperature with a Carl Zeiss Axiocam digital camera on a Zeiss Axioplan 2 microscope. Objectives used were Zeiss ×10 (0.30), ×20 (0.50), ×40 (0.75), ×63 (1.4). Image acquisition was performed with

Zeiss Axiovision. Images were minimally processed with Adobe Photoshop CS3 (global levels corrections).

Quantification of cell proliferation

In the case of young animals (5- and 10-month-old) Ki67-positive cells were counted on the entire surface of adrenal sections. This prevented biasing results with heterogenous Ki67 distribution over the gland. The number of Ki67-positive cells was then expressed relative to section surface, to account for adrenal hyperplasia in ΔCat mice. Countings were performed separately in the cortex and central region on four individuals (four sections each) for each genotype. They were expressed as means ± standard deviation.

In 17-month-old mice, the relative homogeneity of Ki67 staining in tumours allowed for a labelling index to be determined. This was evaluated by counting Ki67-positive cells in six high power field pictures (×40 magnification) for each individual tumour. This was then expressed as a percentage of the total cell count for each field. Standard deviation for wild-type animals was determined by similar countings in three individuals.

Co-labelling for Ki67 and Sf-1 or Ki67 and β-catenin was evaluated by counting double-labelled cells in six high power field pictures (40x) from three individuals of each genotype at 10 months. Results were expressed as means ± standard deviation.

Western blotting

Forty micrograms of total proteins were loaded on a 10% SDS Page gel, transferred onto nitrocellulose and detected with an antibody to β-catenin (1/1000) or Cyp11b2 (1/500). Expression of Cyp11b2 was normalized to expression of β-tubulin and signals were quantified with Quantity One (BioRad).

Reverse-transcription quantitative PCR

Frozen adrenals were disrupted in lysis buffer and total mRNAs and genomic DNA were separately extracted using the All prep DNA/RNA extraction kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. Five hundred nanograms mRNA were reverse transcribed for 1 h at 42°C with 5 pmoles of random hexamer primers, 200 units reverse transcriptase (MuMLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNAsin (N2615, Promega). A half microliter of one-tenth dilution of the cDNA was used in each quantitative PCR reaction. These were conducted with Taqman® probes of the Gene Expression Assay pool (Applied Biosystems, see below). Each reaction was performed in triplicate in a final volume of 15 μl with 0.75 μl of the appropriate 20× probe mix and 7.5 μl of PCR Mastermix (Precision, Ic., Primerdesign.co.uk). Relative mRNA accumulation was determined by the ΔΔCt method in which peptidylprolyl isomerase B was used as the normalizer and one of the wild-type samples was used as the baseline. Results were expressed as the relative mRNA accumulation in wild-type samples and represent the mean value of at least six adrenals per genotype ± standard deviation. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test. Taqman Gene expression assays probes that were used in this study were: *Axin2* Mm00443610_m1, *CyclinD1* Mm00432359_m1, *Vegf-A* Mm01281449_m1, *Tsp1* Mm0133 5418_m1, *Sf-1* Mm00446826_m1, *StAR* Mm00441558_m1, *Cyp11a1* Mm00490735_m1, *Hsd3b1* Mm00476184_m1, *Cyp21a1* Mm00487230_g1, *Akr1b7* Mm00477605_m1, *Cyp11b1* Mm01204953_gH, *Cyp11b2* Mm00515624_m1, *Connexinα43* Mm00439105_m1, *Nov* Mm00456855_m1, *Igf2* Mm00439564_m1, *Task1* Mm00807036_m1.

Hormone measurements

Plasma corticosterone and aldosterone were quantified by radio-immunoassay (RIA) using the RIA Corticosterone (3)H (MP Biomedicals) and aldosterone (3)H (Amersham, GE Healthcare) kits, according to manufacturers' instructions. Renin was quantified by direct chemiluminescence with the Liaison Direct Renin kit (Diasorin) according to manufacturer's instructions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Christine Perret for locally providing $Catnb^{lox(ex3)}$ mice, Dr Bruno Ragazzon for helpful discussions, Dr Thierry Gilbert for analysis of kidney sections and the mouse facility staff for their efficient support. They would also like to thank Professors G. Veyssière and JMA. Lobaccaro, Dr S. Baron, Dr M. Thomsen and Dr A. Swain for critical reading of the manuscript.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This project was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, grant #4964) and La Ligue Contre le Cancer, Puy de Dôme and Allier committees.

REFERENCES

1. Wajchenberg, B.L., Albergaria Pereira, M.A., Medonca, B.B., Latronico, A.C., Campos Carneiro, P., Alves, V.A., Zerbini, M.C., Liberman, B., Carlos Gomes, G. and Kirschner, M.A. (2000) Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*, **88**, 711–736.
2. Allolio, B. and Fassnacht, M. (2006) Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 2027–2037.
3. Icard, P., Goudet, P., Charpenay, C., Andreassian, B., Carnaille, B., Chapuis, Y., Cougard, P., Henry, J.F. and Proye, C. (2001) Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J. Surg.*, **25**, 891–897.
4. Bernard, M.H., Sidhu, S., Berger, N., Peix, J.L., Marsh, D.J., Robinson, B.G., Gaston, V., Le Bouc, Y. and Gicquel, C. (2003) A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 998–1001.
5. Gicquel, C., Leblond-Francillard, M., Bertagna, X., Louvel, A., Chapuls, Y., Luton, J.P., Girard, F. and Le Bouc, Y. (1994) Clonal analysis of

human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **40**, 465–477.
6. Gicquel, C., Baudin, E., Le Bouc, Y. and Schlumberger, M. (1997) Adrenal carcinoma. *Ann. Oncol.*, **8**, 1–5.
7. de Fraipont, F., El Atifi, M., Cherradi, N., Le Moigne, G., Defaye, G., Houlgatte, R., Bertherat, J., Bertagna, X., Plouin, P.F., Baudin, E. *et al.* (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**, 1819–1829.
8. 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. *et al.* (2003) Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am. J. Pathol.*, **162**, 521–531.
9. West, A.N., Neale, G.A., Pounds, S., Figueredo, B.C., Rodriguez Galindo, C., Pianovski, M.A., Oliveira Filho, A.G., Malkin, D., Lalli, E., Ribeiro, R. *et al.* (2007) Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.*, **67**, 600–608.
10. Barlaskar, F.M., Spalding, A.C., Heaton, J.H., Kuick, R., Kim, A.C., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Ben-Josef, E. and Hammer, G.D. (2009) Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**, 204–212.
11. 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**, 3115–3124.
12. Ribeiro, R.C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G., Michalkiewicz, E., Lafferty, A., Delacerda, L., Rabin, M., Cadwell, C., Sampaio, G. *et al.* (2001) An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **98**, 9330–9335.
13. Libe, R., Groussin, L., Tissier, F., Elie, C., Rene-Corail, F., Fratticci, A., Jullian, E., Beck-Peccoz, P., Bertagna, X., Gicquel, C. *et al.* (2007) Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 844–850.
14. Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A. Jr, Butel, J.S., Bradley, A. and Donehower, L.A. (1993) Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat. Genet.*, **5**, 225–229.
15. Smith, T.G., Clark, S.K., Katz, D.E., Reznek, R.H. and Phillips, R.K. (2000) Adrenal masses are associated with familial adenomatous polyposis. *Dis. Colon. Rectum.*, **43**, 1739–1742.
16. Fuerer, C., Nusse, R. and Ten Berge, D. (2008) Wnt signalling in development and disease. Max Delbruck Center for Molecular Medicine meeting on Wnt signaling in Development and Disease. *EMBO Rep.*, **9**, 134–138.
17. Cadigan, K.M. and Nusse, R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.*, **11**, 3286–3305.
18. Gregorieff, A. and Clevers, H. (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.*, **19**, 877–890.
19. Polakis, P. (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*, **14**, 1837–1851.
20. Galiatsatos, P. and Foulkes, W.D. (2006) Familial adenomatous polyposis. *Am. J. Gastroenterol.*, **101**, 385–398.
21. Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L. and Hammer, G.D. (2008) Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development*, **135**, 2593–2602.
22. Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X. *et al.* (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**, 7622–7627.
23. Gaujoux, S., Tissier, F., Groussin, L., Libe, R., Ragazzon, B., Launay, P., Audebourg, A., Dousset, B., Bertagna, X. and Bertherat, J. (2008) Wnt/beta-catenin and 3′,5′-cyclic adenosine 5′-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 4135–4140.
24. Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., Horvath, A., Stratakis, C.A. and Bourdeau, I. (2008) Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **69**, 367–373.
25. Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L. and Bourdeau, I. (2008) Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, **68**, 264–270.
26. Doghman, M., Cazareth, J. and Lalli, E. (2008) The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 3222–3225.
27. Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M. and Taketo, M.M. (1999) Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.*, **18**, 5931–5942.
28. Lambert-Langlais, S., Val, P., Guyot, S., Ragazzon, B., Sahut-Barnola, I., De Haze, A., Lefrancois-Martinez, A.M. and Martinez, A. (2009) A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **300**, 197–204.
29. Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W. *et al.* (2002) Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1184–1193.
30. 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**.
31. Bielinska, M., Kiiveri, S., Parviainen, H., Mannisto, S., Heikinheimo, M. and Wilson, D.B. (2006) Gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the domestic ferret (mustela putorius furo) and laboratory mouse. *Vet. Pathol.*, **43**, 97–117.
32. Kiiveri, S., Liu, J., Heikkila, P., Arola, J., Lehtonen, E., Voutilainen, R. and Heikinheimo, M. (2004) Transcription factors GATA-4 and GATA-6 in human adrenocortical tumors. *Endocr. Res.*, **30**, 919–923.
33. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. and Ben-Ze'ev, A. (1999) The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **96**, 5522–5527.
34. Heikkila, M., Peltoketo, H., Leppaluoto, J., Ilves, M., Vuolteenaho, O. and Vainio, S. (2002) Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology*, **143**, 4358–4365.
35. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57–70.
36. Magennis, D.P. and McNicol, A.M. (1998) Vascular patterns in the normal and pathological human adrenal cortex. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **433**, 69–73.
37. 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**, 4734–4741.
38. Clifford, R.L., Deacon, K. and Knox, A.J. (2008) Novel regulation of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) by transforming growth factor (beta)1: requirement for Smads, (beta)-CATENIN, AND GSK3(beta). *J. Biol. Chem.*, **283**, 35337–35353.
39. Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. and Birchmeier, W. (2008) Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev.*, **22**, 2308–2341.
40. Phelps, R.A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I.T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R.W. and Jones, D.A. (2009) A two-step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell.*, **137**, 623–634.
41. Verras, M. and Sun, Z. (2005) Beta-catenin is involved in insulin-like growth factor 1-mediated transactivation of the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.*, **19**, 391–398.
42. 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**, 627–632.
43. Ding, Q., Xia, W., Liu, J.C., Yang, J.Y., Lee, D.F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z. *et al.* (2005) Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol. Cell.*, **19**, 159–170.
44. 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**, 785–789.

45. Doghman, M., Arhatte, M., Thibout, H., Rodrigues, G., De Moura, J., Grosso, S., West, A.N., Laurent, M., Mas, J.C., Bongain, A. *et al.* (2007) Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **92**, 3253–3260.
46. Martinerie, C., Gicquel, C., Louvel, A., Laurent, M., Schofield, P.N. and Le Bouc, Y. (2001) Altered expression of novH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 3929–3940.
47. Murray, S.A., Davis, K., Fishman, L.M. and Bornstein, S.R. (2000) Alpha1 connexin 43 gap junctions are decreased in human adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 890–895.
48. Bernichtein, S., Petretto, E., Jamieson, S., Goel, A., Aitman, T.J., Mangion, J.M. and Huhtaniemi, I.T. (2008) Adrenal gland tumorigenesis after gonadectomy in mice is a complex genetic trait driven by epistatic loci. *Endocrinology*, **149**, 651–661.
49. Kananen, K., Markkula, M., Mikola, M., Rainio, E.M., McNeilly, A.S. and Huhtaniemi, I. (1996) Gonadectomy permits adrenocortical tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin α-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene: evidence for negative autoregulation of the inhibin α-subunit gene. *Mol. Endocrinol.*, **10**, 1667–1677.
50. Matzuk, M.M., Finegold, M.J., Mather, J.P., Krummen, L., Lu, H. and Bradley, A. (1994) Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **91**, 8817–8821.
51. Looyenga, B.D. and Hammer, G.D. (2006) Origin and identity of adrenocortical tumors in inhibin knockout mice: implications for cellular plasticity in the adrenal cortex. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2848–2863.
52. Doghman, M., Karpova, T., Rodrigues, G.A., Arhatte, M., De Moura, J., Cavalli, L.R., Virolle, V., Barbry, P., Zambetti, G.P., Figueiredo, B.C. *et al.* (2007) Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol. Endocrinol.*, **21**, 2968–2987.
53. Bhandaru, M., Kempe, D.S., Rotte, A., Rexhepaj, R., Kuhl, D. and Lang, F. (2009) Hyperaldosteronism, hypervolemia, and increased blood pressure in mice expressing defective APC. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **297**, R571–R575.
54. Schirpenbach, C., Segmiller, F., Diederich, S., Hahner, S., Lorenz, R., Rump, L.C., Seufert, J., Quinkler, M., Bidlingmaier, M., Beuschlein, F. *et al.* (2009) The diagnosis and treatment of primary hyperaldosteronism in Germany: results on 555 patients from the German Conn Registry. *Dtsch. Arztebl. Int.*, **106**, 305–311.
55. Abma, E.M., Kluin, P.M. and Dullaart, R.P. (2008) Malignant aldosterone-producing adrenal tumour: reoccurrence with glucocorticoid excess without hyperaldosteronism. *Neth. J. Med.*, **66**, 252–255.
56. Barzon, L., Masi, G., Fincati, K., Pacenti, M., Pezzi, V., Altavilla, G., Fallo, F. and Palu, G. (2005) Shift from Conn's syndrome to Cushing's syndrome in a recurrent adrenocortical carcinoma. *Eur. J. Endocrinol.*, **153**, 629–636.
57. Sweeney, A.T., Blake, M.A., Aish, L.S., Pais, V.M., Dowling, J.J., Melby, J.C. and Tully, G.L. III (2002) A malignant aldosteronoma. *Endocr. Pract.*, **8**, 373–377.
58. Seccia, T.M., Fassina, A., Nussdorfer, G.G., Pessina, A.C. and Rossi, G.P. (2005) Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. *Endocr. Relat. Cancer*, **12**, 149–159.
59. Keegan, C.E. and Hammer, G.D. (2002) Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 200–208.
60. Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C. *et al.* (2006) Apc tumor suppressor gene is the 'zonation-keeper' of mouse liver. *Dev. Cell.*, **10**, 759–770.
61. Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R. *et al.* (2008) Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J.*, **27**, 179–187.
62. Kim, A.C., Barlaskar, F.M., Heaton, J.H., Else, T., Kelly, V.R., Krill, K.T., Scheys, J.O., Simon, D.P., Trovato, A., Yang, W.H. *et al.* (2009) In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr. Rev.*, **30**, 241–263.
63. King, P., Paul, A. and Laufer, E. (2009) Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **106**, 21185–21190.
64. Jiang, J. and Hui, C.C. (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell.*, **15**, 801–812.
65. Lefrancois-Martinez, A.M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Veyssiere, G., 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**, 3010–3019.

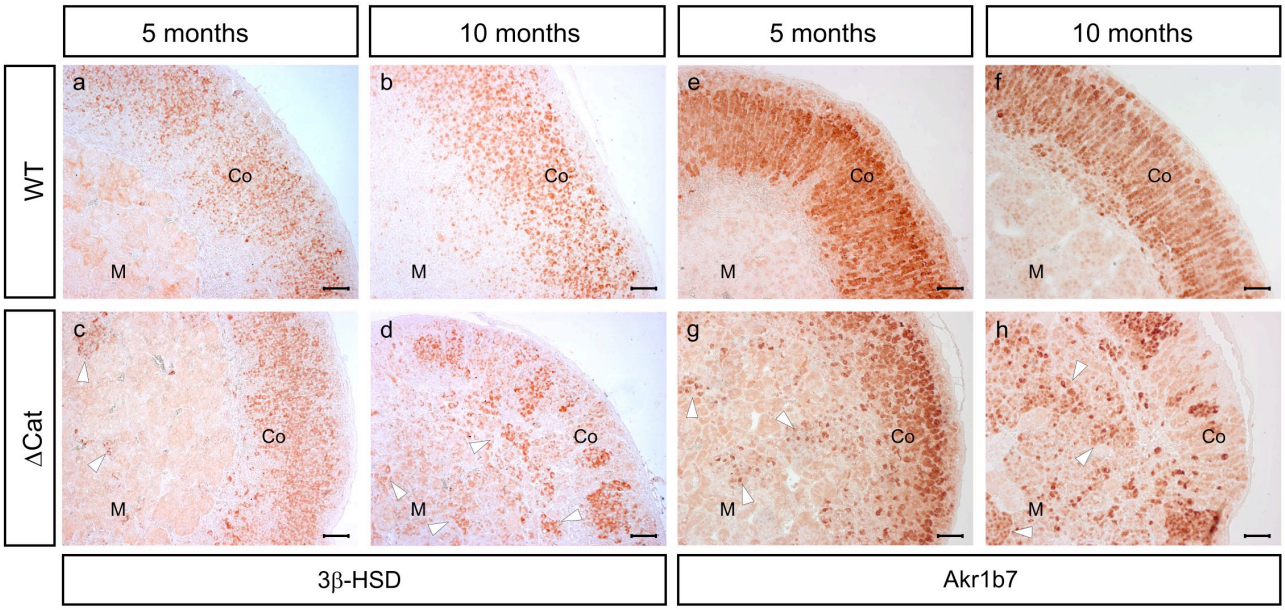


Figure S1, related to Figure 6. Loss of orthotopic fasciculata differentiation and concomitant ectopic expression of 3βHSD and Akr1b7. 3βHSD (a-b) and Akr1b7 (e-f) are expressed in the fasciculata in wild-type adrenals. In 10 month-old (d,h) and to a lesser extent in 5 month-old ΔCat adrenals (c,g), all areas of the cortex lack 3βHSD and Akr1b7. However, both proteins are ectopically expressed in spongiocytes inside the medulla (c-d, g-h, white arrowheads). Scale bar: 50 µm.

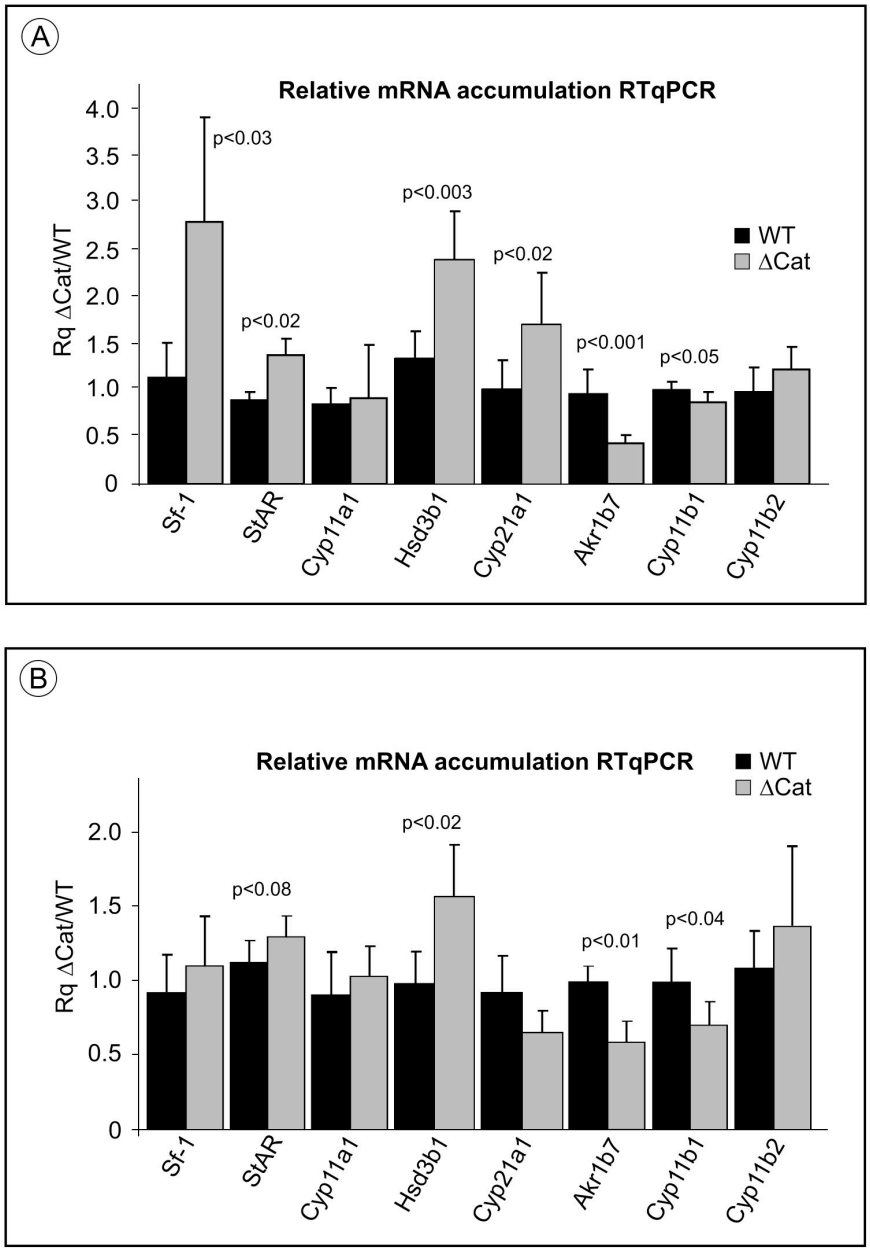


Figure S2, related to Figure 6. Steroidogenic genes expression levels. Relative mRNA accumulation of *Sf-1*, *StAR*, *Cyp11a1*, *Hsd3b1*, *Cyp21a1*, *Akr1b7*, *Cyp11b1* and *Cyp11b2* was determined by RTqPCR with adrenals from 5 (A) and 10 (B) month-old wild-type and ΔCat mice. Bars represent the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of at least 6 individual adrenals ± standard deviation. p value was calculated using Student's *t* test. Black bars, wild-type; grey bars, ΔCat.

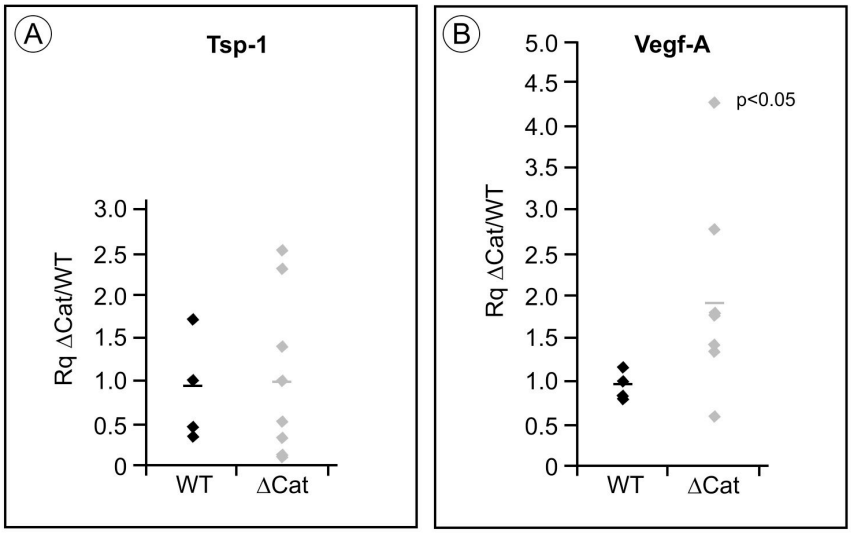
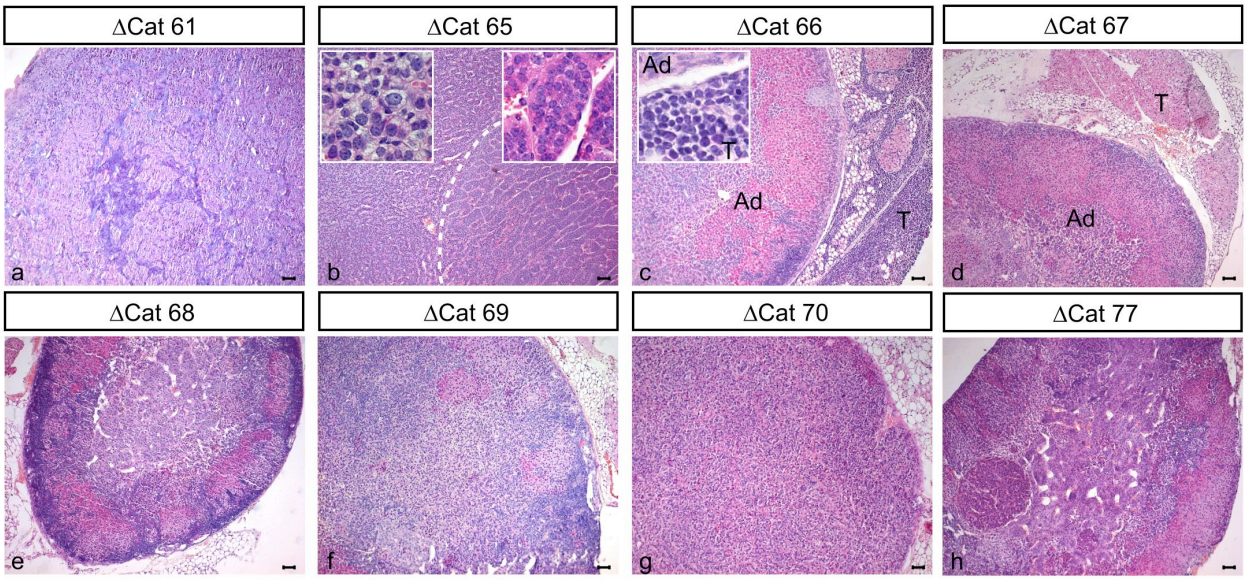


Figure S3, related to Figure 7. Expression of *Vegf-A* and *Tsp-1* in 17month-old adrenals. Relative mRNA accumulation of *Tsp-1* (A) and *Vegf-A* (B) was determined by RTqPCR with adrenals from 17 month-old wild-type (black squares) and ΔCat (grey squares) mice. *Vegf-A* expression was significantly higher in ΔCat than in wild-type mice ($p<0.05$ in Student's *t* test).

Ⓐ

Mouse #	Age months	Sex	Enlarged Adrenal	Left Ad Weight mg	Local invasion (left Ad)	Corticosterone ng/ml	Aldosterone pmol/l
61*	17	F	L++++ / R++++	ND	Vascular	ND	ND
65	17	F	L ++++	300	Vascular	43.8	1942
66	17	F	L + / R+	10	Adipose	26.9	333
67	17	F	L+++ / R+	90	Adipose (mild)	10.0	166
68	17	F	L++ / R+	68	No	6.3	166
69	17	F	L+++ / R+++	100	No	32.5	200
70	17	F	L++ / R+	30	No	15.0	319
77	17	F	L++ / R++	ND	No	26.3	999
78	17	F	L+ / R+	ND	No	13.8	416

Ⓑ



Ⓒ

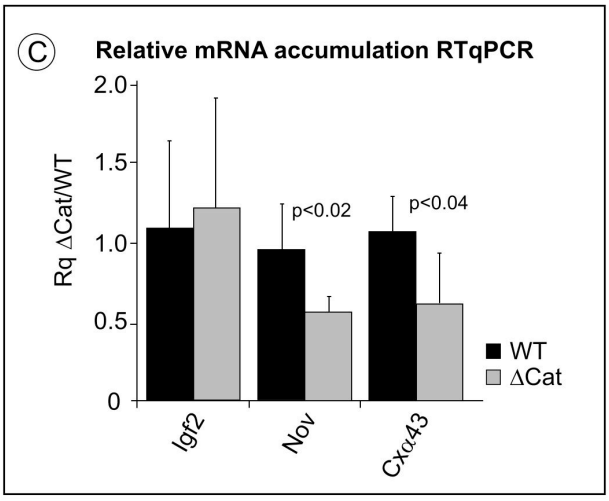


Figure S4, related to Figure 8. Histological, hormonal and molecular characteristics of 17 month-old ΔCat adrenals . A- Anatomical findings and hormonology. Significantly above average corticosterone and aldosterone concentrations are shown in red (mean wild-type corticosterone 21.8±12.7 ng/ml; mean wild-type aldosterone 500±200 pmol/l). * this animal was analysed after death from unknown cause. **B- Hematoxylin/eosin staining of eight 17 month-old ΔCat adrenals.** Low magnification pictures show the extent of inter-individual phenotypic variation at this stage. Insets in b show high magnification pictures of the two abnormal cell types accumulating in ΔCat65 adrenal. These two cell types are separated by a dashed line on the low magnification picture. Inset in c shows a high magnification picture of the metastatic tumour cells in ΔCat66 peri-adrenal adipose tissue. Ad, adrenal; T, tumour tissue. Scale bar: 50 µm. **C- Expression of markers of adrenal carcinomas in 17 month-old ΔCat adrenals**. Relative mRNA accumulation of *Igf2*, *Nov* and *Connexin-α43* (Cxα43) was determined by RTqPCR with adrenals from 17 month-old wild-type (black bars) and ΔCat (grey bars) mice. Bars represent the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of at least 6 individual adrenals ± standard deviation. p value was calculated using Student's *t* test.

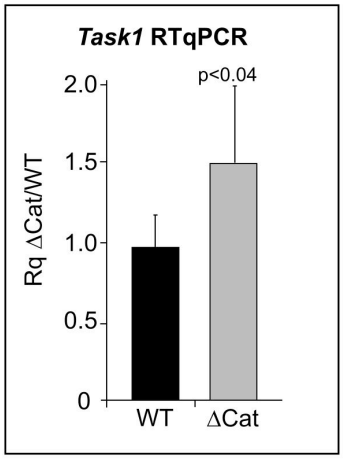


Figure S5, related to Figure 5. Expression of Task1 in 10 month-old adrenals.
Relative mRNA accumulation of *Task1* was determined by RTqPCR with adrenals from 10 month-old wild-type (black squares) and ΔCat (grey squares) mice. Task1 expression was significantly higher in ΔCat than in wild-type mice ($p<0.04$ in Student's *t* test).

Supplemental experimental procedures

Mice, tissue samples and Genotyping

Mice were euthanized by decapitation and blood was collected on 5µl of 0.5M EDTA. Adrenals were either immediately frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Genotyping was performed by PCR according to standard protocols. Excision of the third exon of β-catenin in ΔCat mice was confirmed by genomic PCR with primers Ex4 5'-GGGATGAGCAGCGTCAAACT-3' and 523R 5'-GACACCGCTGCGTGGACAATG-3'.

Histology and immunohistochemistry

Immunodetection of β-catenin 1/500 (610153, BD Biosciences Pharmingen), Sf-1/Ad4BP 1/1000 (kind gift of Dr Ken Morohashi, Fukuoka, Japan), Gata4 1/200 (Sc , Santa Cruz), TH 1/1000 (AB1512, Chemicon Millipore), Ki67 1/200 (RM9106-SO, Neomarkers/Interchim), Akr1b7 1/1000 [65], 3βHSD 1/1000 (kind gift of Dr Michael Thomas, Inserm U878, Grenoble, France) and Cyp11b2 1/50 (Kind gift of Dr Celso Gomez-Sanchez, Jackson Mississippi, USA) was performed on paraffin-embedded tissues. These were prepared by fixing adrenals overnight in 4% PFA. After two washes in PBS, adrenals were dehydrated through ethanol series and incubated for two hours in Histoclear, before inclusion in paraffin. Five micrometers sections were cut and deparaffinised in Histoclear. These were rehydrated through ethanol series. All epitopes were retrieved by 20 min boiling in sodium citrate 10mM pH6.0 with the exception of Sf-1 which was detected after 20 min boiling in Vector Antigen Retrieval Solution (H3300, Vector Labs).

PECAM 1/50 (BD Biosciences Pharmingen), was detected on OCT-embedded tissues. These were prepared by fixing adrenals for 30 min in 4% PFA. After two washes in PBS, adrenals were successively processed for 20 min in 10, 15 and 20% sucrose solutions. After overnight incubation in a volume:volume solution of 20% sucrose:OCT, adrenals were snap frozen in OCT. Ten micrometers sections were cut and vacuum dried for 10 min. Slides were rehydrated twice in PBS and sections were post-fixed with 4% PFA for 10 min, before immuno-histochemistry processing.

Primary antibodies were detected with the appropriate secondary antibodies, coupled to biotin (1/500, Jackson Immunoresearch). Biotin was then complexed with streptavidin coupled to Horse Radish Peroxidase (HRP) (016-030-084, Jackson Immunoresearch). HRP activity was detected with the chromogenic substrate Novared (SK4800, Vector Labs).

Double-immunohistochemistry experiments were performed following a similar protocol. When the two primary antibodies were raised in different species, the two proteins were sequentially detected by amplification with TSA-Alexa488 (T20932, Molecular Probes) and TSA-Alexa555 (T, Molecular Probes) flurorescent HRP substrates. To avoid cross-reaction, HRP was inactivated by incubation with 0.02% HCl for 20 min after detection of the first antibody. When the two primary antibodies were raised in the same species, one primary antibody was sufficiently diluted to prevent direct immunodetection and was detected by amplification with TSA-Alexa488 or TSA-Alexa555. The other antibody was subsequently detected by direct immunofluorescence with secondary antibodies coupled to Alexa488 or Alexa555 (Molecular probes).

RT-qPCR

Five hundred ng mRNA were reverse transcribed for 1h at 42°C with 5 pmoles of random hexamer primers, 200 units reverse transcriptase (MuMLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNAsin (N2615, Promega). A half microliter of a tenth dilution of the cDNA

was used in each quantitative PCR reaction. These were conducted with Taqman® probes of the Gene Expression Assay pool (Applied Biosystems, see below). Each reaction was performed in triplicate in a final volume of 15 µl with 0.75 µl of the appropriate 20x probe mix and 7.5 µl of PCR Mastermix (Precision Ic, Primerdesign.co.uk).

Taqman Gene expression assays probes that were used in this study were: *Axin2* Mm00443610_m1, *CyclinD1* Mm00432359_m1, *Vegf-A* Mm01281449_m1, *Tsp1* Mm01335418_m1, *Sf-1* Mm00446826_m1, *StAR* Mm00441558_m1, *Cyp11a1* Mm00490735_m1, *Hsd3b1* Mm00476184_m1, *Cyp21a1* Mm00487230_g1, *Akr1b7* Mm00477605_m1, *Cyp11b1* Mm01204953_gH, *Cyp11b2* Mm00515624_m1, *Connexinα43* Mm00439105_m1, *Nov* Mm00456855_m1, *Igf2* Mm00439564_m1, *Task1* Mm00807036_m1.

Conclusions et discussions

La caractérisation des souris ΔCat a permis de démontrer que l'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine, entraine une hyperplasie des cellules stéroidogènes et des cellules sous-capsulaires, une augmentation de la prolifération, de la vascularisation et une dysplasie à la fois corticale et médullaire. L'ensemble de ces altérations de l'homéostasie du cortex surrénalien aboutit au développement d'hyperplasies bénignes qui progressent, dans 30% des cas, vers la malignité. La pénétrance incomplète des CCS, suggère que des altérations génétiques secondaires, dont l'apparition peut être facilitée par l'activation de la voie Wnt/ßcaténine, sont requises pour favoriser la progression tumorale. Le papier 3 s'intéressera à l'étude de ces altérations secondaires potentielles.

1) Phénotype des tumeurs murines et humaines associées à l'activation constitutive de la ßcaténine

Chez l'Homme, l'activation constitutive de la ßcaténine a été identifiée dans des tumeurs bénignes et malignes de la cortico-surrénale, qui sont principalement non sécrétrices ou sécrétrices de cortisol ou d'androgènes (Bonnet et al., 2011). Chez les souris ΔCat, l'activation constitutive de la ßcaténine induit initialement le développement de tumeurs bénignes productrices d'aldostérone. Il semble donc exister une différence entre les conséquences de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine dans le cortex surrénalien humain et murin. Nous ne pouvons bien sûr pas exclure que cette dichotomie résulte simplement de différences entre espèces et que la souris ne soit pas le modèle idéal pour mimer la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Cependant, à partir des données bibliographiques, différentes hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ou d'aider à la compréhension de ce phénomène.

Initialement, les tumeurs productrices d'aldostérone humaines avaient été exclues des analyses d'activation de la voie Wnt/ßcaténine. Depuis, l'activation de cette voie, visualisée par la localisation nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine, a été mise en évidence dans les APA sporadiques (Boulkroun et al., 2011), mais également dans les APA se développant chez des patients porteurs de mutations de APC (Pinés Corrales et al., 2006; Alexander et al., 2000). Nous verrons dans le deuxième article que ces données sont confirmées sur une large cohorte et que la ßcaténine participe au contrôle de la synthèse de l'aldostérone. L'activation de la voie Wnt/ßcaténine est donc également associée aux tumeurs humaines productrices d'aldostérone.

Les tumeurs productrices d'aldostérone n'évoluent que dans de très rares cas en carcinomes (1%) (Fagugli and Taglioni, 2011; Seccia, 2005), ce qui est donc plutôt

Souris ΔCat	Hypertrophie surrénalienne	Invasion locale	Corticostérone ng/ml	Aldostérone pmol/l
61	G++++/D++++	Vasculaire	ND	ND
65	G++++	Vasculaire	43,8	1942
66	G+/D+	Tissu adipeux	26,9	333
67	G+++/D+	Tissu adipeux	10	166
68	G++/D+	Non	6,3	166
69	G+++/D+++	Non	32,5	200
70	G++/D+	Non	15	319
77	G++/D++	Non	26,3	999
78	G+/D+	Non	13,8	416

Figure 34 : Sécrétion d'aldostérone et de corticostérone lors de la progression tumorale des surrénales des souris ΔCat
Caractéristiques macroscopiques des tumeurs cortico-surrénaliennes chez les souris ΔCat de 17 mois. Concentration de corticostérone et d'aldostérone chez les souris ΔCat. Les valeurs supérieures aux valeurs moyennes des souris contrôles (21,8±12,7 ng/ml pour la corticostérone et 500±200 pmol/l) sont indiquées en rose. Une des neuf souris ΔCat présente un carcinome avec double sécrétion de corticostérone et d'aldostérone. Une autre souris présente un carcinome sécréteur d'aldostérone, uniquement. Les autres carcinomes sont considérés comme non sécréteurs (concentrations plasmatiques équivalentes aux sauvages).

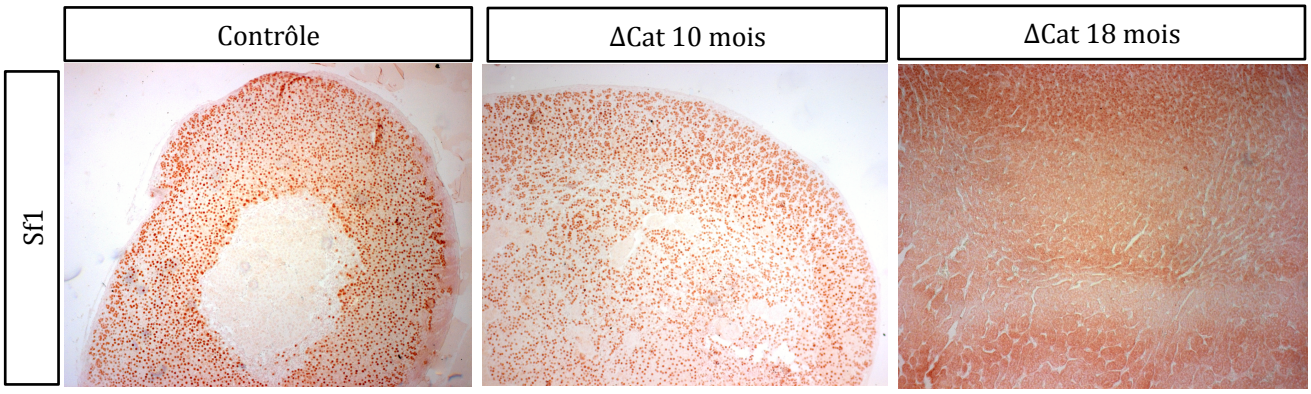
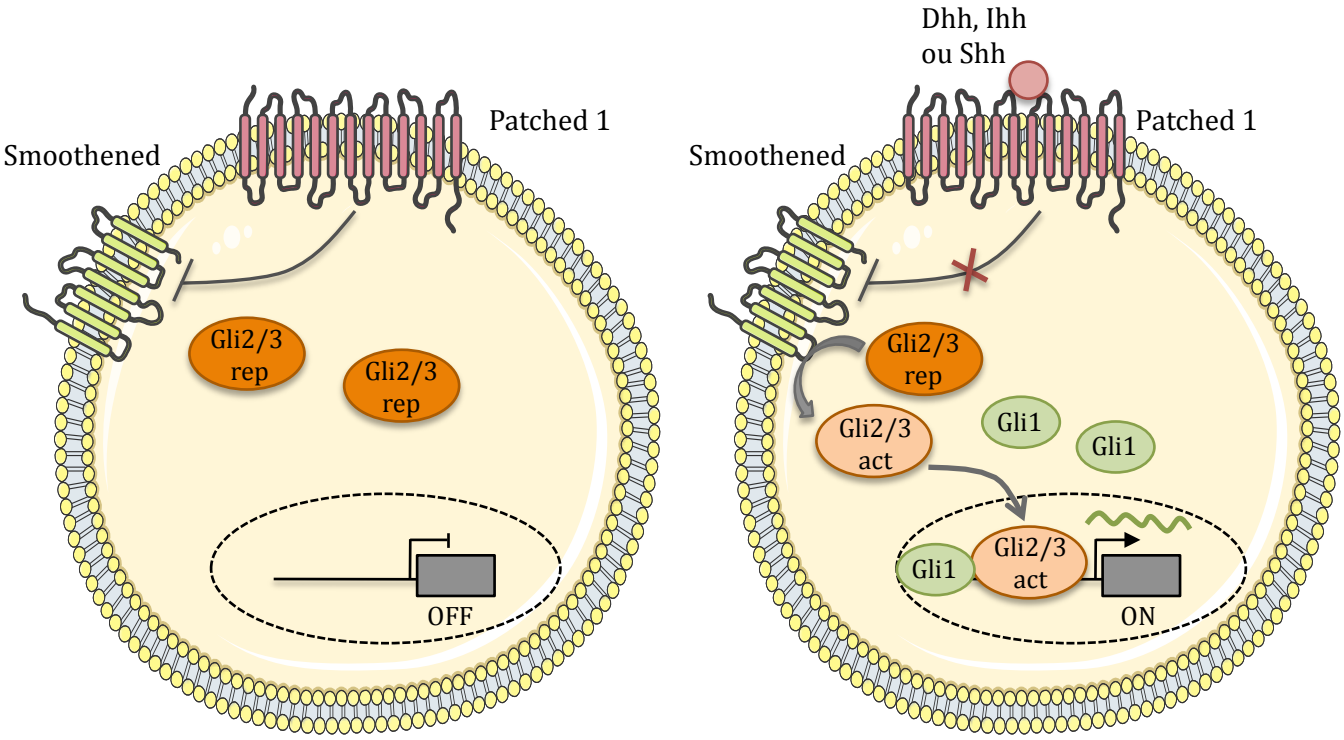


Figure 35 : La progression tumorale induit la perte de l'expression du marqueur stéroïdogène, Sf1
L'expression de Steroidogenic Factor 1 (Sf1) a été détectée par immunohistochimie sur des coupes de surrénales de souris contrôle et ΔCat de 10 et 18 mois. Au cours de la progression tumorale, les souris ΔCat présentent une perte de l'expression de Sf1.

contradictoire avec l'activation de la ßcaténine observées dans les CCS (Berthon et al., 2012). Il est possible que la sécrétion d'aldostérone corresponde à une phase bénigne dans la tumorigenèse mais que lors de l'évolution tumorale, cette caractéristique soit perdue en faveur de tumeurs non sécrétrices ou sécrétrices de cortisol. En effet, lors de l'évolution tumorale, les souris ΔCat présentent une diminution des taux d'aldostérone plasmatique qui chez certains individus s'accompagne même d'une augmentation des concentrations de corticostérone plasmatique (Figure 34). Un phénomène similaire a été observé chez l'Homme avec la description de plusieurs cas de tumeurs productrices d'aldostérone qui ont récidivé avec hypersécrétion de cortisol (Barzon et al., 2005; Abma et al., 2008; Müssig et al., 2005). Il est également plausible qu'une hypersécrétion d'aldostérone modérée qui n'entraine pas une hypertension artérielle importante, ne soit pas diagnostiquée avant une aggravation possiblement associée avec un syndrome de Cushing. Ainsi, plusieurs cas de patients présentant un CCS avec double sécrétion d'aldostérone et de cortisol ont été décrits dans la littérature (Beom et al., 2011; Peppa et al., 2009; Kurtulmus et al., 2004; Messer et al., 2007). L'état sécréteur des tumeurs cortico-surrénaliennes varie donc, même si la voie Wnt/ßcaténine est activée (Bonnet et al., 2011).

Il a été démontré que la tumorigenèse induite par l'activation de la voie Wnt nécessite des dosages différents et spécifiques d'activation de la ßcaténine en fonction des tissus considérés (intestin, sein, foie) (Buchert et al., 2010). De la même manière, dans un tissu donné, le phénotype observé varie en fonction du type de mutation et du niveau d'activation ectopique de la voie Wnt/ßcaténine induite par cette altération génétique (Buchert et al., 2010). Par conséquent, il est fort probable qu'un mécanisme similaire intervienne dans le cortex surrénalien. En accord avec cette hypothèse, chez les souris ΔCat, plus l'activation de la voie Wnt/ßcaténine se propage dans le cortex surrénalien, plus les cellules perdent leurs caractéristiques différenciées (Figure 35). Le dosage de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine semble donc bien influencer le devenir cellulaire dans le cortex surrénalien. Dans les CCS et ACS silencieux ou sécréteurs de cortisol, l'activation de la voie Wnt/ßcaténine résulte de mutations du gène *CTNNB1* dans respectivement 16% et 27% des tumeurs (Berthon et al., 2012). Le mécanisme responsable de l'activation dans les autres CCS et ACS est encore indéterminé. A la lumière de ces observations, il sera intéressant de déterminer de manière quantitative, les niveaux d'activation de la voie Wnt dans les différents types de tumeurs surrénaliennes (APA compris) et d'évaluer l'existence d'une corrélation entre activation et nature de la sécrétion hormonale.



<u>Figure 36</u> : Voie de signalisation Hedgehog

En absence de ligand, le récepteur Patched1 inhibe la protéine à 7 domaines transmembranaires, Smoothened. Les facteurs de transcription Gli2 et Gli3 sont alors protéolysée pour produire un répresseur transcriptionnel. La voie Hedgehog est inactivée. La liaison des ligands Indian (Ihh), Desert (Dhh) ou Sonic (Shh) sur Patched1 lève la répression de Smoothened qui inhibe alors la protéolyse des facteurs Gli2 et Gli3 menant à une perte de leur forme répressive et une accumulation des facteurs Gli2 et Gli3 actifs. Gli2 et Gli3 se lient alors aux promoteurs de leurs gènes cibles, dont celui de Gli1 afin d'activer leur transcription. Gli1 qui est un autre facteur de transcription de la voie Hedgehog est également capable d'activer l'expression des gènes cibles de la voie.

2) ßcaténine et renouvellement cellulaire

La capacité de régénération complète d'un cortex surrénalien fonctionnel à partir de la capsule et des régions sous-capsulaires après une énucléation (SKELTON, 1959), suggère que son renouvellement s'effectue grâce à des cellules situées dans la capsule conjonctive et/ou en région sous-capsulaire. Conformément à cette hypothèse, les cellules prolifératives marquées par des expériences de pulse de BrdU (Bromodeoxyuridine) sont principalement localisées dans la région capsulaire et/ou sous-capsulaire (Schulte et al., 2007). Récemment, des expériences de lignage cellulaire ont démontré que des cellules sous-capsulaires indifférenciées, c'est-à-dire n'exprimant pas le marqueur des cellules stéroidogènes Sf1, peuvent se différencier en cellules de la zone glomérulée (Sf1 (+), Cyp11b2 (+)) et de la zone fasciculée (Sf1 (+), Cyp11b1 (+))(King et al., 2009). Ces expériences constituent la première preuve génétique que des cellules différenciées du cortex sont issues de la région sous capsulaire. Les mêmes expériences de lignage et de génétique de la souris ont permis de montrer que le renouvellement cellulaire à partir de cellules sous-capsulaires, était dépendant de la voie de signalisation Hedgehog (Hh). Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) et Indian Hedgehog (Ihh) sont les ligands sécrétés de cette voie de signalisation qui agissent sur leurs cellules cibles au travers d'un complexe récepteur. Chez les vertébrés, ces complexes incluent Patched 1 (Ptch1), un récepteur à 12 domaines trans-membranaires de la voie canonique associé à une protéine de liaison à Hh avec un domaine transmembranaire telle que Cdo (Cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes), Boc (brother of Cdo/bilaregional Cdon-binding protein) ou Gas1 (Growth arrest specific) une protéine d'ancrage au GPI (Allen et al., 2011). En absence de ligand, Ptch1 inhibe par un mécanisme qui reste toujours mal connu la protéine à 7 domaines transmembranaires Smoothened (Smo). La présence du ligand inhibe l'action de Ptch1 sur Smo qui s'accumule et inhibe la protéolyse des facteurs de transcription Gli2 et Gli3 qui sont alors sous leur forme active et induisent la transcription de leurs gènes cibles (Figure 36) (Laufer et al., 2012). Par contre, le facteur Gli1 qui agit également comme un activateur transcriptionnel des gènes cibles de la voie Hh n'est pas exprimé en absence de signal Hh. Sa transcription étant induite juste après l'activation de la voie, Gli1 est un marqueur des cellules où la voie Hedgehog est activée (King et al., 2008).

Les modèles génétiques et les expériences de lignage ont permis d'établir un modèle du contrôle du renouvellement cellulaire au travers de la voie Hh. En effet, *Shh* est exprimé dans des clusters de cellules positives pour Sf1 mais incomplètement différenciées en cellules de la zone glomérulée. Les cellules répondant à la voie Hh, visualisées au travers de l'expression de Gli1, un des gènes cibles de la voie, sont des cellules de type mésenchymateux localisées dans la capsule interne. Le modèle proposé est donc que l'expression du ligand *Shh* par des cellules stéroidogènes induit l'activation de la voie dans les cellules progénitrices, ce qui active leur

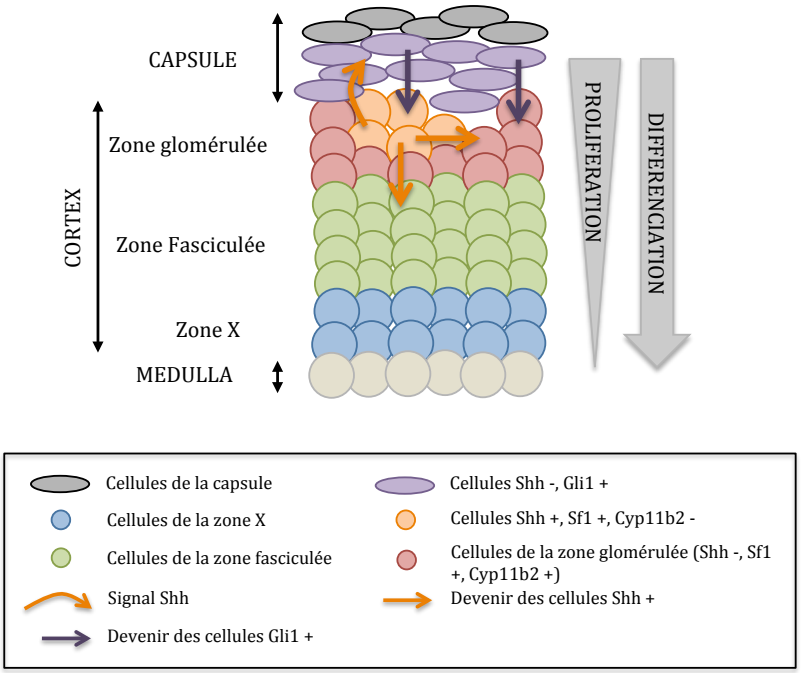


Figure 37 : Modèle du rôle de la voie Shh dans le renouvellement du cortex surrénalien
Shh est exprimé dans un groupe de cellules localisées dans la zone glomérulée (orange) mais qui sont incomplètement différenciées puisqu'elles n'expriment ni CYP11B2 ni CYP11B1. La sécrétion de Shh par ces cellules induit alors l'activation de la voie Hh dans les cellules Gli1(+) (violet), localisées dans la capsule conjonctive. Ces cellules migrent ensuite de manière centripète le long du cortex et se différencient en cellules de la zone glomérulée ou Shh(+), puis fasciculée. Les cellules Shh(+) peuvent elles aussi se différencier en cellules de la zone glomérulée ou fasciculée.

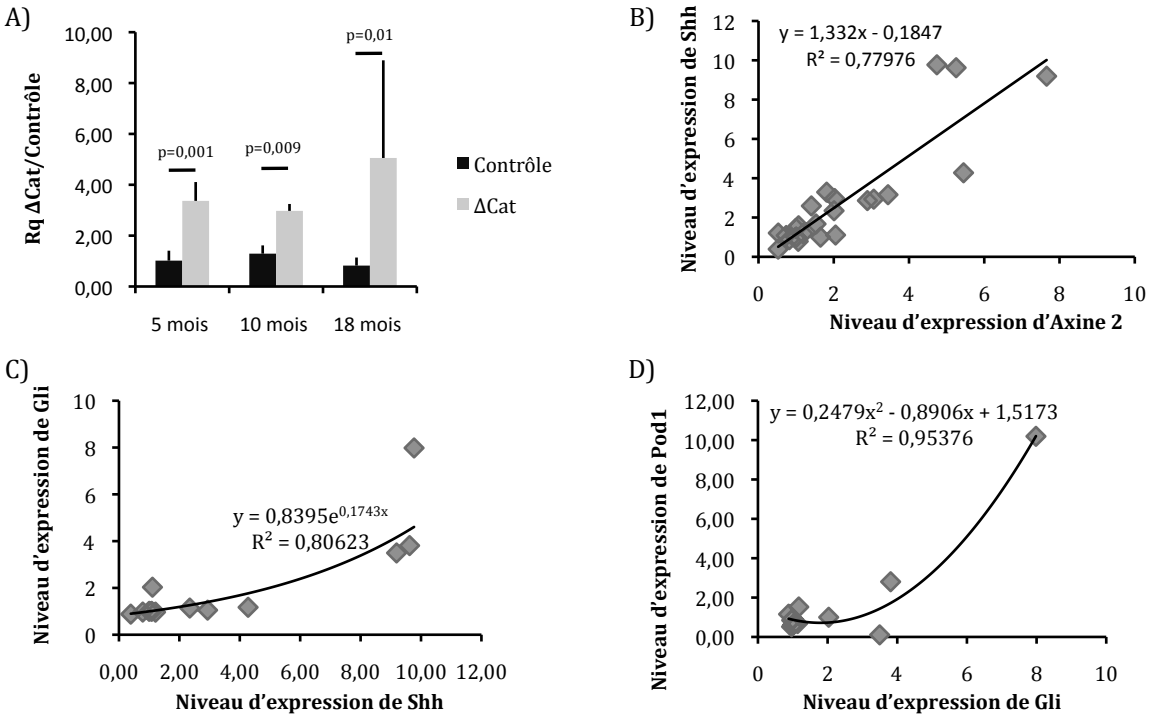


Figure 38 : Analyse de l'état de la voie Sonic Hedgehog (Shh) chez les souris ΔCat
A) **Analyse de l'expression de Shh par RTqPCR**. Les ARNm totaux de surrénales de souris sauvages et ΔCat de 5, 10 et 18 mois ont été reverse-transcrits et l'expression de sonic hedgehog (Shh) a été analysé en RT quantitative PCR grâce à la technique de Taqman. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'expression du gène de ménage codant la peptidylprolyle isomérase B (PPIB). Le graphique représente la moyenne des niveaux relatifs d'expression (Rq) chez 6 souris contrôles et ΔCat à chaque âge. La barre d'erreur correspond à l'écart type et les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student. B) **Corrélation de l'expression de Shh et de l'Axine2**. L'expression de Shh est corrélée à l'expression du gène cible de la voie Wnt/ßcaténine, Axine2 au cours du temps. C) **Corrélation de l'expression de Shh et de Gli1.** A 18 mois, l'augmentation de l'expression de Shh est corrélée à l'augmentation de l'expression de son gène cible Gli1. D) **Corrélation de l'expression de Gli1 et Pod1.** A 18 mois, l'augmentation de l'expression de Gli1 est corrélée à l'augmentation de l'expression d'un marqueur des cellules progénitrices, Pod1.

prolifération et le renouvellement du cortex (Figure 37) (King et al., 2008). Toutefois, le mécanisme moléculaire du contrôle de l'expression de *Shh* reste toujours à déterminer. La voie Wnt/ßcaténine qui peut agir par l'intermédiaire de la voie Hh pour permettre le recrutement et le maintien des cellules progénitrices dans d'autres tissus est une bonne candidate dans la surrénale (Brabletz et al., 2009). Conformément à cette hypothèse, un amincissement progressif du cortex est observée chez les souris partiellement invalidées pour la ßcaténine (Kim et al., 2008). Ceci suggère que chez ces souris des cellules Sf1 (+) ßcaténine (+) étaient au départ maintenues au niveau sous-capsulaire mais qu'elles ont été remplacées par des cellules ßcaténine (-) au cours du vieillissement. L'amincissement du cortex serait donc causé par la perte de la ßcaténine au niveau du pool de progéniteurs, dont elle favoriserait normalement la prolifération. Réciproquement, chez les souris ΔCat, des cellules d'aspect fibroblastique qui n'expriment pas *Sf1* s'accumulent et envahissent progressivement le cortex (Article 1). Ces cellules de type mésenchymateux qui pourraient être des cellules progénitrices ne présentent pas d'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine. Cette dernière induit donc leur accumulation incontrôlée par des effets paracrines, qui pourraient être dépendants de l'activation de la voie Hh. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons analysé l'expression de différents membres de la voie Hh chez les souris ΔCat. Dès 5 mois, les souris ΔCat présentent une augmentation de l'expression de Shh qui est corrélée à l'augmentation de l'expression d'un des gènes cibles de la voie Wnt/ßcaténine, l'*Axine2*. Ces données suggèrent que la voie Wnt/ßcaténine pourrait contrôler l'expression de Shh dans le cortex surrénalien et permettre le recrutement paracrine de progéniteurs. Cependant, il faut attendre 18 mois pour visualiser une augmentation de l'expression de *Gli1*, qui est alors corrélée à l'expression de Shh (Figure 38). Une des explications possibles de ce délai entre l'augmentation de Shh et l'activation de la voie mesurée par RTqPCR est que Gli1 n'est exprimé que dans un sous-groupe de cellules mésenchymateuses. Il est donc possible que la faible représentation de ces cellules aux stades initiaux de la pathologie empêche la détection de Gli1 par RTqPCR. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'augmentation tardive et corrélée à l'augmentation de l'expression de *Gli1* de *Pod1*, un autre marqueur putatif des cellules progénitrices (Figure 38). Des analyses en hybridation *in situ* de l'expression de ces différents marqueurs au cours du temps, pourraient permettre de confirmer cette hypothèse.

L'ensemble de ces résultats permet d'émettre un modèle hypothétique dans lequel la voie Wnt/ßcaténine stimule l'expression du ligand *Shh* dans des cellules stéroidogènes de la niche sous-capsulaire. Celui-ci de manière paracrine induit la voie Hh dans les cellules progénitrices. Ceci favorise alors leur prolifération, se traduisant par une expansion du nombre de cellules progénitrices visualisées, par l'augmentation de l'expression de *Pod1* et *Gli1* (Figure

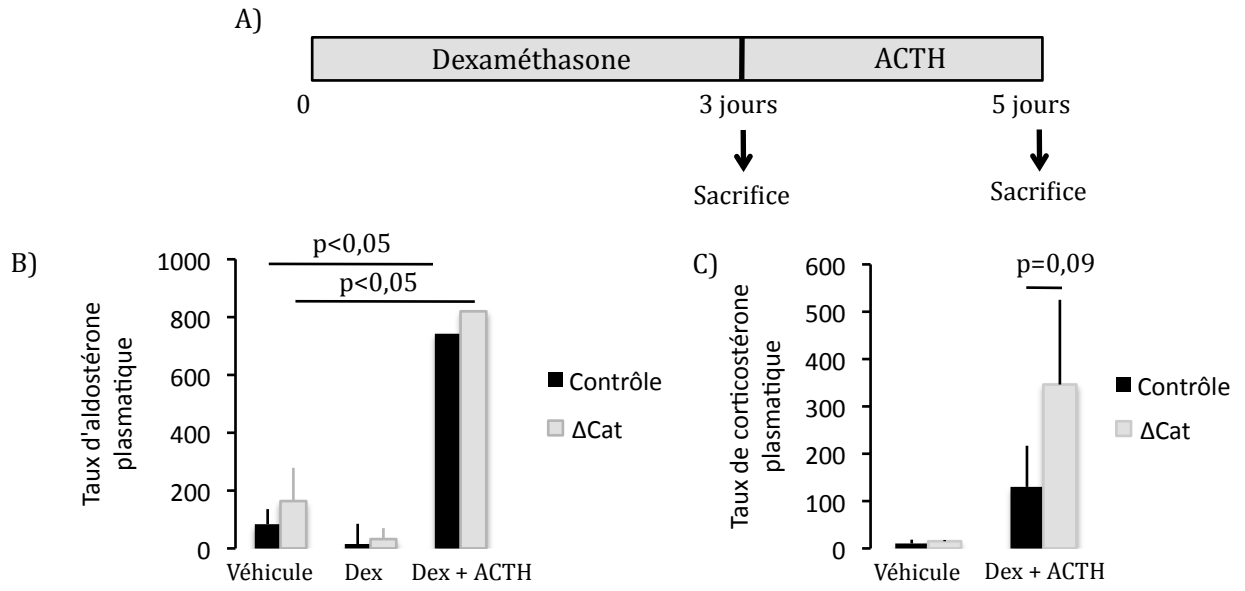


Figure 39 : Un traitement à la dexaméthasone et à l'ACTH induit une hypercorticostéronémie chez les souris ΔCat
A) **Représentation schématique du traitement**. Les 3 groupes de 4 souris ΔCat et contrôle ont respectivement été traitées avec le véhicule pendant 5 jours, à la dexaméthasone (Dex) pendant 3 jours ou à la dexaméthasone 3 jours puis 2 jours à l'ACTH avant le sacrifice. B) **Dosage du taux d'aldostérone plasmatique**. Le dosage d'aldostérone plasmatique a été effectué sur chaque groupe de souris. C) **Dosage du taux de corticostérone plasmatique**. Le dosage de corticostérone plasmatique a été effectué sur chaque groupe de souris. Cependant, les résultats pour le traitement dexaméthasone ne sont pas présentés puisque les taux de corticostérone n'ont pu être détectés dans aucun des groupes. Les barres d'erreur correspond à l'écart type et les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student.

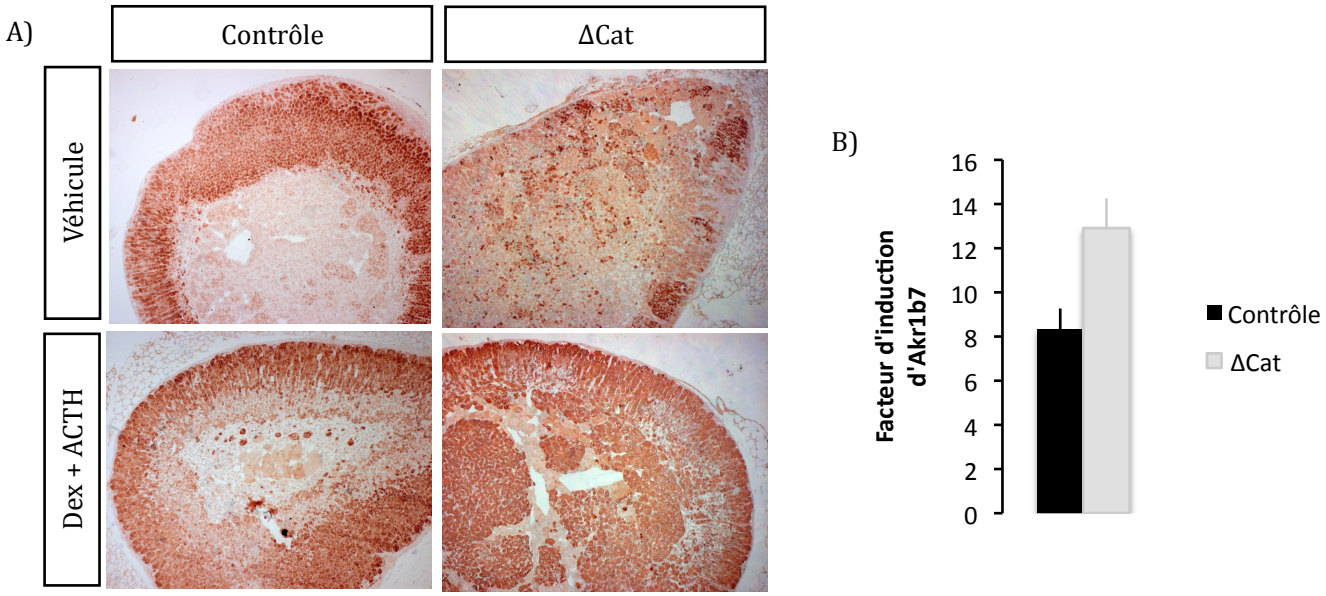


Figure 40 : Un traitement à la dexaméthasone et à l'ACTH induit la réexpression de marqueurs de la zone fasciculée chez les souris ΔCat
A) **Immunohistochimie d'Akr1b7**. L'expression d'Akr1b7 a été détectée par immunohistochimie sur des coupes de surrénales de souris contrôles et ΔCat, ayant été traitées véhicule ou la dexaméthasone (Dex) + ACTH. B) **Analyse de l'expression d'Akr1b7 par RTqPCR**. L'expression d'Akr1b7 a été déterminée en RTqPCR grâce à la technique de Taqman sur les ARNm reverse transcrits de surrénales de souris sauvages et ΔCat, traitées véhicule ou Dex+ ACTH. Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'expression de PPIB. Le graphique représente le facteur d'induction de l'expression d'Akr1b7 chez 4 souris contrôles et ΔCat traitées Dex + ACTH par rapport aux souris traitées véhicule. La barre d'erreur correspond à l'écart type et les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student.

38). Des expériences génétiques détaillées dans le chapitre « perspectives » sont en cours afin de valider cette hypothèse.

3) Origine des cellules productrices d'aldostérone

Une question restant en suspens à l'issue de ce travail concerne la nature même des cellules (glomérulée ou fasciculée) qui expriment *CYP11B2* à l'intérieur du cortex et dans la medulla. Nous avons donc testé la capacité de ces cellules à répondre à des traitements de suppression de l'axe hypothalamo-hyphophyso-cortico-surrénalien, suivis ou non d'un traitement à l'ACTH. Comme chez les souris contrôle, l'administration de la dexaméthasone (Dex) pendant deux jours, abolit la production d'aldostérone et de corticostérone chez les souris ΔCat (Figure 39). Par contre, lorsque le traitement à la déxaméthasone est suivi de trois jours d'induction à l'ACTH, les taux de corticostérone plasmatique des souris ΔCat sont supérieurs à ceux des souris contrôles même si le faible échantillonnage (n=4) ne permet pas d'atteindre la significativité (p=0,09) (Figure 39). La sécrétion d'aldostérone quant à elle, est similaire à celle des souris contrôles, ce qui suggère que l'ACTH induit une transformation des cellules ectopiques en leur donnant la capacité de produire principalement des glucocorticoides. Conformément à cette hypothèse, l'ACTH induit l'expression du marqueur de la zone fasciculée, *Akr1b7* qui est colocalisé avec la ßcaténine dans les cellules ectopiques. Nous observons également que l'induction de son expression en réponse à l'ACTH est supérieure chez les souris ΔCat, par rapport aux souris contrôles également traitées Dex + ACTH (Figure 40). Il semblerait donc que les cellules de la zone glomérulée ectopique aient une capacité accrue à produire des stéroïdes, que ce soit l'aldostérone en condition basale ou la corticostérone en réponse à l'ACTH. Ces observations suggèrent donc que l'activation constitutive de la ßcaténine conduit à la différenciation ectopique de cellules à double potentialité.

Article 2 :

L’activation de la voie Wnt/ßcaténine induit un syndrome de Conn

Présentation succincte du contexte scientifique

Le syndrome de Conn ou hyperaldostéronisme primaire (HP) est majoritairement causé par des lésions bénignes de la surrénale (Fagugli and Taglioni, 2011). C'est la première cause d'hypertension artérielle secondaire qui est associée avec une morbidité et une mortalité plus élevée que les hypertensions artérielles essentielles. En effet, cette HAS est caractérisée par sa résistance aux traitements anti-hypertenseurs (Funder et al., 2008) et de ce fait difficile à contrôler pour les médecins. Il serait intéressant de déterminer les altérations génétiques à l'origine du développement du syndrome de Conn, afin de pouvoir ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques.

Nous avons précédemment montré que les souris ΔCat présentent initialement un hyperaldostéronisme primaire (Article 1). De la même façon, les souris APC^{min} qui présentent une activation systémique de la voie Wnt/ßcaténine développent elle aussi un HP (Bhandaru et al., 2009). Ces données suggèrent donc que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine peut participer au déclenchement d'un hyperaldostéronisme d'origine surrénalien. Conformément à cette hypothèse, deux cas d'HP ont été décrits chez des patients porteurs de mutations germinales d'APC qui induisent une activation de la voie Wnt/ßcaténine (Alexander et al., 2000; Pinés Corrales et al., 2006). Enfin, le ligand WNT 4 est surexprimé dans les cas d'hyperaldostéronisme primaire (Kuulasmaa et al., 2008).

Au vu de ces données bibliographiques, nous nous sommes posé deux grandes questions :

- L'activation de la voie Wnt/ßcaténine est-elle associée aux HP chez l'Homme ?
- Si oui, comment l'activation de la voie Wnt/ßcaténine induit un HP ?

Article 2 :

Constitutive Wnt/ß-catenin signaling causes the development of aldosterone producing adenomas.

Berthon A., Drelon C., Ragazzon B., Tissier F., Boulkroun S., Amar L., Samson-Couterie B., Zennaro MC., Plouin PF., Skah S., Plateroti M., Lefèbvre H., Sahut-Barnola I., Batisse I., Assié G., Lefrançois-Martinez AM., Bertherat J., Martinez A., Val P.

En préparation

Constitutive WNT/β-catenin Signalling Causes the Development of Aldosterone Producing Adenomas

Annabel Berthon[1,2,3], Coralie Drelon[1,2,3], Bruno Ragazzon[4,5], Frédérique Tissier[4,5,6], Sheerazed Boulkroun[7,8,9], Laurence Amar[7,8,9,10], Benoît Samson-Couterie[7,8,9], Maria-Christina Zennaro[7,8,9,10], Pierre-François Plouin[7,8,9,10], Seham Skah[11], Michelina Plateroti[11], Hervé Lefèbvre[12,13], Isabelle Sahut-Barnola[1,2,3], Marie Batisse[1,2,3,14], Guillaume Assié[4,5,6], Anne-Marie Lefrançois-Martinez[1,2,3], Jérôme Bertherat[4,5,6], Antoine Martinez[1,2,3] & Pierre Val[1,2,3*].

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, F-63012 Clermont-Ferrand Cedex 1 ; [2]CNRS, UMR 6293, GReD, F-63171 Aubière Cedex ; [3]Inserm, U1103, GReD, F-63171 Aubière Cedex ; [4]Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, F-75014 ; [5]Inserm, U1016, Paris, F-75014 ; [6]Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Paris, F-75014 ; [7]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 970 ; [8]Paris Cardiovascular Research Center, F-75015 Paris; [9]University Paris Descartes, F-75270 Paris Cedex 05 ; [10]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, F-75908 Paris Cedex 15 ; [11]CNRS, UMR 5534, F-69622 Villeurbanne ; [12]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 982, and University of Rouen, F-76821 Mont-Saint Aignan; [13]University Hospital of Rouen, F-76031 Rouen ; [14]Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, F-63000.

***Corresponding author:** Dr Pierre VAL, CNRS UMR 6293 GReD, 24 avenue des Landais, 63171 AUBIERE CEDEX, FRANCE. Tel : + 33 4 7340 7412 – Fax : +33 4 73 40 70 42 – e-mail: pierre.val@univ-bpclermont.fr

Keywords: Aldosterone producing adenoma, Hyperaldosteronism, WNT/ß-catenin, NGFIB, adrenal

Primary hyperaldosteronism is the main cause of secondary hypertension, resulting from adrenal aldosterone producing adenomas (APA) or bilateral hyperplasia. Here we show that constitutive activation of WNT/β-catenin signalling resulting from down-regulation of SFRP2 is the most frequent molecular alteration found in 68% of APA. We further show that β-catenin plays an essential role in the control of basal and Angiotensin II-induced aldosterone secretion, by activating *AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2* transcription. This relies on both LEF/TCF-dependent activation of *AT1R* and *CYP21* regulatory regions and indirect activation of *CYP21* and *CYP11B2* promoters, through increased expression of the nuclear receptors NURR1 and NUR77. We finally show that nutritional inhibition of β-catenin can lower aldosterone levels in a mouse model of adrenal-specific constitutive WNT activation. Altogether these data show that aberrant WNT/β-catenin activation is a prominent cause of APA development and provide the basis for therapeutical targeting of this pathway in this disease.

INTRODUCTION

Adrenal autonomous secretion of aldosterone also called primary aldosteronism (PA) is the main cause of secondary hypertension with a prevalence of 6 to 13% of hypertensive patients [1,2]. In 95% of the cases, this pathology is caused by adrenal aldosterone-producing adenomas (APA) or bilateral hyperplasia [3]. Clinical management of PA essentially relies on surgical resection and/or treatment with mineralocorticoids antagonists to minimize hypertension [4,5]. However, complete normalisation of blood pressure is rarely achieved and mineralocorticoids antagonists are associated with adverse endocrine side effects [6]. Although new promising treatments such as aldosterone synthase inhibitors are emerging [7,8], identification of the molecular aetiology of PA is essential to allow the development of more specific and more efficient drugs. Multiple molecular alterations such as down-regulation of TASK channels [9,10] or circadian clock deregulation [11] have been proposed to play a role in the establishment of PA but their clinical relevance is still unclear. Recent data suggest that the development of a subset of APA is associated with mutations in the *KCNJ5* gene, which cause dysfunction of the Kir3.4 potassium channel, resulting in increased steroidogenic capacities of adrenocortical cells [12–15]. However, the role of *KCNJ5* mutations in increasing proliferation and favouring tumour development is still controversial [14,16]. Also, *KCNJ5* mutations are only found in about 40% of patients with sporadic PA [13,15,17,18]. Therefore the molecular mechanisms underlying the majority of APA remain elusive.

We have recently shown that transgenic mice with specific constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex presented with primary aldosteronism [19]. Here, we have investigated the hypothesis that aberrant WNT pathway activation may play a role in the development of APA in patients.

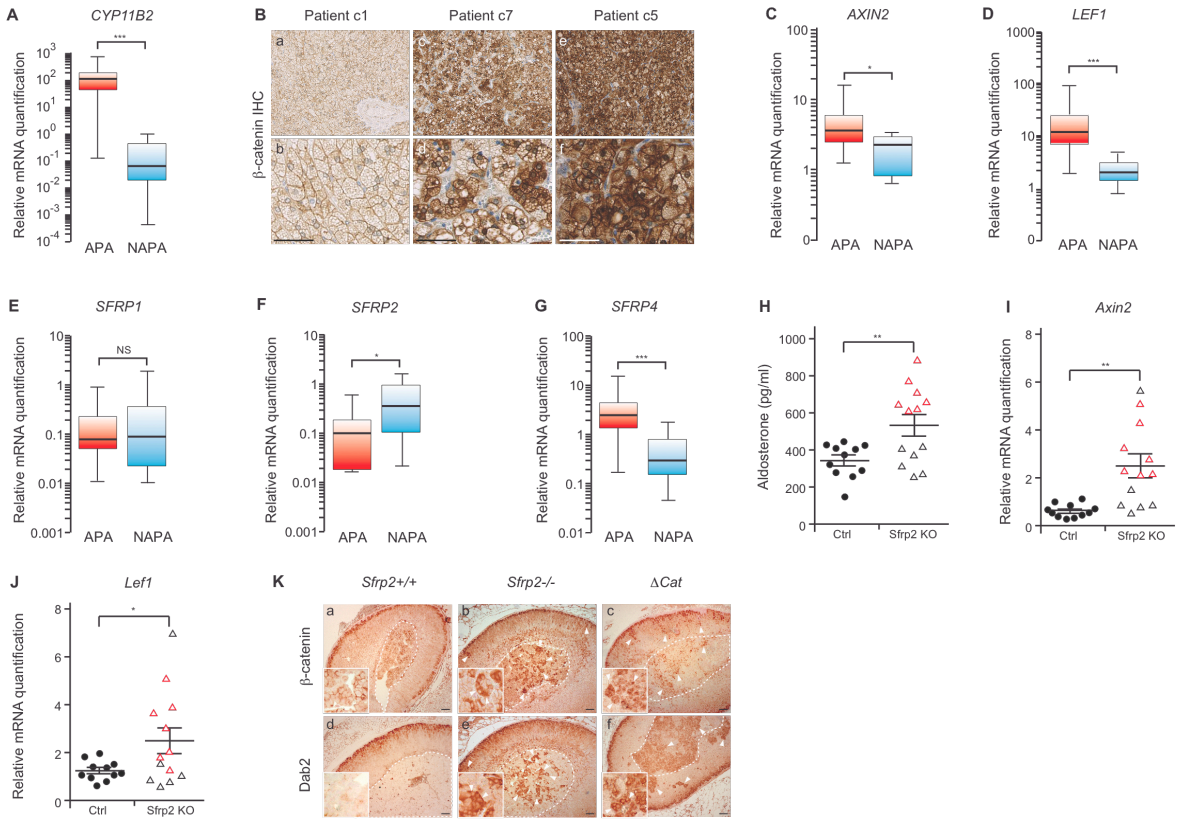


Figure 1. WNT/β-catenin pathway is activated in Conn's syndrome patients. A. *CYP11B2* is up-regulated in aldosterone-producing tumours. Aldosterone synthase *CYP11B2* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from human aldosterone-producing adenomas (APA, n=35) and non aldosterone-producing adenomas (NAPA, n=17). **B. Nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin in APA.** Immuno-histochemistry shows cytoplasmic (*e.g.* patient #c7) or nucleo-cytoplasmic (*e.g.* patient #c5) accumulation of β-catenin in 33 out of 48 APA and wild-type membrane-associated staining in 15 out of 48 APA (*e.g.* patient #c1). Scale bar is 200 µm. **C-D. Two β-catenin target genes, *AXIN2* and *LEF1* are up-regulated in APA.** *AXIN2* and *LEF1* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from APA and NAPA. **E-G. *SFRP2* is down-regulated in APA.** The expression of three members of the secreted frizzled related protein (SFRP), *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP4* was analysed by RTqPCR on mRNAs from APA and NAPA. Box plots represent the distribution of quantification for 35 APA and 17 NAPA. **H- *Sfrp2* knockout is associated with increased aldosterone production.** Plasma aldosterone concentrations were measured in control (*Sfrp2*+/+ and *Sfrp2*+/-) and homozygous *Sfrp2* knockout mice (*Sfrp2*-/-) at 13 months. **I-J Wnt signalling is increased in the adrenals of *Sfrp2* knockout mice.** *Axin2* (I) and *Lef1* (J) expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from wild-type and homozygous *Sfrp2* knockout mice. Triangles highlight individual samples with higher than normal values. **K- Genetic ablation of *Sfrp2* results in aberrant activation of β-catenin and ectopic differentiation of zona-glomerulosa cells.** Expression of β-catenin (a-c) and of the zona-glomerulosa marker Dab2 (d-f) was analysed by immuno-histochemistry in wild-type (*Sfrp2*+/+), Sfrp2 knockout (*Sfrp2*-/-) and ΔCat mice [19]. Insets were taken from the central adrenal regions. White arrowheads show ectopic Dab2 or β-catenin-positive cells. Dashed lines show the boundaries between cortex and medulla. Scale bar is 80 µm.* p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.0005; NS: Not significant.

RESULTS

WNT pathway is constitutively activated in APA

To evaluate the potential role of WNT pathway in the development of APA, we analysed the status of WNT/β-catenin pathway activation in 48 patients diagnosed with PA caused by adrenal APA. Patients' clinical and biological characteristics are described in Supplementary table 1A. The status of the tumours was confirmed by RTqPCR analysis showing overexpression of *CYP11B2* (the terminal enzyme in aldosterone biosynthesis) in APA (Fig 1A). Immunohistochemistry for β-catenin showed cytoplasmic (Fig 1B,c-d) and/or nuclear (Fig 1B,e-f) accumulation of β-catenin in 33/48 APA (Supplementary table 1B). This suggested that WNT/β-catenin signalling was activated in 68% of APA in our cohort (Fig 1B & Supplementary table 1B). To extend these observations, WNT/β-catenin pathway target genes expression was analysed by RTqPCR in cohorts of 35 APA and 17 NAPA that served as the control group because of the scarcity of normal adrenals samples. NAPA were selected on the basis of cortisol or androgen secretion and showed no histological signs of β-catenin activation (data not shown). These experiments demonstrated a significant overexpression of *AXIN2* (Fig 1C) and *LEF1* (Fig 1D) in APA compared with NAPA. We therefore concluded that canonical WNT/β-catenin signalling was activated in APA.

WNT pathway activation in APA results from down-regulation of SFRP2

So far, WNT pathway activation in adrenal tumours had been mostly attributed to activating mutations in the *CTNNB1* gene [20]. However, there were no

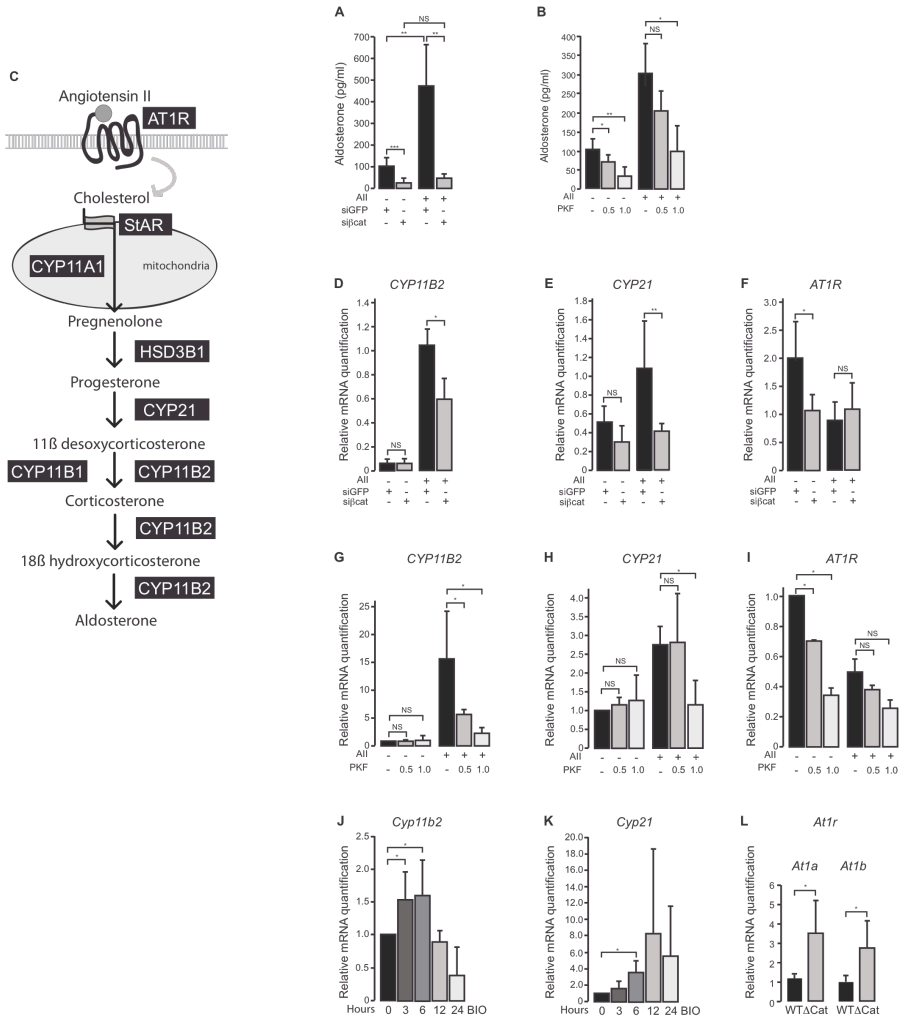


Figure 2. Wnt/β-catenin pathway controls aldosterone secretion. A. β-catenin knockdown decreases aldosterone secretion. Basal and angiotensin II-induced aldosterone concentrations were measured on the culture medium from H295R cells that were either untransfected (black bars), transfected with a control siRNA (siGFP) or transfected with a siRNA to β-catenin (siβcat) for 5 days and treated 6 hours before harvesting with or without 10 nM Angiotensin II **B. Inhibition of the transcriptional activity of β-catenin decreases aldosterone secretion.** Aldosterone concentrations were measured in the medium of H295R cells that were pre-treated for 24 hours with 0.5 or 1.0 µM PKF115-584 (Wnt/β-catenin inhibitor) followed by Angiotensin II stimulation alone or in combination with PKF115-584 for 6 hours before harvesting. **C. Schematic representation of aldosterone biosynthesis pathway.** AT1R: Angiotensin II Type 1 Receptor, StAR: Steroidogenic Acute Regulatory, CYP11A1: CYtochrome P450 cholesterol Side Chain Cleavage, 3ß-HSD: 3β-hydroxysteroid dehydrogenase, CYP21: CYtochrome P450 21-hydroxylase, CYP11B1: CYtochrome P450 11β-hydroxylase, CYP11B2: CYtochrome P450 aldosterone synthase. **D-F. β-catenin knockdown decreases basal AT1R expression and angiotensin II-induced *CYP11B2* and *CYP21* expression**. *AT1R, CYP21* and *CYP11B2* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNAs from H295R cells transfected with a control siRNA (siGFP) or a siRNA to β-catenin (siβcatenin) in basal condition or after 6 hours 10 nM angiotensin II treatment. Bars represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments performed in triplicate ± standard deviation. **G-I. Inhibition of the transcriptional activity of β-catenin down-regulates *CYP11B2*, *CYP21* and *AT1R* expression.** *AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2* expression levels were analysed by RTqPCR on mRNA from H295R cells that were pre-treated for 24 hours with 0.5 or 1.0 µM PKF115-584 followed by 10 nM Angiotensin II stimulation alone or in combination with PKF115-584 for 6 hours, before harvesting. Bars represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments performed in triplicate ± standard deviation. **J-K. *Cyp11b2* and *Cyp21* are up-regulated by activation of the Wnt/ßcatenin pathway**. *Cyp11b2* and *Cyp21* expression levels were analyzed by RTqPCR on mRNAs from the mouse Y1 adrenocortical cells that were induced with 500 nM of BIO, an activator of Wnt/β-catenin signalling for 6 hours. Bars represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments ± standard deviation. **L- At1r expression is increased in the adrenals of mice with constitutive β-catenin activation.** Expression of the two mouse *At1r* genes (*At1a* & *At1b*) was analysed by RT-qPCR on mRNAs extracted from 10 month-old wild-type (n=6) and ΔCat (n=6) mice.* p<0.05; ** p<0.005; NS: Not significant.

such mutations in our cohort of 19 APA for which genomic DNA was available (data not shown). This result was in agreement with a recent report showing no activating *CTNNB1* mutations in 41 APA [21]. We thus evaluated the possibility of an association between WNT pathway activation and *KCNJ5* mutations. Out of the 19 β-catenin positive tumours that were available for sequencing, 9 were mutant for *KCNJ5* (47%). However, 6/9 (67%) of the β-catenin negative tumours were also mutant for *KCNJ5* (Supplementary table 1B). This strongly suggested that a mechanism other than *KCNJ5* mutations was involved in canonical WNT/β-catenin pathway activation in APA. In an attempt to identify WNT regulators that may be relevant to APA development, we compared expression levels of known WNT regulators in 6 APA and 4 normal adrenals by cDNA micro-array analysis (Supplementary Figure 1). Interestingly, this approach showed significant down-regulation of

SFRP1, *2* and *4*, three members of the SFRP (Secreted Frizzled related Protein) family of WNT signalling inhibitors, in APA. These factors have the ability to bind and titrate WNT ligands and their down-regulation has been shown to stimulate WNT pathway activation in tumours [22]. To further identify SFRPs that could specifically be associated with aldosterone secretion, we analysed expression of *SFRP1*, *SFRP2* and *SFRP4* by RTqPCR in our cohort of 35 APA in comparison with NAPA. In these experiments, *SFRP1* expression levels were not altered (Fig 1E), whereas *SFRP4* expression was significantly increased in APA (Fig 1G). These observations suggested that these two SFRPs were unlikely to be involved in increased WNT signalling in APA. In contrast, *SFRP2* expression was significantly downregulated in APA compared with NAPA (Fig 1F). This suggested that it could be directly involved in the establishment of deregulated WNT signalling and subsequent hyperaldosteronism in APA patients. To further explore this hypothesis, we analysed plasma aldosterone concentrations in 13 month-old *Sfrp2* knockout mice [23]. Homozygous mutant mice had significantly elevated aldosterone plasma levels (Fig 1H). This was correlated with increased Wnt signalling as shown by increased mRNA accumulation of *Axin2* (Fig 1I) and *Lef1* (Fig 1J) in *Sfrp2-/-* adrenals. Interestingly, plasma aldosterone concentration was significantly correlated with *Axin2* mRNA accumulation (Spearman r = 0.4834, p= 0.0167) and the majority of individuals with higher than normal aldosterone concentrations (red triangles, Fig 1H) also had higher than normal *Lef1* mRNA accumulation (red triangles Fig 1J), even though correlation analysis did not reach significance (data not shown). We further confirmed these observations by immuno-histochemical analysis of β-catenin and Dab2, a molecular marker of zona-glomerulosa [24]. Consistent with the endocrine and molecular phenotypes, immuno-histological analysis of *Sfrp2* knockout adrenals showed ectopic β-catenin (Fig 1K,b *vs* 1K,a) and Dab2-positive cells (Fig 1K,e *vs* 1K,d) within the adrenal cortex and central adrenal region, which was reminiscent of the phenotype of ΔCat mice with adrenal-specific constitutive β-catenin activation (Fig 1K,c and f [19]). This showed that *Sfrp2* knockout was sufficient to increase adrenal WNT signalling and aldosterone secretion. We thus concluded that down-regulation of *SFRP2* expression was a likely cause for deregulation of WNT signalling and development of APA in patients.

β-catenin controls aldosterone production at multiple levels

In order to understand the role of β-catenin in aldosterone production, we used the human adrenocortical cell line H295R that has the ability to produce aldosterone in response to its natural secretagogue, Angiotensin II. However, it spontaneously expresses a constitutive active mutant of β-catenin (S45A) [25]. We therefore decided to down-regulate β-catenin activity and to assess basal and Angiotensin II-induced aldosterone production. Transfection of H295R cells with small interfering RNAs to β-catenin induced a mean 60% decrease in β-catenin expression compared with unrelated GFP siRNA (Supplementary Figure 2A). As expected, this resulted in a significant down-regulation of *AXIN2* (Supplementary Figure 2B) and *LEF1* (Supplementary Figure 2C) target gene expression. Interestingly, down-regulation of β-catenin also resulted in a marked decrease in basal aldosterone output and completely abrogated response to Angiotensin II (Fig 2A). In order to confirm these observations, we treated H295R cells with PKF115-584, a previously published inhibitor of β-catenin transcriptional activity [26]. Consistent with our siRNA data, treatment with PKF115-584 induced a dose-dependant decrease in basal aldosterone production and markedly reduced Angiotensin II responsiveness at the highest dose (Fig 2B). We thus concluded that β-catenin was required for basal aldosterone production and that it was essential to mediate Angiotensin II response in H295R cells. To identify relevant β-catenin target genes involved in the control of aldosterone production, we analysed expression of all the genes coding proteins involved in aldosterone synthesis and of the angiotensin II Type I receptor *AT1R*, by RTqPCR (Fig 2C). Treatment with β-catenin siRNAs resulted in a decrease in Angiotensin II-induced mRNA accumulation of *CYP11B2* (Fig 2D) and *CYP21* (Fig 2E) and inhibition of basal expression of *AT1R* (Fig 2F). Similar results were obtained in cells treated with PKF115-584 (Fig 2G-I). PKF115-584 or siRNAs had no significant effect on any of the other genes that we assayed (Supplementary Figure 2D). To confirm these observations, we stimulated β-catenin activity using BIO, a known inhibitor of GSK3β, in mouse Y1 adrenocortical cells that express a wild-type version of β-catenin but do not produce aldosterone (data not shown). As expected, treatment with BIO induced a time-and dose-dependent increase in *Axin2* expression (Supplementary Figure 2F). This was associated with a significant increase in *Cyp11b2* and *Cyp21* expression after 3 and 6 hours respectively (Fig 2J-K). Unfortunately, expression of *At1r* was undetectable in Y1 cells, even in the presence of BIO (data not shown). Therefore, we resorted to analysis of *At1r* expression in our mouse model of constitutive β-catenin activation [19]. As expected, expression of both murine isoforms of *At1r* (*At1a* and *At1b*) was significantly increased in the adrenals of 10 month-old ΔCat mice, compared to their wild-type littermates (Fig 2L). Altogether

these data showed that β-catenin controlled aldosterone production by stimulating the expression of three actors that play an essential role in its synthesis.

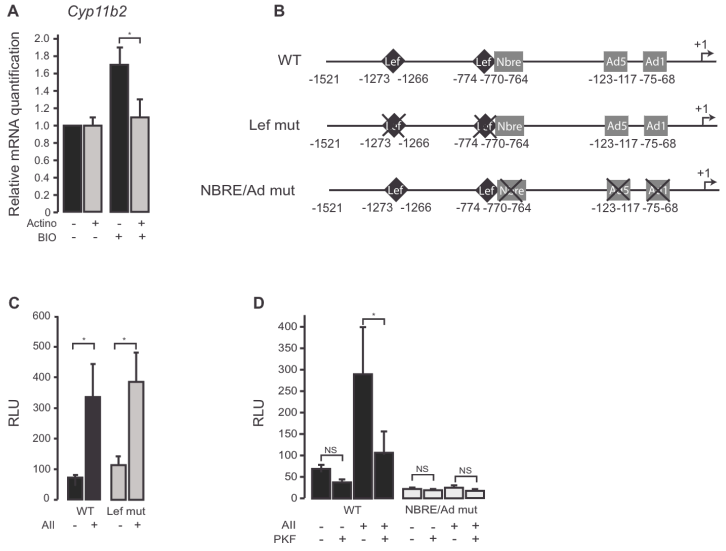


Figure 3. β-catenin regulates transcription of CYP11B2 independently of LEF/TCF binding sites. A. Wnt/β-catenin activation induces transcription of *Cyp11b2*. *Cyp11b2* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells stimulated by 500 nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D (transcription inhibitor) for 6 hours before harvesting. **B. Schematic representation of human CYP11B2 promoter.** WT plasmid encompasses 1521 bp of wild-type human CYP11B2 promoter regions upstream of the luciferase reporter gene (WT). In Lef Mut plasmid two putative LEF/TCF sites (-768/-774, -1266/-1273) predicted by *in silico* analysis were mutated. In the NBRE/Ad mut plasmid, one NBRE (-764/-770) and two Ad sites (-68/-75, -117/-123) that were previously shown to bind NGF1B nuclear receptors were mutated. **C. Mutagenesis of LEF/TCF sites does not alter CYP11B2 basal and angiotensin II-stimulated promoter activity.** H295R cells were transfected for 24 h with WT or Lef mut plasmid and stimulated for 6 hours with 10 nM Angiotensin II before relative luciferase activity (RLU) was quantified in protein extracts. **D. Mutagenesis of NBRE and Ad sites abolishes *CYP11B2* induction by Angiotensin II and prevents repression by PKF-115-584.** Relative luciferase activity (RLU) was measured in H295R transfected with WT or NBRE/Ad mut plasmids for 16 hours. They were then pre-treated for 24 hours with 1.0 µM PKF115-584 and treated for 6 hours with either 1.0 µM PKF115-584 or 10nM Angiotensin II alone or a combination of both. Bars represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments performed in triplicate ± standard deviation. * $p<0.05$; NS: Not significant.

β-catenin controls CYP11B2 expression indirectly

CYP11B2 is the terminal and one of the rate-limiting enzymes for aldosterone synthesis. β-catenin mostly acts as a transcription coactivator by interacting with transcription factors such as LEF/TCF. We thus evaluated the possibility that β-catenin controlled *CYP11B2* expression at the transcriptional level. For this, Y1 cells were treated with BIO in the presence or absence of actinomycin D, an inhibitor of transcription. RTqPCR analysis showed that induction of *Cyp11b2* expression by BIO was completely abrogated by actinomycin D, suggesting that β-catenin stimulated *Cyp11b2* transcription (Fig 3A). Computer-assisted analysis of human *CYP11B2* regulatory regions identified two putative LEF/TCF binding sites at -768/-774 and -1266/-1273 (Fig 3B & Supplementary Figure 5). To assess the role of these putative sites in *CYP11B2* promoter activity, we transfected wild-type or mutated constructs of *CYP11B2* regulatory regions in H295R cells (Fig 3B). As previously published, the wild-type promoter drove luciferase expression in H295R cells and strongly responded to Angiotensin II stimulation (Fig 3C, WT). Surprisingly, mutation of both putative LEF1 binding sites (Fig 3B) had no effect on basal promoter activity or on Angiotensin II responsiveness (Fig 3C, Lef mut), suggesting that β-catenin was not acting on *CYP11B2* promoter regions through interaction with LEF/TCF binding sites. The nuclear receptors NURR1 (NR4A2) and NUR77 (NR4A1) are essential regulators of *CYP11B2* expression in the adrenal [27]. We thus evaluated the effect of the three previously published NUR binding sites on *CYP11B2* promoter activity and on its ability to respond to β-catenin. Treatment of H295R cells with the WNT antagonist PKF115-584 inhibited both basal and Angiotensin II induced *CYP11B2* promoter activity, confirming that the effect of β-catenin on CYP11B2 expression was essentially transcriptional (Fig 3D, WT). Interestingly, mutation of the three NUR binding sites (Fig 3B) not only abrogated promoter response to Angiotensin II but also prevented PKF115-584-mediated repression of promoter activity (Fig 3D, NBRE/Ad mut). This strongly suggested that the effect of β-catenin on *CYP11B2* regulatory regions was mediated by nuclear receptors of the NUR family. Consistent with this hypothesis, β-catenin knockdown resulted in a significant decrease in *NURR1* (Fig 4A) and *NUR77* (Fig 4B) basal and Angiotensin II-induced expression at the mRNA (Fig 4A-B) and protein level (Fig 4A-B and Supplementary Figure 2E) in H295R cells. Conversely, expression of both nuclear receptors was significantly induced by BIO in Y1 cells (Fig 4C-D). Consistent with these observations, mRNAs for *NURR1*, the most β-catenin sensitive member of the NUR family in our *in vitro* experiments, were significantly increased in APA compared with NAPA (Fig 4E). To further analyse the mechanism involving β-catenin in NUR

induction, we treated Y1 cells with both BIO and actinomycin D. Actinomycin D abrogated induction of *Nurr1* and *Nur77* mRNA accumulation by BIO (Fig 4G-H), suggesting that β-catenin acted by stimulating transcription from *Nurr1* and *Nur77* promoters. Sequence analysis of *NURR1* regulatory regions identified two putative Lef/Tcf binding sites at -57/-61 and +67/+71 that were conserved in mouse and human (Supplementary Figure 4). Such binding sites were not identified in *NUR77* regulatory regions. However, a recent publication showed that β-catenin could stimulate human *NUR77* expression *in vitro* by associating with c-Jun/c-Fos proteins at at four AP1 binding sites (-3/+4, -26/-32, -169/-175 and -189/-195) that were conserved in mouse and human [28] (Supplementary Figure 5). To confirm binding of β-catenin to these regulatory regions, we performed chromatin immuno-precipitation (ChIP) experiments in H295R cells. β-catenin bound to both *NURR1* (through LEF/TCF sites) and *NUR77* (through AP1 sites) promoters in untreated cells (Fig 4I-J). Consistent with our expression analysis data, binding of β-catenin was markedly diminished after incubation with PKF115-584 (Fig 4I-J). To further confirm these observations, we performed similar ChIP experiments with whole adrenal glands from wild-type or ΔCat mice. Binding of β-catenin to Lef/Tcf or Ap1 sites was almost undetectable in wild-type adrenals and was markedly increased in ΔCat adrenals, in which β-catenin was constitutively activated (Fig 4K-L). This was correlated with increased expression of *Nur77* in the adrenals of ΔCat compared with wild-type mice (Supplementary Fig 6). Altogether, these experiments showed that β-catenin could control expression of both nuclear receptors *in vitro* and *in vivo*. It further suggested that the effect of β-catenin on *CYP11B2* expression could be mediated by NURR1 and NUR77. To confirm this hypothesis, NUR binding to *CYP11B2* promoter regions was analysed by *in vitro* and *in vivo* ChIP experiments. In H295R cells, NURR1 and NUR77 bound to the proximal Ad1 and Ad5 sequences (Fig 4M, top panel) and to a lesser extent to the distal NBRE sequence (Fig 4M, bottom panel). In both cases, NUR binding was inhibited by the Wnt inhibitor PKF115-584 (Fig 4M). Although the NUR response elements previously described in human *CYP11B2* regulatory regions were not strictly conserved in mouse *Cyp11b2* regulatory regions, sequence analysis identified a putative Sf-1

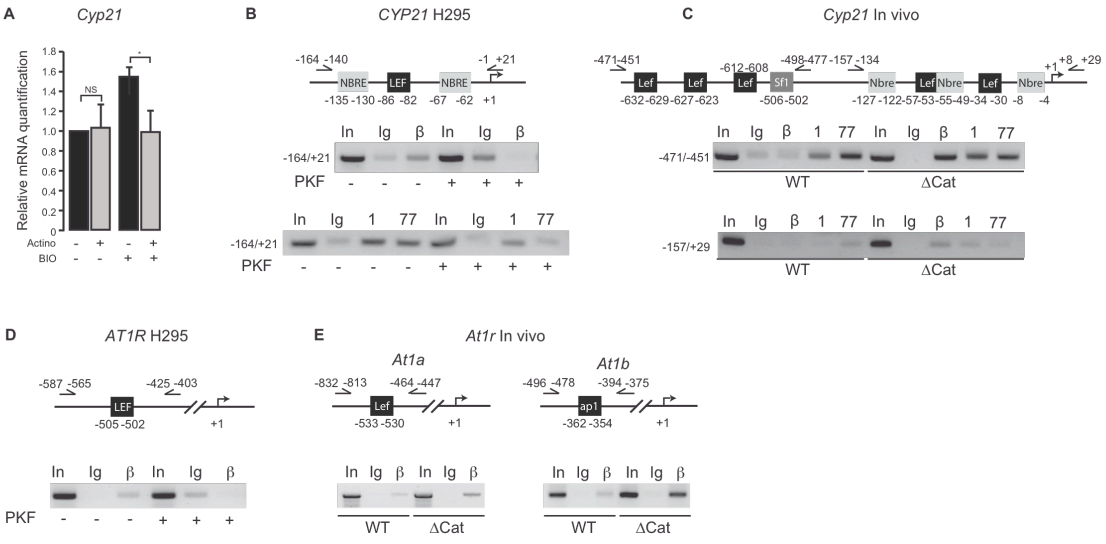


Figure 5. β-catenin stimulates *CYP21* and *AT1R* expression. A. β-catenin induces transcription of *Cyp21*. *Cyp21* expression was analyzed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells stimulated by 500 nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D for 6 hours. Bars represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments performed in triplicate ± standard deviation. **B**. **β-catenin and NURs binding to *CYP21* promoter is inhibited by PKF115-584.** H295R cells were treated as described in Figure 4 and sheared chromatin was immunoprecipitated with 5 µg of a control immunoglobulin (Ig), 5 µg an antibody to βcatenin (β, top panel), 5 µg an antibody to NURR1 (1, bottom panel) or 5 µg of an antibody to NUR77 (77, bottom panel). PCRs were performed with primers flanking one putative LEF/TCF binding site and one NBRE. **C. β-catenin and Nurr1 binding to mouse *Cyp21* promoter is increased in ΔCat adrenals.** Adrenals from 6 wild-type and 6 ΔCat mice were fixed and the sheared chromatin was immunoprecipitated with 5 µg of a control immunoglobulin (Ig), 5 µg of an antibody to β-catenin (β), 5 µg of an antibody to Nurr1 (1) or 5 µg of an antibody to Nur77 (77). PCRs were performed with one set of downstream primers flanking a combination of putative Lef/Tcf, Nbre and Sf-1 binding sites (top panel) and one set of upstream primers flanking putative Lef/Tcf binding sites (bottom panel). **D. β-catenin binding to *AT1R* promoter is inhibited by PKF115-584.** H295R cells were treated as described above and sheared chromatin was immunoprecipitated with 5 µg of a control immunoglobulin (Ig) or 5 µg of an antibody to β-catenin (β). PCRs were performed with primers flanking one putative LEF/TCF binding site. E. **β-catenin binding to *At1a* and *At1b* promoters is increased in ΔCat adrenals.** Adrenals from 6 wild-type and 6 ΔCat mice were fixed and the sheared chromatin was immunoprecipitated with 5 µg of a control immunoglobulin (Ig), or 5 µg of an antibody to β-catenin. PCRs were performed with one set of primers flanking a putative Lef1 binding site in *At1a* promoter (left panel) and one set of primers flanking one putative Ap1 site in *At1b* promoter (right panel). Positions in the three cartoons are relative to the transcription start site. In all ChIP experiments "In" refers to 10% of the amount of chromatin that was loaded in each immunoprecipitation and serves as a reference (10% Input).* $p<0.05$; NS: Not significant.

response element (+156/+162, also known to bind Nur proteins) downstream of the TSS (Transcription Start Site) and two potential nuclear-receptor binding sites (-174/-150, -233/-247) upstream of the TSS (Supplementary Figure 3). *In vivo* ChIP experiments showed binding of both Nurr1 and Nur77 to the proximal Sf-1 response element region in wild-type adrenals extracts (Fig 4N, top panel). It also showed binding of Nur77 and to a lesser extent of Nurr1 to the distal sites (Fig 4N, bottom panel). Binding of Nurr1 and to a lesser extent Nur77 to the proximal Sf-1 response region was increased in ΔCat adrenals (Fig 4N). There was also a mild increase in Nurr1 binding to the distal element, whereas Nur77 binding was not altered in ΔCat adrenals (Fig 4N). Collectively, these data strongly suggested that β-catenin controlled *CYP11B2* expression indirectly, through stimulation of *NURR1* and *NUR77* transcription.

Control of CYP21 and AT1R expression involves direct and indirect mechanisms

We then addressed the mechanisms of CYP21 regulation. As for *Cyp11b2*, induction by BIO in Y1 cells was abrogated by incubation with actinomycin D, suggesting that the effect of β-catenin on *Cyp21* expression was transcriptional (Fig 5A). Computer-assisted promoter analysis identified one putative LEF/TCF binding site (-82/-86) and two putative NUR response elements (-130/-135, -62/-67) upstream of the TSS in both human and mouse *CYP21* (Supplementary Figure 7). ChIP analysis in H295R cells showed binding of both β-catenin (Fig 5B, top panel) and NURR1/NUR77 (Fig 5B, bottom panel) to this promoter region. Binding of these three transcriptional activators was disrupted by PKF 115-584 (Fig 5B). This suggested that β-catenin could control expression of *CYP21* both directly (by interacting with LEF/TCF factors) and indirectly by stimulating NUR expression. Sequence analysis of mouse *Cyp21* regulatory regions identified four non-conserved distal (-629/-632, -623/-627, -608/-612, -370/-374) and three proximal putative Lef/Tcf binding sites (-142/-146, -53/-57, -34/-30) as well as one putative Sf-1 (-280/-285) and four putative proximal Nur binding sites (-189/-194, -122/-127, -49/-55, -4/-8) (Supplementary Figure 7). In wild-type mice, β-catenin, Nurr1 and Nur77 bound to the distal (Fig 5C, top panel) and to a lesser extent to the proximal regions (Fig 5C, bottom panel). Binding of β-catenin and *Nurr1* to the distal and proximal regions was increased in ΔCat mice compared with wild-type (Fig 5C). Altogether, these experiments showed that *CYP21* was both a direct and indirect target of β-catenin in human adrenocortical cells and in mouse adrenals in vivo.

We finally addressed the regulation of *AT1R* expression by β-catenin. *In silico* analysis of *AT1R* regulatory regions showed one putative LEF/TCF binding site on human *AT1R* promoter. This site was conserved in mouse *At1a* regulatory regions (Supplementary Figure 8), but not in mouse *At1b* promoter, which harboured one putative Ap1 binding site (Supplementary Figure 9). ChIP analysis showed binding of β-catenin in a region surrounding the putative LEF binding site (-502/-505) on human *AT1R* promoter in H295R cells. As expected, binding was markedly diminished by PKF115-584 treatment (Fig 5D). In mouse adrenals, ChIP analysis showed binding of β-catenin to the regions surrounding the putative Lef and Ap1 binding sites on *At1a* and *At1b* promoters, respectively (Fig 5E). This was markedly increased in ΔCat, compared with wild-type adrenals (Fig 5E). This strongly suggested that β-catenin could directly control *AT1R* expression in human and mouse adrenocortical cells.

Quercetin inhibits Wnt signalling and aldosterone production *in vivo*

Altogether, our data showed that β-catenin played a central role in the control of aldosterone production and that its constitutive activation resulted in primary hyperaldosteronism. We took advantage of our mouse model of constitutive β-catenin activation to evaluate the possibility that Wnt inhibition could lower aldosterone secretion *in vivo*. For these experiments, we fed ΔCat mice with a control diet or a diet enriched with 0.2% of quercetin, an isoflavonoid known to inhibit β-catenin transcriptional activity in cell culture [29]. After 90 days on the specific diets, the control ΔCat group showed no difference in plasma aldosterone concentration (Fig 6A). In contrast, mice receiving the quercetin-enriched diet showed a significant reduction in plasma aldosterone concentration (Fig 6A). This was correlated with decreased expression of the Wnt target gene *Lef1* (Fig 6B). Interestingly, quercetin treatment had no influence on plasma corticosterone concentration (Supplementary Figure 10). We thus concluded that dietary inhibition of β-catenin in a mouse model of primary hyperaldosteronism could result in a specific reduction of aldosterone production.

DISCUSSION

Our study provides strong evidence that WNT/β-catenin signalling is aberrantly activated in 68% of APA in a cohort of 48 patients, which is the most frequent molecular alteration reported in aldosterone producing adenomas, to our knowledge. The observation that mice with adrenal-specific constitutive activation of β-catenin displayed primary hyperaldosteronism suggested that aberrant WNT signalling may be driving the development of APA [19]. Here, using a combination of *in vitro* and *in vivo* experiments, we show that β-

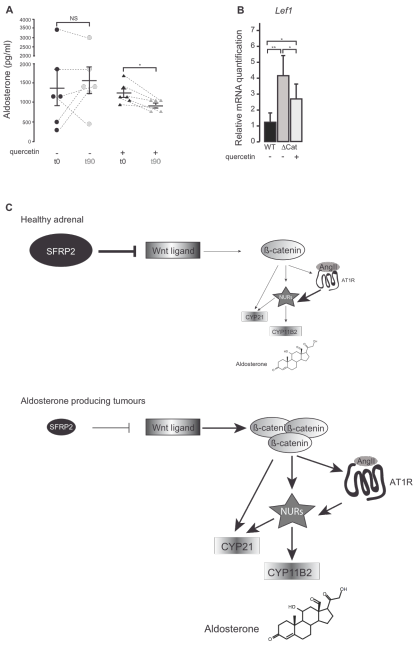


Figure 6. Dietary Wnt inhibition decreases aldosterone production in a mouse model of primary hyperaldosteronism. A. Quercetin treatment decreases aldosterone concentration in ΔCat mice. Plasma aldosterone concentrations were measured in a cohort of 10 month-old ΔCat mice before initiation of the diet (day 0), and after 3 months on the standard (n=6) or 0.2% quercetin-enriched diet (n=6). The *p* value was calculated using paired Student's *t* test * p<0.05; NS: Not significant. **B. β-catenin target gene, *Lef1* is down-regulated by the quercetin-enriched diet**. *Lef1* expression was evaluated by RTqPCR on mRNAs extracted from the adrenals of the aforementioned ΔCat mice after the specific diets. Bars represent the mean relative quantification (RqΔCat/WT) of 6 individual adrenals ± standard deviation. * p<0.05; ** p<0.005; NS: Not significant. **C. Synthetic representation of the main findings of this study.** In a healthy adrenal (top panel), WNT signalling is maintained at a basal level by the action of SFRP2 (and presumably other actors of WNT signalling). Aldosterone secretion is stimulated by angiotensin II through a cascade involving binding of angiotensin II to its receptor AT1R, which stimulates NURR1 and NUR77 (NURs) expression. These in turn, control the expression of CYP21 and CYP11B2, two enzymes essential for aldosterone production. Whether β-catenin plays a role in the control of aldosterone production in a healthy adrenal is unknown. In aldosterone producing tumours (bottom panel), down-regulation of SFRP2 results in uncontrolled WNT/β-catenin activation (68% of APA). β-catenin is constitutively bound to the promoters of AT1R, NURR1, NUR77. This results in increased expression of these genes, which in turn stimulates expression of CYP21 and CYP11B2, leading to increased production of aldosterone.

catenin is essential for both basal and angiotensin II-induced aldosterone production. We further show that this function of β-catenin relies on its transcriptional activity, which stimulates expression of three major actors of aldosterone synthesis, *i.e. AT1R*, *CYP21* and *CYP11B2*, through direct and indirect mechanisms (Fig 7C). We also confirm the essential role of β-catenin in the establishment of primary hyperaldosteronism, by demonstrating that nutritional inhibition of β-catenin activity by quercetin can decrease aldosterone production in a mouse model of constitutive Wnt activation. Finally, we show that there is no obvious association between *KCNJ5* mutations and activation of WNT signalling, suggesting that the two pathways act independently in APA and may promote formation of different types of tumours. Altogether these data show that abnormal WNT pathway activation is a prominent cause of primary hyperaldosteronism in patients. Interestingly, we and others have shown that β-catenin can stimulate proliferation of adrenocortical cells in culture and *in vivo* [19,30–32]. It is therefore tempting to speculate that β-catenin promotes the formation of aldosterone producing adenomas through both deregulation of adrenocortical cells endocrine activity and increased proliferation.

Our analysis of *CTNNB1* gene sequence failed to identify any activating mutations in APA, which is in line with previously published data [21]. Active β-catenin, identified by nucleo-cytoplasmic staining in immuno-histochemistry is found mostly restricted to the adrenal zona glomerulosa in wild-type mice [19] and in healthy subjects [21]. Furthermore, mice with genetic ablation of Wnt4 ligand have impaired aldosterone production at birth [33]. Therefore, it could be postulated that deregulated expression of factors responsible for WNT pathway activation and/or restriction in healthy zona glomerulosa, would result in aberrant WNT signalling and subsequent APA development. Here, we show that expression of *SFRP2*, one of the members of the SFRP family of secreted WNT inhibitors [34], is decreased specifically in APA compared with both normal adrenals and non-aldosterone secreting adenomas. Furthermore, we demonstrate that 13 month-old *Sfrp2* knockout mice have significantly increased plasma levels of aldosterone, which is correlated with increased Wnt signalling and ectopic differentiation of zona glomerulosa cells. Although we can not rule out that multiple WNT pathway alterations are required to achieve constitutive β-catenin activation and subsequent hyperaldosteronism, this strongly suggests that down-regulation of SFRP2 is an essential contributor to increased WNT signalling and subsequent uncontrolled aldosterone production in patients with APA.

Metabolic syndrome and obesity are associated with primary hyperaldosteronism and high blood pressure [35]. Interestingly, i*n vitro* experiments have shown that adipocyte-conditioned culture medium could stimulate aldosterone production by H295R cells [36,37]. Although the exact nature of the adipocyte-secreted factors has not been determined, this effect could inhibited by the addition of SFRP1 protein to the culture medium, suggesting that it could be dependent on WNT ligands [38]. It is therefore tempting to speculate that our findings may extend well beyond the context of aldosterone producing adenomas and could also account for deregulated aldosterone production in obese patients.

The involvement of β-catenin in the control of steroidogenesis in the ovary relies on physical and functional interactions with the nuclear receptor Sf-1 [39,40]. In the present paper, we have identified a novel molecular mechanism in which β-catenin stimulates expression of the NGFIB family

members *NURR1* and *NUR77*, which in turn stimulate expression of *CYP21* and *CYP11B2* by binding to their promoter regions. NUR77 was previously identified as a target gene of β-catenin in colon cancer lines [28]. Here we extend these findings to the adrenal cortex *in vitro* and *in vivo*. We also show that NURR1, another member of the NGFIB family of nuclear receptors, is a target for β-catenin. Interestingly, both NUR77 and NURR1 have been shown to inhibit the activity of β-catenin either by inducing its degradation [41] or by decreasing its activity as a transcriptional coactivator [42]. These observations are suggestive of a regulation loop in which β-catenin induces NGFIB family members expression which in turn negatively feedback on the transcriptional activity of β-catenin. Our mechanistic findings are thus likely to extend to a number of tissues such as the pancreas, lung or cervix in which both β-catenin and NGFIB nuclear receptors have been involved in tumourigenesis [43–45].

Treatment of a majority of primary hyperaldosteronism cases relies on mineralocorticoid receptor antagonists. However, most of the time, these inhibitors do not achieve normalisation of blood pressure and are associated with endocrine side effects, which decrease patients' compliance with treatment [4–6]. Here, we provide evidence that inhibition of β-catenin activity could help normalise aldosterone production in APA patients. Indeed, we show that a diet enriched with 0.2% of quercetin is an efficient means to inhibit excess aldosterone production in a mouse model of β-catenin-induced primary hyperaldosteronism. Quercetin is the most abundant dietary flavonoid endowed with the capacity to inhibit multiple intracellular signalling pathways, amongst which β-catenin interaction with LEF/TCF [29,46]. Although we cannot rule out effects that are independent of β-catenin, we show inhibition of Wnt signalling in the adrenals of transgenic mice that received the quercetin-enriched diet. Interestingly, increased quercetin consumption is associated with a decrease in blood pressure in animal models [47] and in hypertensive patients [48]. Although multiple molecular mechanisms have been proposed to account for these activities [48], we propose that some of the hypotensive effects of quercetin may be mediated by inhibition of WNT signalling and aldosterone secretion in the adrenal cortex. Although the normal dietary intake of quercetin in human (0.07 – 0.56 mg/kg/day) is much lower than in our mouse model (320 mg/kg/day) it is important to note that high plasma levels of quercetin can be achieved by intravenous infusion, in the absence of adverse effects in patients [46]. Whether this could be used as a treatment for primary aldosteronism remains to be determined.

In conclusion, our data provide novel molecular insights that account for a majority of aldosterone producing adenomas in patients. They show that aberrant WNT pathway activation plays a central role in the aetiology of this disease and suggest that it may be a relevant pharmacological target to allow normalisation of aldosterone production in patients with APA.

ONLINE METHODS

Patients

We obtained formalin-fixed and paraffin-embedded adrenals through the COrtico- et MEdullo-surrénale Tumeurs Endocrines (COMETE) network from thirty one patients and seventeen patients who had undergone surgery for APA at Hôpital Européen Georges Pompidou and Cochin Hospital, respectively (Plan Hospitalier de Recherche Clinique Grant AOM06179 to the COMETE-INCa network). The clinical and biological characteristics of the patients are summarized in supplementary table 1A. Methods for screening and criteria for diagnosing primary hyperaldosteronism and APA were in accordance with institutional guidelines. For controls, we selected seventeen secreting NAPA, which were diagnosed in the Endocrinology Department of Cochin Hospital. These did not have nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin, which was considered as the criteria for absence of constitutive Wnt pathway activation. Our retrospective transcriptome analyses were performed with the datasets from six APA and four control adrenals of the Cochin/COMETE cohort that were previously analysed on cDNA micro-arrays [49]. These analyses were carried out using "R" (http://www.r-project.org/). The LIMMA test was used for group comparisons (LIMMA R package) and *P* values were adjusted using the Benjamini-Hochberg correction method. All data are available on ArrayExpress Web site (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress, experiment E-TABM-311, samples CIT-HS-ACT-EC-ACA17, CIT-HS-ACT-EC-ACA19, CIT-HS-ACT-EC-ACA29, CIT-HS-ACT-EC-ACA39, CIT-HS-ACT-EC-ACA40, CIT-HS-ACT-EC-ACA42, CIT-HS-ACT-EC-NA1, CIT-HS-ACT-EC-NA2, CIT-HS-ACT-EC-NA3, CIT-HS-ACT-EC-NA4). Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR) analyses were performed on the same six APA and eleven NAPA as well as on 29 additional APA from the HEGP/COMETE cohort and 6 NAPA from the Cochin/COMETE cohort. All patients gave written informed consent to participate to the study.

Immuno-histochemistry

Immunohistochemistry for β-catenin and Dab2 was performed on tissues embedded in paraffin as previously described [25,32]. For patients' samples, the entirety of β-catenin-stained sections was

examined. Immunohistochemical labelling was evaluated by a trained pathologist for the presence of membrane, cytoplasmic and nuclear staining by a qualitative assessment. The intensity of staining was not scored.

Mice

All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare (protocols CE 76-12 & CE 77-12). Sfrp2 mice (on a Sv129EV/C57Bl6 mixed background) were kindly provided by Dr Brendan Lee and were previously described [23]. ΔCat mice (on a pure C57Bl6 background) were generated in our lab and were previously characterised [19]. Littermate control animals were used in all experiments. *Sfrp2* knockout mice were fed a standard diet (SAFE, U8958v106). Blood was collected by retro-orbital puncture in 2µl EDTA at different time points and used for plasma aldosterone concentration measurement. Individual increases in plasma aldosterone were found as early as 7 months but were only significant in the knockout group at 13 months (data not shown). After the experiment, mice were euthanized by decapitation and blood was collected on vacuum blood collection tubes (VF-053STK, Terumo). Adrenals were either frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% PFA. Ten month-old ΔCat mice were fed with either a standard control diet (Safe, A03) or a 0.2% quercetin-enriched diet (based on Safe A03) for 3 months. Blood and tissues were collected and processed as described above.

Cell culture

Human adrenocortical cancer H295R cell line was grown as previously described with DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (S1800-500, Biowest), 2mM L-Glutamine (25030, Gibco), 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin and 1X Insulin Transferrin Selenium (41400-045, Gibco). Mouse adrenocortical tumour Y1 cell line was grown with DMEM/Ham's F12 supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (S1800-500, Biowest), 2mM L-Glutamine (25030, Gibco), 50 U/ml Penicillin, and 50 mg/ml Streptomycin.

Statistical analyses

Unless otherwise stated, statistical analysis of RTqPCR, western-blot and transfection data was performed with GraphPad Prism5 software, using unpaired Student's *t* test. For samples with unequal variances, the *t* test was corrected with Welch's correction. In these instances, significance was also confirmed by Mann-Whitney's test.

Plasmids

Reporter plasmids hCYP11B2 (pB2-1521) WT and NBRE/Ad5/Ad1M were kindly provided by William E. Rainey (Department of Physiology, Medical college of Georgia, Augusta, GA, USA) [27]. For the LEF/TCF mutant construct, the two LEF/TCF sequence 5'-CTTTGCTG-3' (-1266/-1273) and 5'-CTTTGAAAAGG-3' (-768/-774) were changed to 5'-agggtcgG-3' and 5'-agggtccAAGG-3' respectively, using the QuickChange II kit (Stratagene). All bases were numbered relative to hCYP11B2 transcriptional start site.

Cell transfections and treatment

H295R cells were seeded at a density of 8.105 cells per well in 6 wells-plates. The day after seeding, 1 µg of reporter plasmid DNA was transiently transfected using Transfast reagent (Promega) according to manufacturer's instructions. Following transfection, cells were incubated with 2ml minimum medium for 16 hours (DMEM/F12 medium containing L-Glutamine and antibiotic). Where indicated, cells were pre-treated for 24-hours with 1.0 µM PKF115-584 (El-198-0100, Enzo Life Sciences), followed by 10 nM of Angiotensin II (A9525, Sigma Aldrich) alone or in combination with PKF115-584 for 6 hours. Cells were then lysed in reporter lysis buffer (E3971, Promega) and assayed for luciferase activity with the GenofaxA luciferase assay system (Yelen). All experiments were performed in triplicate and repeated at least thrice. For protein, mRNA and culture medium analyses, experiments were performed in a similar fashion without initial transfection of the reporter plasmid.

To evaluate the effect of Wnt pathway inhibition, H295R cells were seeded in 6 wells plates at a density of 8.105 cells per wells-plates and cultured in minimum medium overnight before pre-treatment for 24-hours with 0.5 or 1.0 µM PKF115-584. After this, the cells were treated with 10nM of Angiotensin II alone or in combination with PKF115-584 for 6 hours.

For knockdown experiments, siRNA sequences targeting ßcatenin 5'-AGCUGAUAUUGAUGGACAG-3' and GFP 5'-ACUACCAGCAGAACACCCCUU-3' were used. H295R cells were seeded in 6 wells plates at a density of 4.105 and siRNAs were transfected twice at 24h intervals, using Effectene reagent (Quiagen) according to manufacturer's protocol. Five days after the first transfection, cells were deprived of serum overnight and were induced for 6 hours with 10 nM angiotensin II.

For induction of Wnt pathway activity, Y1 cells were seeded in 6-well plates at a density of 3.105 cells per well and cultured in minimum medium overnight, before treatment with 500nM BIO (B1686, Sigma) in the presence or absence of 100 nM actinomycin D for the indicated amount of time.

Reverse Transcription quantitative PCR

Cells were harvested in lysis buffer and total mRNAs were extracted using RNAII nucleotide

extraction kit (Macherey Nagel) according to manufacturer's instructions. One microgram mRNA was reverse transcribed for 1 hour at 42°C with 5 pmoles of random hexamers primers, 200 units reverse transcriptase (M-MLV RT, M1701, Promega), 2 mM dNTPs and 20 units RNAsin (N2615, Promega). One microliter of a one-tenth dilution of cDNA was used in each quantitative PCR. This was conducted with Taqman® probes of the Gene Expression Assay pool (Applied Biosystems, see below) or MESA GREEN Mastermix Plus (RT-SY2X-06+WOUFL, Eurogenetec). Primers and probes are listed in supplementary tables 2 and 3.

Western Blot

Thirty micrograms of total proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE gel, transferred onto nitrocellulose and detected with an antibody to β-catenin 1/1000 (610153, BD Biosciences Pharmingen), NURR1 1/500 (sc-991, Santa Cruz) and NUR77 1/1000 (sc-990, Santa Cruz). Expression of these proteins was normalized to expression of β-actin (A2066, Sigma) and signals were quantified with Quantity One (BioRad).

Chromatin Immunoprecipitation

H295R cells were seeded at a density of 5.106 per 10 cm dish and treated with 1.0 µM PKF115-584 for 30 hours. Following treatment, they were fixed by addition of 1% formaldehyde to the culture medium for 10 min. Fixation was stopped by addition of 125µM glycine. Cells were rinsed three times with PBS and scraped in CLB buffer (5mM PIPES, 85mM KCl, 0.5% NP40). After centrifugation, nuclei pellet was resuspended in NLB buffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1% SDS) and incubated on ice for 45 minutes. Chromatin was then sheared to an average length of 500pb and submitted to immunoprecipitation with 5µg of antibodies directed against β-catenin (610153, BD Biosciences Pharmingen), NURR1 (sc-991, Santa Cruz), NUR77 (sc-990, Santa Cruz) or non-immune IgG controls (Millipore). Chromatin-antibodies complexes were collected with protein A or G magnetic beads (Dynabeads, Invitrogen). After seven washes in IP buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.5% NP40, 1% Triton X-100), beads were resuspended in 100 µl of 10% Chelex slurry and DNA was recovered as previously described [50].

For in vivo ChIP, six WT or ΔCat adrenals gland were cross-linked in PBS with 1% formaldehyde for 10 minutes at room temperature. Fixation was stopped with 125µM glycine and adrenals were rinsed three times with PBS. Tissues were then disrupted in CLB with a glass tissue grinder. The next steps of the protocol were as described above for H295R cells. Primers pairs used for ChIP are listed in supplementary table 4.

Hormone measurement

Aldosterone and corticosterone were quantified in plasma and cell medium using an aldosterone ELISA kit (CAN-ALD-450, Diagnostic Biochem Canada) and a corticosterone 3H kit (MP biomedicals) according to manufacturers' instructions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank B. Terris at Cochin Tumour Bank and the COMETE (COrtico MEdullo Tumeurs Endocrines) network for the provision of APA tissue samples, Dr Brendan Lee (Baylor College of Medicine, Houston, USA) for kindly allowing us to use *Sfrp2* knockout mice and Dr William E Rainey (Medical college of Georgia, USA) for providing *CYP11B2* reporter constructs. We also wish to thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Philippe Mazuel for animal care. This work was supported through institutional support from Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne and grants from Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (grant #SFI 20101201397 and young researcher grant to AB), La Ligue Contre le Cancer, Allier committee, Agence Nationale pour la Recherche (ANR Physio 2007, No.: 013-01; Genopat 2008, No.: 08-GENO-021), Fondation pour la Recherche sur l'Hypertension Artérielle (AO 2007), Fondation pour la recherche médicale (ING20101221177), Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC grant AOM 06179), INSERM and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

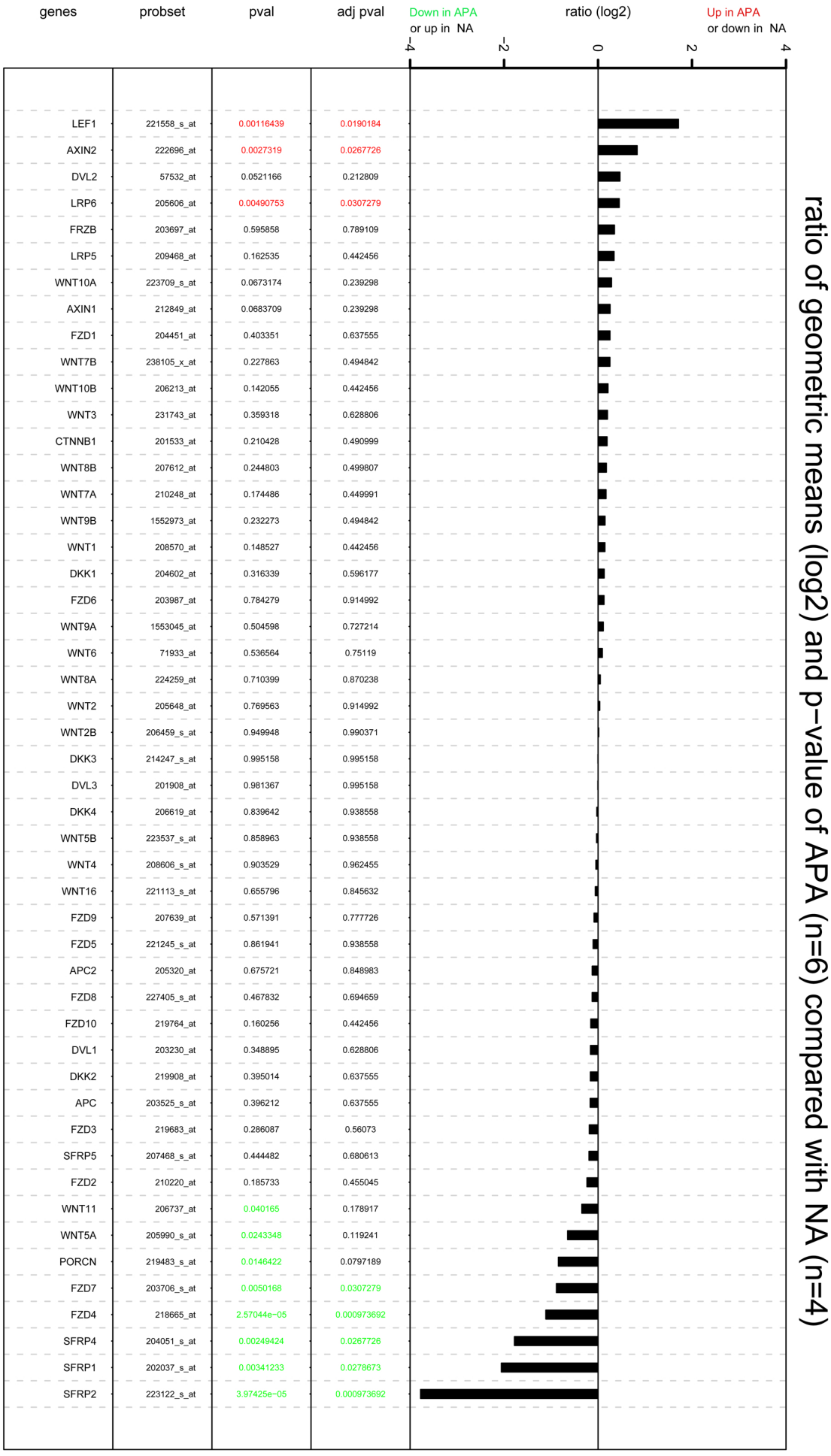
AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AB wrote some of the manuscript, conceived some and performed most experiments, CD performed some experiments, BR analysed micro-array data and conceived some experiments, FT analysed histological slides, SB analysed histological slides, BS-C contributed some patients' samples, M-CZ contributed some patients' samples, P-FP contributed some patients' samples, SS provided help with Sfrp2 KO, MP provided help with Sfrp2 KO, HL contributed some patients' samples, IS-B helped with some experiments, MB contributed some patient's samples, GA contributed micro-array data, A-ML-M conceived some experiments, JB contributed some patient's samples and conceived some experiments, AM conceived some experiments, PV wrote the manuscript, conceived and performed experiments.

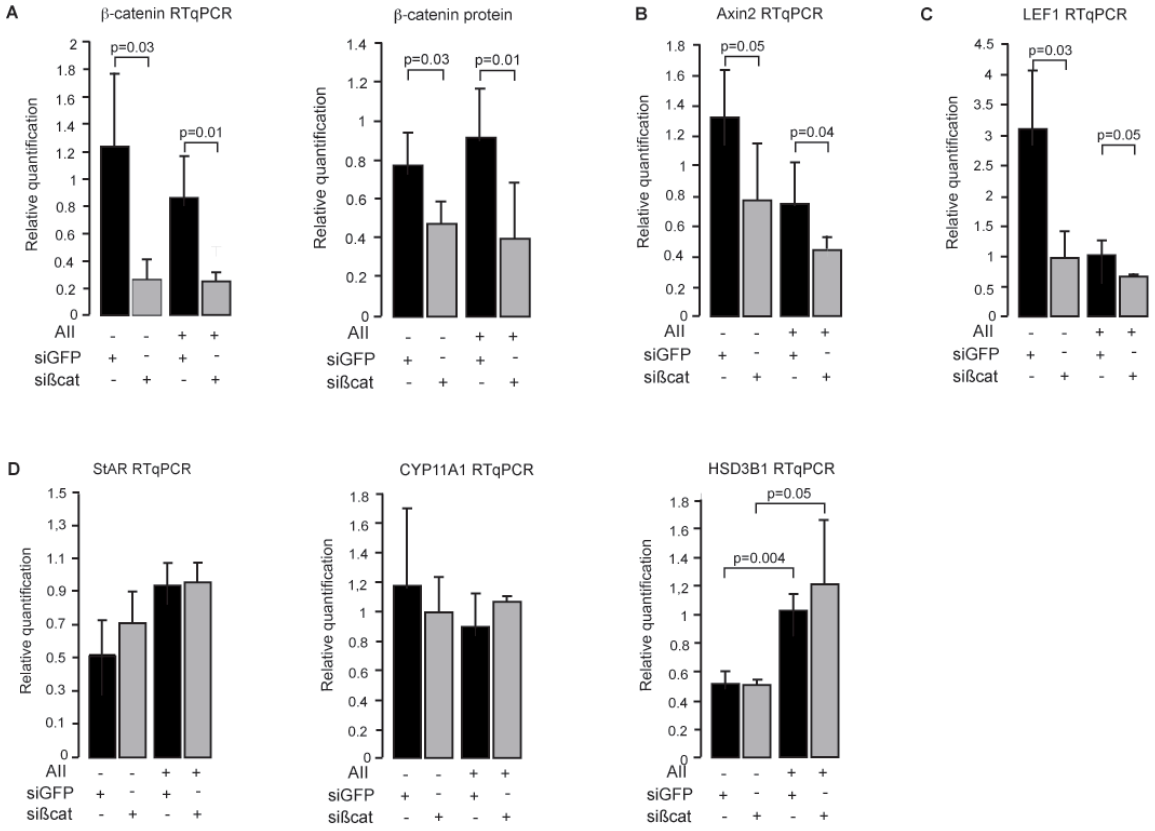
1. Plouin, P.-F., Amar, L. & Chatellier, G. Trends in the prevalence of primary aldosteronism, aldosterone-producing adenomas, and surgically correctable aldosterone-dependent hypertension. *Nephrol. Dial. Transplant.* **19**, 774–777 (2004).
2. Amar, L., Plouin, P.-F. & Steichen, O. Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism. *Orphanet J Rare Dis* **5**, 9 (2010).
3. Fagugli, R. M. & Taglioni, C. Changes in the perceived epidemiology of primary hyperaldosteronism. *Int J Hypertens* **2011**, 162804 (2011).
4. Steichen, O., Zinzindohoué, F., Plouin, P.-F. & Amar, L. Outcomes of adrenalectomy in patients

with unilateral primary aldosteronism: a review. *Horm. Metab. Res.* **44**, 221–227 (2012).
5. Rossi, G. P. D. Diagnosis and treatment of primary aldosteronism. *Rev Endocr Metab Disord* **12**, 27–36 (2011).
6. Jeunemaitre, X. *et al.* Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. *Am. J. Cardiol.* **60**, 820–825 (1987).
7. Amar, L. *et al.* Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism. *Hypertension* **56**, 831–838 (2010).
8. Calhoun, D. A. *et al.* Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial. *Circulation* **124**, 1945–1955 (2011).
9. Heitzmann, D. *et al.* Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *Embo J* **27**, 179–87 (2008).
10. Davies, L. A. *et al.* TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 2203–2208 (2008).
11. Doi, M. *et al.* Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med.* **16**, 67–74 (2010).
12. Oki, K., Plonczynski, M. W., Lam, M. L., Gomez-Sanchez, E. P. & Gomez-Sanchez, C. E. The Potassium Channel, Kir3.4 Participates in Angiotensin II-Stimulated Aldosterone Production by a Human Adrenocortical Cell Line. *Endocrinology* **153**, 4328–4335 (2012).
13. Monticone, S. *et al.* Effect of KCNJ5 Mutations on Gene Expression in Aldosterone-Producing Adenomas and Adrenocortical Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97**, E1567–1572 (2012).
14. Choi, M. *et al.* K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* **331**, 768–772 (2011).
15. Azizan, E. A. B. *et al.* Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E819–829 (2012).
16. Scholl, U. I. *et al.* Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 2533–2538 (2012).
17. Boulkroun, S. *et al.* Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* **59**, 592–598 (2012).
18. Åkerström, T. *et al.* Comprehensive re-sequencing of adrenal aldosterone producing lesions reveal three somatic mutations near the KCNJ5 potassium channel selectivity filter. *PLoS ONE* **7**, e41926 (2012).
19. Berthon, A. *et al.* Constitutive {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* **19**, 1561–1576 (2010).
20. Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J. & Val, P. Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 87–95 (2011).
21. Boulkroun, S. *et al.* Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology* **152**, 4753–4763 (2011).
22. Suzuki, H. *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* **36**, 417–22 (2004).
23. Morello, R. *et al.* Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *J. Cell. Physiol.* **217**, 127–137 (2008).
24. Romero, D. G. *et al.* Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* **148**, 2644–2652 (2007).
25. Tissier, F. *et al.* 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**, 7622–7 (2005).
26. Lepourcelet, M. *et al.* Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. *Cancer Cell* **5**, 91–102 (2004).
27. Bassett, M. H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P. C. & Rainey, W. E. The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* **18**, 279–90 (2004).
28. Wu, H. *et al.* Regulation of Nur77 expression by beta-catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells. *Faseb J* **25**, 192–205 (2011).
29. Shan, B. E., Wang, M. X. & Li, R. Q. Quercetin inhibit human SW480 colon cancer growth in association with inhibition of cyclin D1 and survivin expression through Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Cancer Invest* **27**, 604–12 (2009).
30. Doghman, M., Cazareth, J. & Lalli, E. The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, 3222–5 (2008).
31. Kim, A. C. *et al.* Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* **135**, 2593–602 (2008).
32. Drelon, C. *et al.* Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One* **7**, e44171 (2012).
33. Heikkila, M. *et al.* Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* **143**, 4358–4365 (2002).
34. Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. & Lopez-Rios, J. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* **121**, 737–46 (2008).
35. Lamounier-Zepter, V., Bornstein, S. R. & Ehrhart-Bornstein, M. Mechanisms of obesity-related hypertension. *Horm. Metab. Res.* **36**, 376–380 (2004).
36. Ehrhart-Bornstein, M. *et al.* Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14211–14216 (2003).
37. Krug, A. W. *et al.* Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human

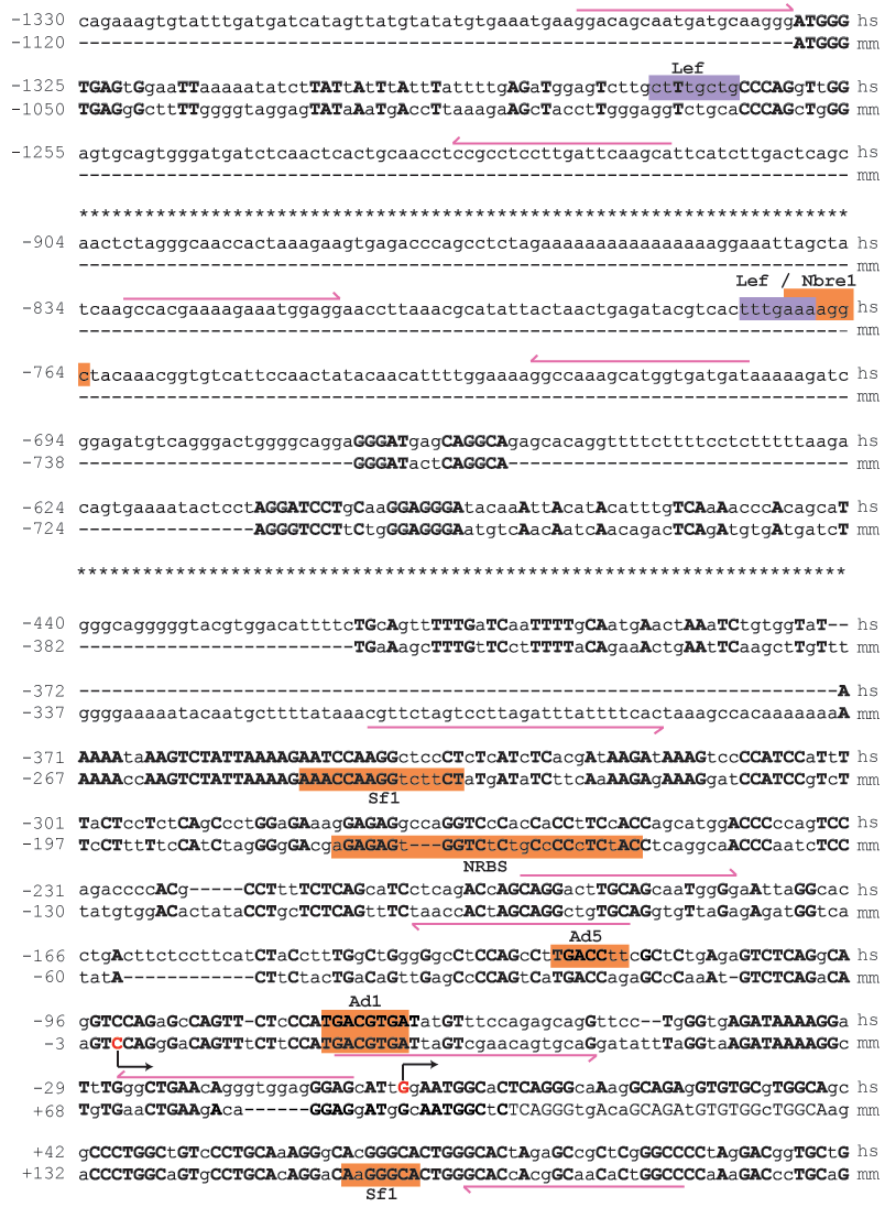
adrenocortical cells. *Int J Obes (Lond)* **31**, 1605–1616 (2007).
38. Schinner, S. *et al.* Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int J Obes (Lond)* **31**, 864–870 (2007).
39. Roy, L. *et al.* Convergence of 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A and glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling in corpus luteum progesterone synthesis. *Endocrinology* **150**, 5036–5045 (2009).
40. Parakh, T. N. *et al.* Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12435–12440 (2006).
41. Sun, Z. *et al.* Inhibition of β-catenin signaling by nongenomic action of orphan nuclear receptor Nur77. *Oncogene* **31**, 2653–2667 (2012).
42. Rajalin, A.-M. & Aarnisalo, P. Cross-talk between NR4A orphan nuclear receptors and β-catenin signaling pathway in osteoblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* **509**, 44–51 (2011).
43. Lee, S.-O. *et al.* Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth. *Cancer Res.* **70**, 6824–6836 (2010).
44. Kolluri, S. K. *et al.* Mitogenic effect of orphan receptor TR3 and its regulation by MEKK1 in lung cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 8651–8667 (2003).
45. Ke, N. *et al.* Nuclear hormone receptor NR4A2 is involved in cell transformation and apoptosis. *Cancer Res.* **64**, 8208–8212 (2004).
46. Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S. & Russo, G. L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 6–15 (2012).
47. Romero, M. *et al.* Lack of beneficial metabolic effects of quercetin in adult spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* **627**, 242–250 (2010).
48. Larson, A. J., Symons, J. D. & Jalili, T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms. *Adv Nutr* **3**, 39–46 (2012).
49. de Reynies, A. *et al.* Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* **27**, 1108–15 (2009).
50. Nelson, J. D., Denisenko, O. & Bomsztyk, K. Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* **1**, 179–185 (2006).



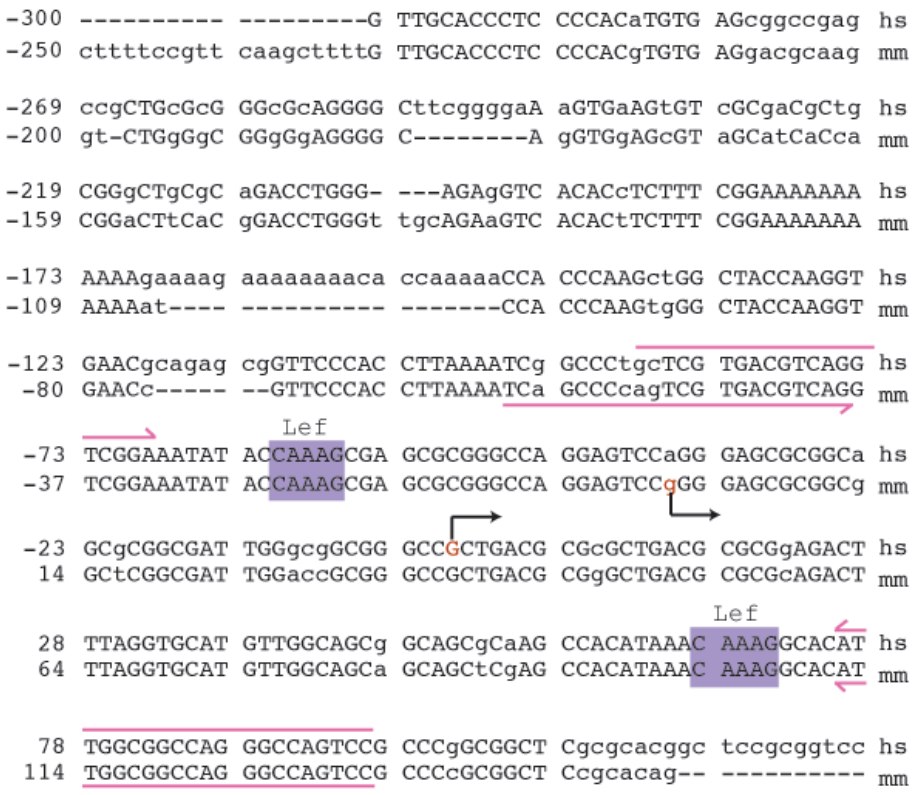
<u>Supplementary figure 1:</u> Analysis of potential WNT signalling regulators gene expression on cDNA micro-arrays. Previously published cDNA micro-arrays were analysed retrospectively for expression of WNT target genes in 6 aldosterone-producing adenomas (APA) compared with four normal adrenals (NA). The list of WNT target genes was defined with Pubmed searches and data available on the WNT Homepage (http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/). Genes were classified on the basis of their deregulation (expressed as fold up- or down-regulation), with the highest up-regulation on the left and the highest down-regulation on the right. Limma test and t-test were performed to evaluate statistical significance (bottom of the plots).



<u>Supplementary figure 2</u>: ß-catenin knockdown decreases Wnt/b-catenin pathway activation. A. ß-catenin knockdown inhibits accumulation of both ß-catenin mRNA and protein. b-catenin accumulation at the mRNA (RTqPCR, left panel) and protein levels (right panel) was evaluated in H295R cells transfected with a control siRNA (siGFP) or transfected with a siRNA to b-catenin (sibcat) for 5 days and treated 6 hours before harvesting with or without 10 nM Angiotensin II. **B-C. Expression of the ß-catenin target genes *AXIN2* and *LEF1* is down-regulated by ß-catenin knockdown.** *AXIN2* and *LEF1* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from the experiments described in A. **D. Expression of *STAR*, *CYP11A1* and *HSD3B1* is not altered by ß-catenin knockdown.** Expression of StAR, CYP11A1 and HSD3B1 was analysed by RTqPCR on mRNAs from the experiments described in A. **E. Accumulation of NURR1 and NUR77 proteins is decreased by ß-catenin knockdown.** NURR1 and NUR77 protein accumulation was analysed by Western Blot on protein extracts from the experiments described in A. **F. Expression of the ß-catenin target gene *Axin2* is induced by Wnt/ß-catenin activation with BIO.** *Axin2* expression was analysed by RTqPCR on mRNAs from Y1 cells treated with 500 nM BIO for 0, 3, 6, 12 and 24 hours. **G. *Axin2* induction by BIO is transcriptional.** *Axin2* expression was analysed by RTqPCR on mRNA from Y1 cells treated with 500nM BIO alone or in combination with 100 nM actinomycin D for 6 hours. For all experiments, bars represent the mean relative quantification of at least 4 individual experiments performed in triplicate ± standard deviation. * $p<0.05$; ** $p<0.005$; *** $p<0.0005$; NS: Not significant.

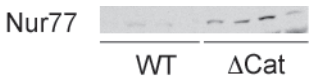


<u>Supplementary figure 3:</u> Identification of two putative Lef/Tcf binding sites in the promoter of CYP11B2. The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *CYP11B2* genes were aligned with Genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative Lef/Tcf sites, which were identified on the basis of similarity to the published consensus, are highlighted in purple. NGFIB sites are highlighted in orange. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.

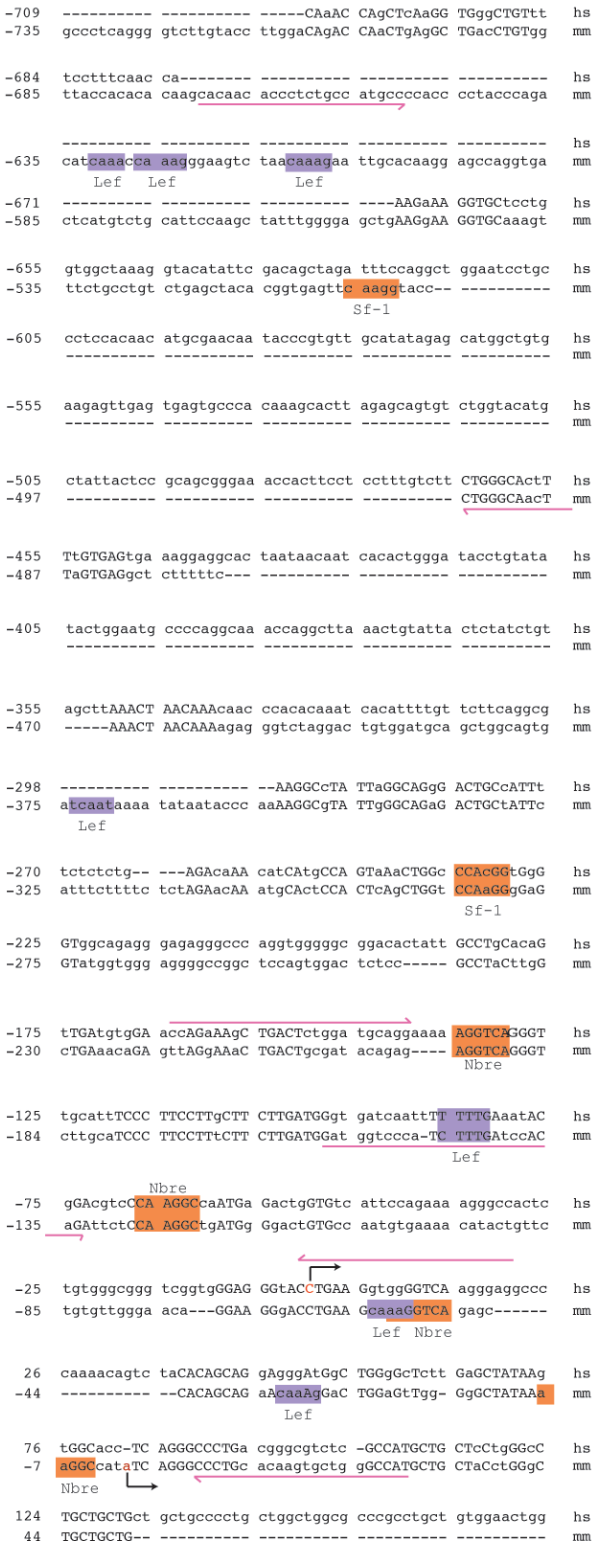


Supplementary figure 4: Identification of two putative Lef/Tcf binding sites in *NURR1* promoter. The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *NURR1* genes were aligned with Genomatix. Capital letters represent conserved bases. The two putative Lef/Tcf sites, which were identified on the basis of their similarity to the published consensus, are highlighted in purple. Pink arrows represent the primers used for ChIP anlysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.

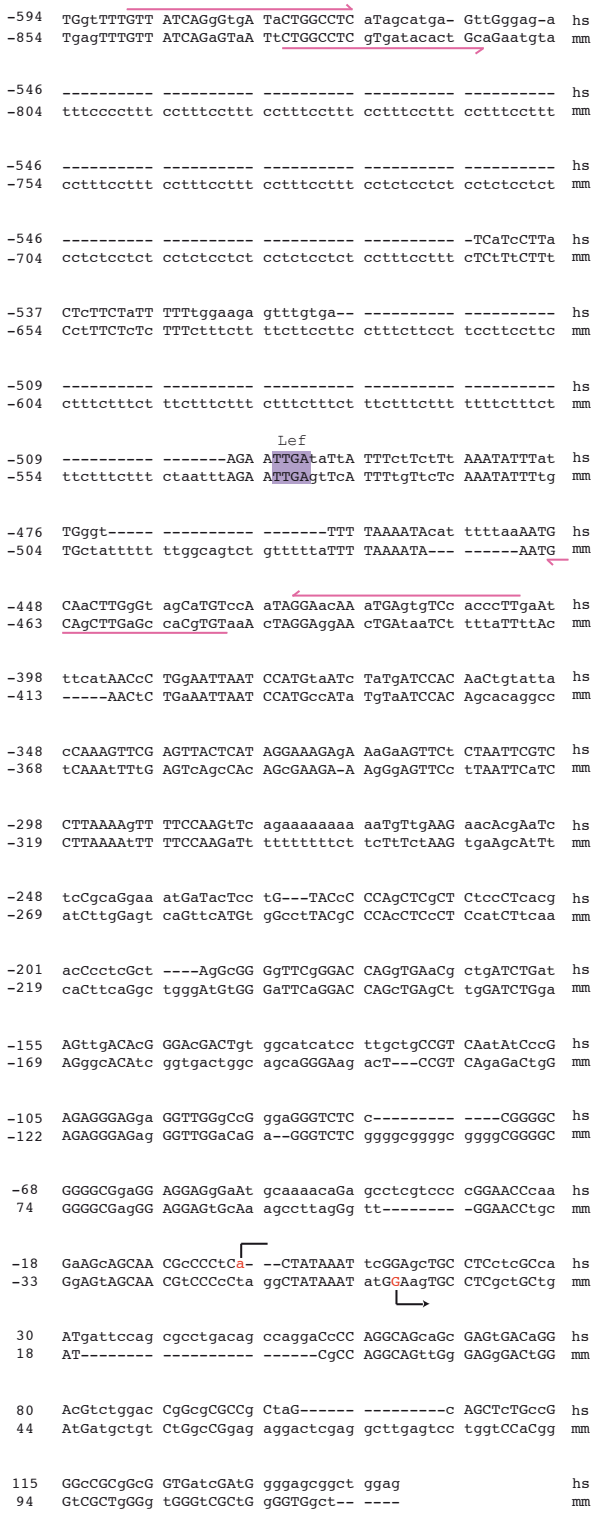
Supplementary figure 5: Identification of four AP1 sites in *NUR77* promoter. The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *NUR77* genes were aligned with Genomatix. Capital letters represent conserved bases. The four published AP1 sites are highlighted in blue. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.



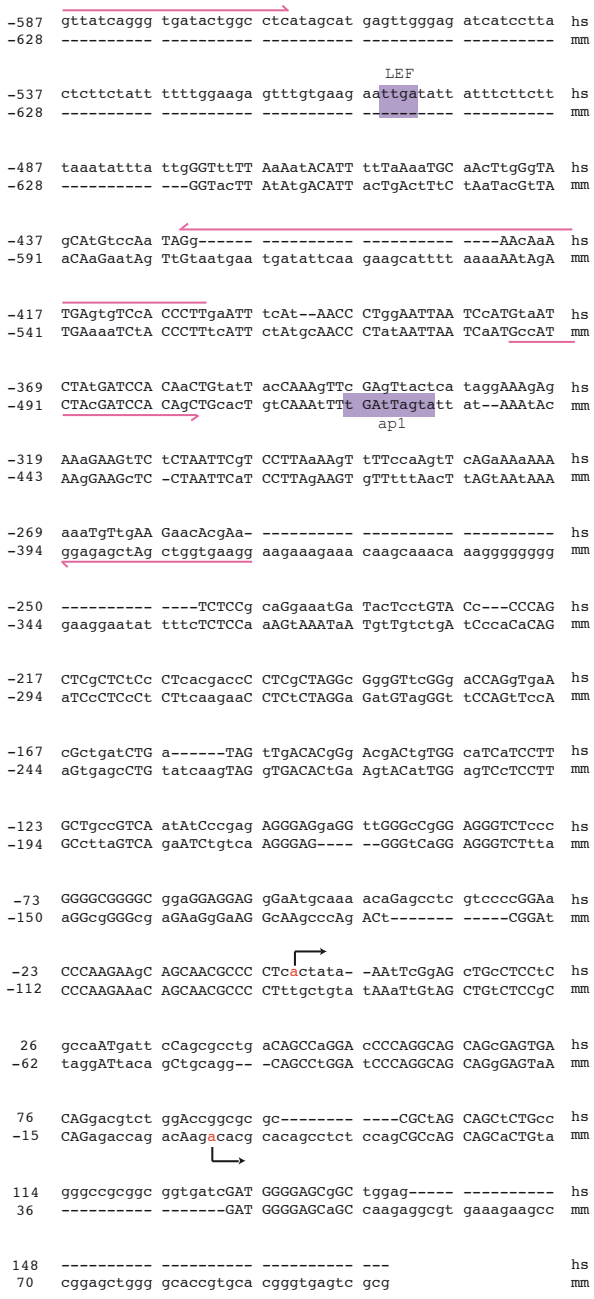
Supplementary figure 6: Up-regulation of Nur77 expression in ΔCat mice. Nurr77 expression was analyzed by Western Blot on protein extracts from 10 month-old wild type and ΔCat adrenals.



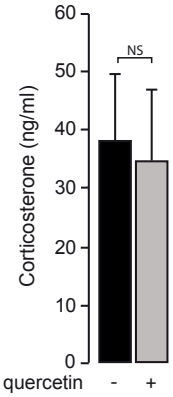
Supplementary figure 7: Alignment of mouse and human *CYP21* promoters. The promoters of Homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) *CYP21* genes were aligned with genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative Lef/Tcf and NGFIB (Nbre, Ad, Sf-1) binding sites, which were identified on the basis of their similarity to published consensus sequences are highlighted in purple and orange, respectively. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.



<u>Supplementary figure 8</u>: Identification of one putative LEF/TCF binding site in human *AT1R* and mouse *At1a* promoters. The promoters of Homo sapiens (hs, *AT1R*) and mus musculus (mm, *At1a*) *AT1R* genes were aligned with genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative LEF/TCF binding site, which was identified on the basis of its similarity to the published consensus is highlighted in purple. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.



<u>Supplementary figure 9</u>: Identification of one putative Ap1 binding site in mouse *At1b* promoter. The promoters of Homo sapiens (hs, *AT1R*) and mus musculus (mm, *At1b*) *AT1R* genes were aligned with genomatix. Capital letters represent conserved bases. The putative Ap1 binding site, which was identified on the basis of its similarity to the published consensus is highlighted in purple. Pink arrows represent the primers used for ChIP analysis in human and mouse. Positions to the left of the sequence are relative to the transcription start site.



<u>Supplementary figure 10:</u> Plasma corticosterone concentration is not altered by quercetin. Plasma corticosterone concentrations were measured in a cohort of 13 month-old ΔCat mice that were either fed a standard diet (n=6) or a 0.2% quercetin-enriched diet (n=6) for three months. Bars represent the mean relative quantification of 6 individual hormone concentrations ± standard deviation. NS: Not significant in unpaired Student's *t* test.

A

Variable	HEGP/COMETE Cohort, n= 31			COCHIN/COMETE Cohort n = 17
	Preadrenalectomy	Postadrenalectomy	*P*	Preadrenalectomy
age, y	38±8			47,5±9
Sex (male/female), %	45/55			27/73
SBP, mm Hg	152.7±25.0	135.5±19.3	0.0088	
DBP, MM Hg	90.9±13.1	87.3±11.6	0.3005	
Duration of hypertension, y	8±8			
Serum K+ level, mmol/L	3.3±0.4	4.1±0.3	<0.0001	
Urinary aldosterone, mean (range), nmol/day	118.6 (18.0 to 575.0)	24.3 (10.0 to 46.0)	<0.0001	
Active renin supine, mean (range), mU/L	2.9 (0.0 to 9.4)	15.2 (2.1 to 83.0)	<0.0001	4.74 (2 to 10)
aldosterone supine, mean (range), pmol/L	881.4 (76.0 to 2523.0)	179.6 (33.0 to 638.0)	<0.0001	729 (207 to 1290)
ARR, mean (range)	380.4 (51.0 to 1218.0)	18.2 (0.0 to 71.0)	<0.0001	
Tumor size, mean (range), mm	16 (5 to 50)		<0.0001	17 (11 to 25)

B

Patient	β-cat activation	β-cat localisation			KCNJ5 mutation			
		Mb	Cyto	Nucl	Mut KCNJ5	G151R (G/C or G/A)	T158A (Y/N)	L168R (Y/N)
07H1821	Neg	100%			N	N	N	N
07H3802	Neg	100%			Y	G/A	N	N
07H3045	Pos	60%	40%		Y	G/C	N	N
07H2542	Pos			80%	N	N	N	N
07H2414	Pos			15%	N	N	N	N
04H3014	Pos			100%	ND	ND	ND	ND
06H1194	Neg	100%			N	N	N	N
07H879	Pos	40%		60%	Y	G/A	N	N
07H1005	Pos	90%		10%	N	N	N	N
05H2197	Pos	10%	50%	40%	N	N	N	N
05H998	Pos			90%	N	N	N	N
05H1810	Pos	90%	10%		N	N	N	N
05H3987	Pos			90%	N	N	N	N
05H4008	Pos			80%	N	N	N	N
05H255	Neg	95%	5%		Y	G/A	N	N
04H1594	Neg	100%			Y	G/C	N	N
03H2897	Pos			90%	Y	G/C	N	N
03H2174	Pos	70%	30%		Y	G/A	N	N
03H1984	Neg	100%			Y	N	N	T/G
03H1967	Neg	100%			Y	G/A	N	N
02H3989	Neg	100%			N	N	N	N
02H2677	Neg	100%			Y	G/A	N	N
01H6982	Pos			100%	Y	N	N	T/G
02H3170	Pos			100%	Y	G/A	N	N
02H2630	Pos			100%	Y	G/A	N	N
05H132	N/A				N	N	N	N
03H4079	Pos	90%	10%		Y	G/C	N	N
04H767	Pos	5%	40%	55%	N	N	N	N
03H880	Pos	20%	60%	20%	N	N	N	N
04H2927	Pos	90%	10%		Y	N	N	T/G
04H1326	Pos	70%	30%		ND	ND	ND	ND
F49622	Neg	ND	0%	0%				
F64860	Pos	ND	20%	5%				
F97595	Pos	ND	40%	3%				
G45816	Pos	ND	30%	4%				
G47592	Pos	ND	60%	10%				
G53945	Pos	ND	15%	0%				
G56584	Pos	ND	30%	10%				
G73227	Pos	ND	40%	2%				
F45992	Pos	ND	25%	2%				
F88552	Pos	ND	15%	0%				
F90838	Pos	ND	30%	0%				
496907	Neg	ND	ND	ND				
590307	Neg	ND	ND	ND				
744298	Pos	ND	ND	ND				
380298	Neg	ND	ND	ND				
780399	Neg	ND	ND	ND				
13897	Pos	ND	ND	ND				

<u>Supplementary table 1</u>: Baseline characteristics in patients of HEGP/COMETE and COCHIN/COMETE cohorts. A. Biological data of patients in the cohorts used for our experiments. B. Table summarizing the qualitative analysis of b-catenin localisation in APA samples, expressed as a percentage of cells with membrane, cytoplasmic and/or nuclear b-catenin accumulation. This table also shows the mutational status for KCNJ5 in the HEGP/COMETE cohort. ND, not determined.

	Forward	Reverse
Human NURR1	5'-TGCCTGGCTGTTGGGATGG-3'	5'-GCTGGATATGCTGGGTGTC-3'
Human CYP21	5'-ACCTCAGTTTCTCCTTTATTGC-3'	5'-AGAGCCAGGGTCCTTCAC-3'
Human AT1R	5'-TCTCAGCATTGATCGATACC-3'	5'-TGACTTTGGCTACAAGCATT-3'
Human PPIB	5'-TTTCATCTGCACTGCCAAGA-3'	5'-TTGCCAAACACCACATGCT-3'
Mus musculus Sfrp4	5'-TGGAGCCACCCTTACAGGAT-3'	5'-TTCTGTAGGCTGTCCCAGGC-3'
Mus musculus Sfrp5	5'-GATGGCCTCATGGAACAGATGT-3'	5'-GCGCATCTTGACCACAAAGTC-3'
Mus musculus 36b4	5'-GTCACTGTGCCAGCTCAGAA-3'	5'-TCAATGCTGCCTCTGGAGAT-3'
Mus musculus at1ar	5'-TCACCTGCATCATCATCTGG-3'	5'-AGCTGGTAAGAATGATTAGG-3'
Mus musculus at1br	5'-TCACCTGCATCATCATCTGG-3'	5'-AGCTGGTGAGAATAATAACG-3'

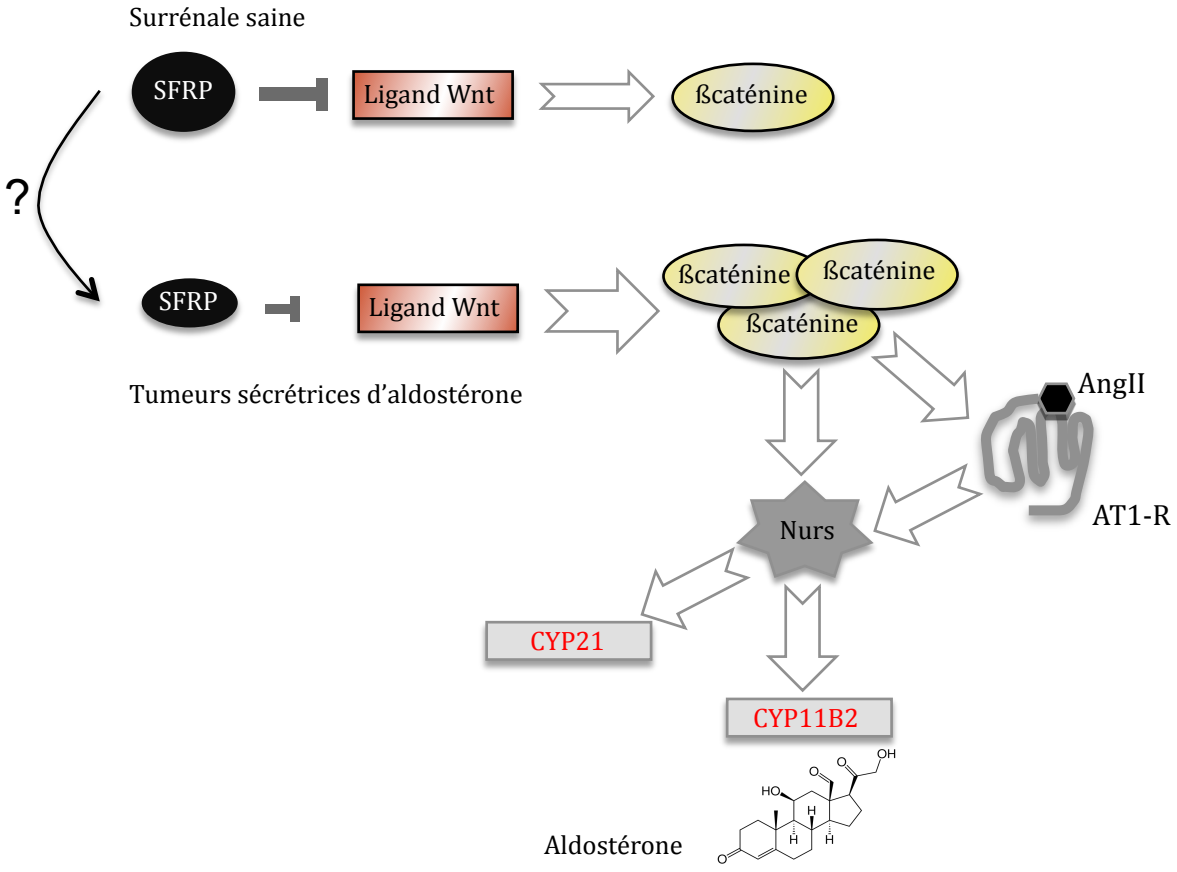
Supplementary table 2: Sequences of primers used for RTqPCR.

	Assays probes
Human CYP11B2	Hs01597732_m1
Human NUR77	Hs00374226_m1
Human SFRP1	Hs00610060_m1
Human SFRP2	Hs00293258_m1
Human SFRP4	Hs00180066_m1
Human SFRP5	Hs00169366_m1
Human DNMT3b	Hs00171876_m1
Human PPIB	Hs00168719_m1
Mus musculus Cyp11b2	Mm00515624_m1
Mus musculus Cyp21a1	Mm00487230_g1
Mus musculus Agtrap	Mm00507771_m1
Mus musculus Nr4a2	Mm00443060_m1
Mus musculus Nr4a1	Mm01300401_m1
Mus musculus Lef-1	Mm00550265_m1
Mus musculus Ppib	Mm00478295_m1

Supplementary table 3: Taqman Gene expression assays probes used for RTqPCR.

	Forward	Reverse
hsNURR1 (Lef)	5'-GCTCGTGACGTCAGGTCGGA-3'	5'-GGACTGGCCCTGGCCGCCAAT-3'
hsNUR77 (AP1)	5'-CGGGCGCGAGGAGCCTATTTATAG-3'	5'-TTTCGTAGCCTCCGCCACTGG-3'
hsCYP11B2 (NBRE)	5'-ATCATCACCATGCTTTGGCC-3'	5'-GCCACGAAAAGAAATGGAGG-3'
hsCYP11B2 (Ad5R-Ad1F)	5'-CAGGACTTGCAGCAATGGGG-3'	5'-CTCCCTCCACCCTGTTCAGCCC-3'
hsCYP21 (Lef-NBRE)	5'-CCAGAAAGCTGACTCTGGATGCAGG-3'	5'-CTCCCTTGACCCCACCTTCAGG-3'
hsAT1R (Lef)	5'-GTTATCAGGGTGATACTGGCCTC-3'	5'-CAAGGGTGGACACTCATTTGTTCC-3'
mmNurr1 (Lef)	5'-TCAGCCCCAGTCGTGACGTCAG-3'	5'-GGACTGGCCCTGGCCGCCAAT-3'
mmNur77 (AP1)	5'-CGGGCGAGAGGAAAACTATTTATAG-3'	5'-TTTCGCAGCCTCCTGCACTG-3'
mmCyp11b2 (Sf1 prox)	5'-GACGTGATTAGTCGAACAGTGCAG-3'	5'-GGCCAGTGTTGCCGTGGTGC-3'
mmCyp11b2 (Sf1 distal)	5'-CGTTCTAGTCCTTAGATTTATTTTCAC-3'	5'-GCACAGCCTGCTAGTGGTTAG-3'
mmCyp21 distal	5'-CACAACACCCTCTGCCATGCC-3'	5'-GAGCCTCACTAAGTTGCCCAGG-3'
mmCyp21 proximal	5'-GATGGTCCCATCTTTGATCCACAG-3'	5'-ATGGCCCAGCACTTGTGCAGG-3'

Supplementary table 4: Sequences of primers used for homo sapiens (hs) and mus musculus (mm) ChIP analysis. The DNA binding sites analyzed are indicated in brackets.



<u>Figure 41</u> : Schéma bilan de la régulation de la synthèse d'aldostérone par la voie Wnt/ßcaténine dans le cadre du syndrome de Conn et hypothèse de travail.

Dans une surrénale saine, nous supposons que l'activité de la voie Wnt/ßcaténine est restreinte par l'expression d'antagonistes naturels de la famille des SFRPs. Dans les tumeurs sécrétrices d'aldostérone, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression d'un des membres de cette famille, SFRP2. Cette diminution est associée avec une activation de la voie Wnt/ßcaténine, retrouvée chez 68% des patients atteints d'un hyperaldostéronisme primaire. D'autre part, nous avons démontré que cette activation de la voie Wnt/ßcaténine induit la sécrétion d'aldostérone grâce au contrôle de l'expression de trois des acteurs essentiels à cette synthèse. Ainsi, la ßcaténine se lie sur le promoteur du récepteur à l'angiotensine II, AT1R afin de réguler son expression. Elle régule aussi indirectement, l'expression de deux enzymes clés de sa voie de biosynthèse, CYP21 et CYP11B2. Pour ce faire, la ßcaténine se lie sur le promoteur de NURR1 et NUR77, deux régulateurs connus de CYP21 et CYP11B2 afin d'induire leur expression. Ces facteurs se fixent à leur tour sur le promoteur de CYP21 et CYP11B2 et induisent leur expression.

Conclusions et discussions

L'analyse de l'état de la voie Wnt/ßcaténine a permis de démontrer que son activation est un événement majeur dans l'hyperaldostéronisme primaire puisqu'elle est retrouvée dans 33 des 48 (68%) tumeurs productrices d'aldostérone analysées. D'autre part, le traitement des souris ΔCat avec un inhibiteur de la voie Wnt/ßcaténine, la quercetine diminue le taux d'aldostérone plasmatique démontrant ainsi un lien direct entre l'activation de la voie Wnt/ßcaténine et la sécrétion d'aldostérone *in vivo*. Les études *in vitro* dans les cellules H295R ont confirmé ces résultats et démontré que la ßcaténine contrôle l'expression de deux enzymes de la voie de stéroidogenèse et du récepteur à l'angiotensine II, *AT1R*. Celle-ci active l'expression de *CYP21* et *CYP11B2* indirectement en stimulant la transcription de régulateurs connus de ces enzymes, les facteurs NGFIB. D'autre part, la ßcaténine régule directement l'expression d'*AT1R* en se liant sur un site LEF/TCF présent sur son promoteur. L'ensemble de ces données démontre donc que l'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine joue un rôle clé dans le développement du syndrome de Conn grâce à sa capacité à favoriser la synthèse d'aldostérone (Figure 41) et suggère que la ßcaténine pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante dans le contexte de cette pathologie.

1) Le syndrome de Conn : une perturbation de la zonation du cortex surrénalien ?

La zonation du cortex surrénalien correspond à la mise en place de l'organisation centripète en deux zones histologiquement distinctes chez la souris, caractérisées par l'expression de *Cyp11b2* dans la zone glomérulée et de *Cyp11b1* et *Akr1b7* dans la zone fasciculo-réticulée (Mitani et al., 1999; Rainey, 1999). Dans 66% des cas d'APA, l'aldostérone est excessivement sécrétée par des cellules de type fasciculée (Boulkroun et al., 2010), ce qui suggère qu'une dérégulation de la zonation du cortex pourrait être responsable du développement d'un HP. Conformément à cette hypothèse, l'invalidation génique de *Task1* chez la souris induit une expression ectopique de CYP11B2 dans la zone fasciculée qui conduit à un hyperaldostéronisme primaire (Heitzmann et al., 2008). Le maintien du potentiel de membrane par les canaux TASK1 semble donc être important pour l'établissement d'une zonation corticale normale. Par ailleurs, nous avons montré que les cellules ectopiques qui conduisent à l'HP chez les souris ΔCat ont une double potentialité glomérulée/fasciculée qui peut être révélée par un traitement à l'ACTH (Discussion de l'article 1). L'ensemble de ces données suggère que l'hyperaldostéronisme primaire peut être considéré comme une pathologie de la zonation

corticale. Dans ce chapitre, nous allons donc nous focaliser sur le rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans le contrôle de la zonation normale du cortex surrénalien et dans l'apparition d'un HP.

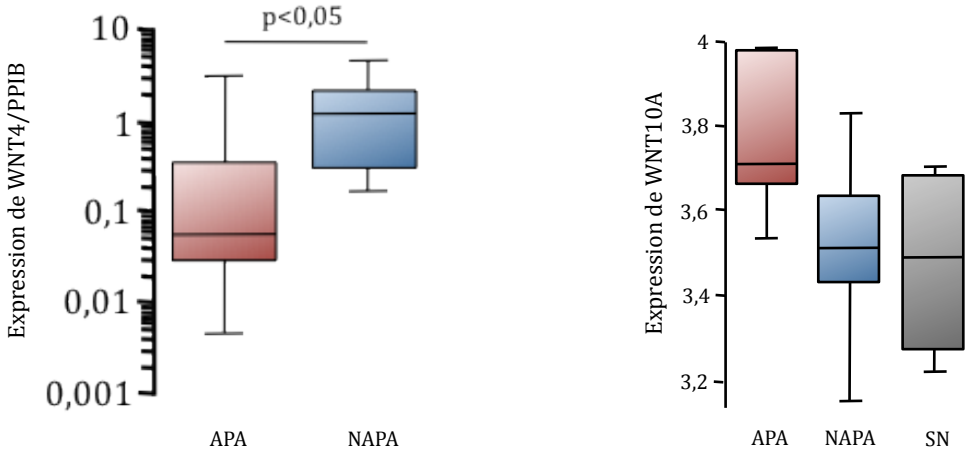
A) La voie Wnt/ßcaténine dans le syndrome de Conn et la zonation du cortex surrénalien

Dans le cortex surrénalien normal, l'activité de la voie Wnt, mise en évidence par l'accumulation nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine, est essentiellement restreinte à la zone glomérulée et sous-capsulaire (Kim et al., 2008). Dans le premier article, nous avons constaté que l'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine dans l'ensemble du cortex surrénalien induit des changements de localisation et/ou d'identité cellulaire au travers de l'activation d'un programme de différenciation glomérulée et de l'inhibition du programme de différenciation fasciculée (Article 1). Réciproquement, la diminution de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine au travers d'un traitement quercetine chez les souris ΔCat diminue la sécrétion d'aldostérone et l'expression d'un marqueur de la différenciation glomérulée, *Dab2*. Ceci suggère que la restriction de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine à la zone sous-capsulaire et glomérulée (Suwa et al., 2003; Kim et al., 2008) est nécessaire à l'établissement de la zonation et que l'absence de restriction conduit au développement d'un APA. Sur la base de l'absence de mutations activatrices de *CTNNB1* dans les APA (Article 2 et (Boulkroun et al., 2011)), nous avons émis l'hypothèse que l'activation anormale de la voie Wnt dans ce contexte résultait de la dérégulation d'acteurs impliqués dans la restriction de l'activité de la voie. Le rôle potentiel de certains de ces acteurs va maintenant être développé.

B) Acteurs potentiels de la restriction de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine, dont la dérégulation pourrait mener à un syndrome de Conn

a) Rôle potentiel des ligands WNT

Le premier point de contrôle essentiel de la voie Wnt concerne l'expression des ligands. Aucune étude systématique de leur expression n'a été conduite dans la surrénale jusqu'à maintenant. Toutefois, l'expression restreinte de *Wnt4* dans le cortex externe (Heikkila, 2002) pourrait permettre de limiter l'activation la voie Wnt/ßcaténine et la différenciation glomérulée au moment de la zonation. Le rôle potentiel de WNT4 dans la différenciation glomérulée est confirmé par des expériences d'infection de cellules cortico-surrénaliennes humaines avec un plasmide codant pour ce facteur qui conduisent à l'expression de *CYP11B2* et la sécrétion d'aldostérone (Chen and Hornsby, 2006). Ces données sont en accord avec la perte d'expression de *Cyp11b2* en période péri-natale, chez les souris présentant une invalidation génique de *Wnt4* (Heikkila, 2002). Enfin, le ligand WNT4 est surexprimé dans les cas de HP chez l'Homme



<u>Figure 42</u> : Expression de WNT4 et WNT10A dans les APA et NAPA.

A) L'expression de WNT4 a été analysée en RTqPCR par la technologie de Taqman sur les ARNm d'adénomes producteurs d'aldostérone (APA) et d'adénomes non producteurs d'aldostérone (NAPA) qui avaient été précédemment reverse transcrits. L'expression de WNT4 a été rapportée sur l'expression d'un gène de ménage codant pour PPIB. La médiane relative de l'expression de 35 APA et 14 NAPA est représentée en boite à moustaches sur un axe des ordonnées en log10. Les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student. B) L'expression de WNT10A a été analysée dans une puce transcriptomique (de Reynies et al., 2009) sur 6 APA, 11 NAPA et 4 surrénales normales (SN).

(Kuulasmaa et al., 2008), suggérant qu'il pourrait jouer un rôle dans l'étiologie des APA. Toutefois, cette surexpression de *WNT4* n'est pas retrouvée par RTqPCR sur notre cohorte de 35 APA (Figure 42). Ces données suggèrent donc que la surexpression de *WNT4* n'est pas à l'origine du développement des APA. *WNT4* étant naturellement exprimé dans la zone glomérulée, sa surexpression pourrait être retrouvée dans les APA de type glomérulée (33% des APA totaux) (Boulkroun et al., 2010) plutôt que de type fasciculée. Ainsi, la surexpression de *WNT4* serait une conséquence de la nature des cellules tumorales plutôt qu'une cause de l'activation anormale et excessive de la voie Wnt/ßcaténine retrouvée dans les APA.

WNT10A, un autre ligand de la voie Wnt dont l'expression n'a jamais été décrite dans le cortex surrénalien murin voit son expression augmenter dans les 6 APA par rapport aux 11 NAPA compris dans notre analyse transcriptomique (Figure 42). Toutefois, ces résultats n'ont, pour le moment, pas pu être confirmés par RTqPCR sur les 35 APA dont nous disposons. Le rôle des ligands Wnt dans la zonation et l'étiologie du syndrome de Conn reste donc à déterminer.

b) Rôle potentiel de la famille des sfrp/SFRP

L'expression de *sfrp1* qui est à ce jour, le seul antagoniste de la voie Wnt/ßcaténine retrouvé dans l'ensemble du cortex (Bernichtein et al., 2008), pourrait participer à la restriction de la signalisation Wnt en empêchant son activation dans la zone fasciculée. Cependant, aucun phénotype surrénalien n'a été décrit chez les souris invalidées pour *sfrp1* (Trevant et al., 2008), mais les auteurs se sont focalisés sur les défauts embryonnaires. Il serait donc intéressant de caractériser ces souris à l'âge adulte pour déterminer les conséquences potentielles de la perte de *sfrp1* sur la zonation du cortex surrénalien. Nos données issues des patients porteurs d'APA suggèrent qu'il n'est pas à lui seul un candidat dont l'inhibition peut causer le développement d'un HP. Il est toutefois intéressant de noter qu'une diminution d'expression de *sfrp1* est associée à une plus grande susceptibilité à développer des tumeurs (non sécrétrices d'aldostérone) chez la souris (Bernichtein et al., 2008). La diminution d'expression de *SFRP2* observée dans les APA fait de lui un candidat intéressant même si des expériences complémentaires détaillées dans la partie « perspectives » sont encore nécessaires pour démontrer son rôle dans la dérégulation de la voie Wnt/ßcaténine et le développement d'HP. Il est probable que la zonation ou au contraire, le développement d'un APA ne reposent pas sur un seul de ces inhibiteurs. Il serait donc intéressant de déterminer le profil d'expression de l'ensemble des membres de la famille dans le cortex surrénalien.

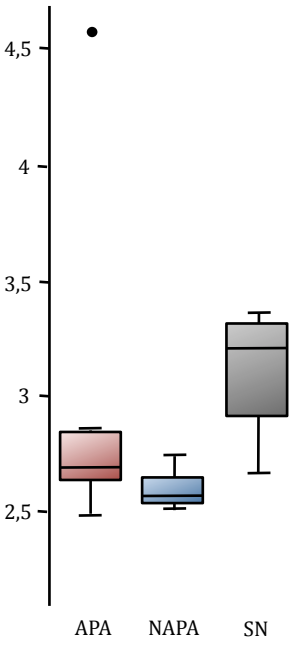


Figure 43 : Expression de DKK3 dans les APA par rapport aux NAPA et surrénales normales

Expression de DKK3 analysée dans une puce transcriptomique (de Reynies et al., 2009) sur 6 adénomes producteurs d'aldostérone (APA), 11 adénomes non producteurs d'aldostérone (NAPA) et 4 surrénales normales (SN).

c) Rôle potentiel de DKK3

DKK3 fait partie de la famille Dickkopf qui comme les protéines SFRP sont des antagonistes naturels de la voie Wnt/ßcaténine (Niehrs, 2006). Toutefois, DKK3 est un membre particulier de cette famille puisqu'il est capable à la fois d'inhiber la voie Wnt/ßcaténine indépendamment du récepteur Kremen (Nakamura and Hackam, 2010) ou de l'activer en fonction du contexte cellulaire (Nakamura et al., 2007). Il présente donc un rôle bivalent sur le contrôle de la voie Wnt/ßcaténine. Comme pour les autres membres de sa famille, la diminution d'expression de *DKK3* est associée avec le développement tumoral de nombreux tissus (Veeck et al., 2008; Lee et al., 2009) dans lesquels il semble avoir un rôle inhibiteur de la voie. Conformément à cette hypothèse, la surexpression de *DKK3* dans des cellules de cancers pancréatiques induit une diminution de la prolifération associée à une sous-expression de la ßcaténine (Gu et al., 2011). Cependant, récemment, il a été démontré que la surexpression de *DKK3* et sa délocalisation dans le cytoplasme est associée avec le cancer des cellules squameuses et la surexpression de la ßcaténine (Fujii et al., 2011). Il apparaît donc que DKK3 peut être associé aux cancers à la fois par son rôle inhibiteur ou activateur de la voie Wnt/ßcaténine. Dans les CCS, l'expression de DKK3 est diminuée par rapport aux surrénales contrôles et aux adénomes (Berthon et al., 2012) suggérant qu'il aurait plutôt un rôle inhibiteur de la voie Wnt/ßcaténine dans la cortico-surrénale. Cependant, dans la surrénale normale, *DKK3* est principalement exprimé dans la zone glomérulée où il contrôle positivement l'expression de *CYP11B2* (El Wakil and Lalli, 2011). Il semble donc que dans la surrénale, DKK3 puisse stimuler la voie Wnt et l'activité de la zone glomérulée. Conformément à cette hypothèse, son expression est augmentée dans les APA par rapport aux NAPA (Figure 43). Toutefois, ces résultats qui doivent être confirmés en RTqPCR sont à prendre avec précaution, puisque l'expression de *DKK3* est diminuée dans les APA par rapport aux 4 surrénales contrôles présentes dans la puce transcriptomique (Figure 43). Des analyses complémentaires sont donc nécessaires pour confirmer ou infirmer l'implication de DKK3 dans le développement d'APA. Néanmoins, une récente publication rapporte que l'expression de *DKK3* est augmentée chez les femelles invalidées pour *task1* qui présentent un HP mais que ceci n'induit pas de modifications de l'accumulation nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine (El Wakil et al., 2012). Il semble donc que dkk3 a un effet sur le contrôle de la sécrétion d'aldostérone mais que celui-ci est indépendant de son rôle dans le cadre de la voie Wnt/ßcaténine. La dérégulation de *DKK3* observée dans les APA peut donc participer à l'apparition d'un HP mais il ne serait pas un candidat pertinant dans la recherche des régulateurs de la restriction de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine à la zone glomérulée.

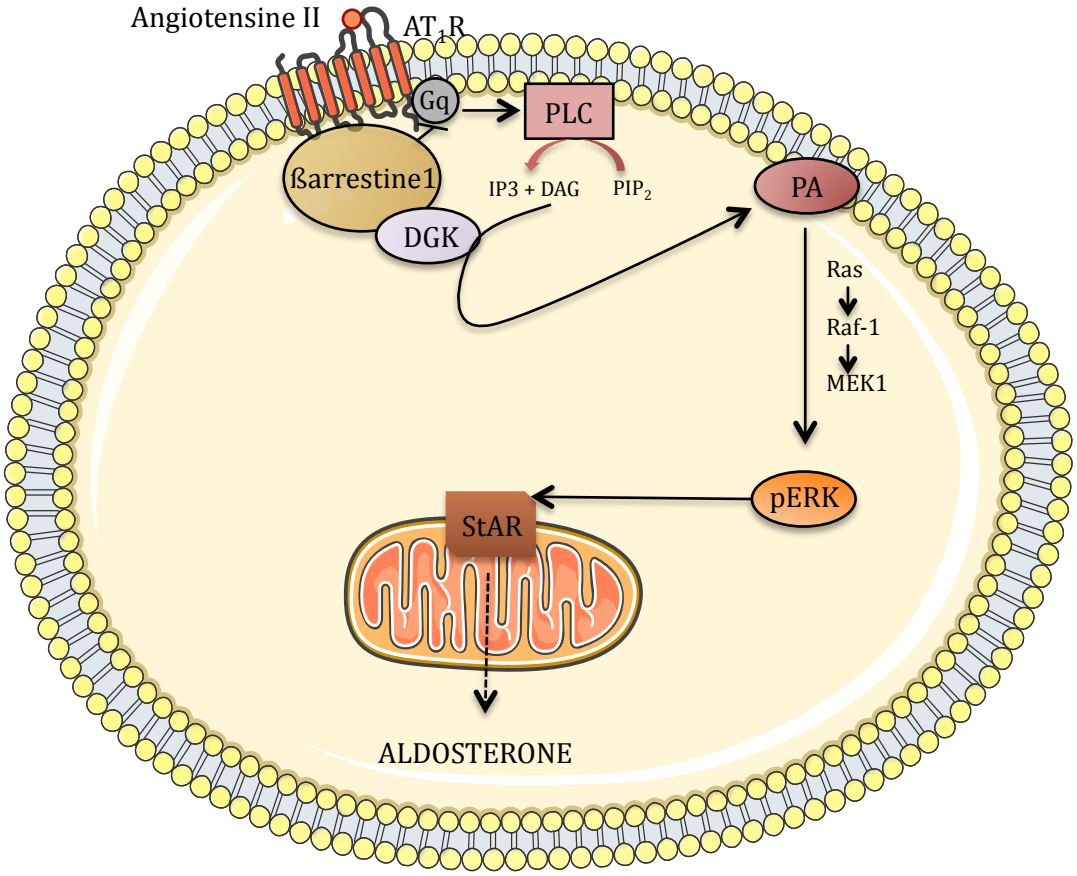


Figure 44 : Contrôle de la sécrétion d'aldostérone par la ßarrestine 1
La liaison de l'angiotensine II sur AT1R active une voie indépendante des protéines G, qui passe par le recrutement de la ßarrestine 1 et de la Diacylglycérol kinase (DGK). Cela entraine la conversion du diacylglycérol (DAG) en acide phosphatidique (PA), un phospholipide membranaire qui active directement la cascade ERK, avec la mobilisation successive de Ras, Raf-1 et MEK1. Cela aboutit à la phosphorylation et l'activation de ERK qui active la transcription du gène Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) et par conséquent augmente l'entrée du cholestérol dans la mitochondrie et la synthèse d'aldostérone. D'après Papadopoulos et al., 2009.

2) L'activité de la voie Wnt/ßcaténine est-elle contrôlée par les sécrétagogues naturels de l'aldostérone ?

Compte-tenu des données obtenues au cours de ma thèse, il semble évident que la voie Wnt/ßcaténine joue un rôle central dans le développement du syndrome de Conn. Une question découlant de ces observations est de déterminer le rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans le contrôle de l'activité physiologique de la zone glomérulée. Même si nous ne pouvons pas exclure que les ligands Wnt modulent l'effet des sécrétagogues naturels de la zone glomérulée, il est plus probable que leur rôle soit essentiellement de permettre l'établissement de l'identité glomérulée, notamment au travers de l'expression de *AT1R*. Il est par contre vraisemblable que les sécrétagogues de la zone glomérulée tels que l'angiotensine II ou le potassium soient capables de moduler l'activité de cofacteur transcriptionnel de la ßcaténine, pour stimuler l'expression des facteurs de la famille *NGFIB* et de *CYP11B2*.

A) La voie de la ßarrestine

Lors de la liaison de l'angiotensine II sur son récepteur AT1R, l'une des voies induites indépendamment des protéines G est la voie de la ßarrestine (Lymperopoulos et al., 2009). Au départ, les ßarrestine 1 et 2 étaient uniquement connues pour leur capacité à désensibiliser les récepteurs couplés aux protéines G mais il a maintenant été démontré qu'elles sont également capables d'activer et d'intervenir dans des voies de signalisation intra-cellulaire (Shukla et al., 2011). Dans le cadre de la réponse à l'angiotensine II, la ßarrestine 1 induit la production d'aldostérone au travers du contrôle de l'expression de *StAR* par la voie ERK (Extra-cellular-signal-Regulatory Kinase) (Figure 44) (Lymperopoulos et al., 2009).

Cependant, les ßarrestines sont également des protéines importantes pour permettre l'activation de la voie Wnt/ßcaténine (Bryja et al., 2007). Ainsi, la ßarrestine forme un complexe trimérique avec Dishevelled et Axine ce qui déstabilise le complexe de destruction et par conséquent, favorise la stabilisation de la ßcaténine. Il est donc possible que la ßarrestine puisse activer la voie Wnt/ßcaténine dans les cellules de la zone glomérulée, afin de favoriser la réponse à l'angiotensine II. Malheureusement, Lymperopoulos et ses collaborateurs n'ont pas analysé l'expression de *CYP11B2* et des autres enzymes de la voie de stéroidogenèse lorsqu'ils ont démontré le rôle de la ßarrestine 1 dans le contrôle de *StAR*. Nous pouvons donc supposer que l'action de la ßarrestine 1 sur la sécrétion d'aldostérone puisse être élargie à *CYP21* et *CYP11B2* grâce à l'activation de la voie Wnt/ßcaténine.

Afin de confirmer cette hypothèse, différentes expériences sont nécessaires. Nous pourrons utiliser l'analogue de l'angiotensine II, le SII ((Sar^{1},Ile^{4}, Ile^{8})-AII) qui active AT1R sans permettre son couplage aux protéines G, ce qui active la voie de signalisation de la ßarrestine.

Suite à cette induction, nous analyserons l'expression de l'ensemble des enzymes de la voie de stéroidogenèse ainsi que l'état de la voie Wnt/ßcaténine. Cela permettra, grâce à l'analyse de l'expression des gènes cibles de la voie, de déterminer si la ßarrestine 1 induit une activation de cette voie de signalisation dans les cellules H295R. Parallèlement, des analyses similaires seront réalisées sur des extraits de cellules H295R transfectées avec un plasmide codant pour la ßarrestine 1 et/ou d'un dominant négatif afin de déterminer la spécificité de l'action de la ßarrestine 1 dans cette réponse. L'ensemble de ces expériences permettra de déterminer le rôle exact de la ßarrestine 1 sur la stéroidogenèse au sens large et non uniquement sur *StAR*, ainsi que son implication dans la mobilisation de la ßcaténine en réponse à l'angiotensine II.

B) Rôle de la dépolarisation membranaire causée par les canaux potassiques

La stimulation des cellules de la zone glomérulée par l'angiotensine II induit entre autres une inhibition des canaux potassiques ce qui entraine une dépolarisation membranaire et favorise la sécrétion d'aldostérone (Nogueira et al., 2009b). Il pourrait exister un lien entre cette régulation et la voie Wnt/ßcaténine. Un des arguments en faveur de cette hypothèse est la similarité du phénotype observé chez les souris ΔCat et les souris invalidées pour *task1* (*task1-/-*). En effet, ces deux modèles présentent une zone glomérulée ectopique dans la zone fasciculée, qui est à l'origine d'un HP. L'expression de *task1* n'est pas modifiée chez les souris ΔCat (Article 1), suggérant qu'il pourrait agir en amont de la cascade WNT. Il serait donc intéressant d'analyser l'état de la voie Wnt/ßcaténine chez les souris *task1-/-* pour déterminer si Task1 peut contrôler l'activité de la voie Wnt/ßcaténine. Si cela se confirmait, l'inhibition des canaux task lors de la réponse à l'angiotensine II pourrait induire l'activation de la voie Wnt/ßcaténine qui participerait au contrôle de la sécrétion d'aldostérone. Cependant, une récente analyse réalisée chez les femelles *task1-/-* démontre que l'expression ectopique de Cyp11b2 n'est, dans ce cas, pas associée à une accumulation nucléo-cytoplasmique de la ßcaténine (El Wakil et al., 2012). Par conséquent, il semblerait qu'il n'existe pas de lien direct entre la dépolarisation membranaire induite par la perte de *task1* et l'activation de la voie Wnt/ßcaténine.

Un autre acteur potentiellement intéressant pour le contrôle de l'activité de la voie Wnt en réponse à l'angiotensine II est le canal potassique Kir3.4 codé par le gène *KCNJ5*, qui est exprimé essentiellement dans la zone glomérulée (Choi et al., 2011). Les mutations de *KCNJ5* qui altèrent le domaine de sélectivité du canal potassique Kir3.4, induisant une dépolarisation membranaire anormale, sont à l'origine du développement de 30% des APA (Choi et al., 2011; Boulkroun et al., 2012). Il est donc probable que la diminution d'expression ou l'altération de *KCNJ5* retrouvées respectivement en condition physiologique après une induction à l'angiotensine II et dans le syndrome de Conn, puisse induire l'activation de la voie Wnt/ßcaténine, ce qui potentialiserait la sécrétion d'aldostérone. Toutefois les données

	Activation de la voie Wnt/ßcaténine	Sans activation de la voie Wnt/ßcaténine	Total
Nombre de tumeurs	19/28 (68%)	9/28 (32%)	
Mutations KCNJ5	9/19 (47%)	6/9 (66%)	15/28 (54%)
- G151C	3/9 (33%)	1/6 (36%)	4/15 (26,6%)
- G151A	4/9 (44%)	4/6 (66,6%)	8/15 (53%)
- L168R	2/9 (22%)	1/6 (16%)	3/15 (20%)

Figure 45 : Tableau récapitulatif de la présence de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine et des altérations de KCNJ5 dans la cohorte de 28 APA issue de l'HEGP.

disponibles sur notre petite cohorte de patients montrent que la prévalence des mutations *KCNJ5* est supérieure dans les tumeurs ne présentant pas d'activation de la voie Wnt/ßcaténine (6/9 = 66%) par rapport aux tumeurs avec activation (9/19 = 47%) (Figure 45). Ces résultats à confirmer sur une plus large cohorte suggèrent que ces deux altérations ne sont ni exclusives ni véritablement associées. Par conséquent, il ne semble pas exister de lien direct et systématique entre l'activation de la voie Wnt/ßcaténine et les mutations de *KCNJ5*. Cependant, ces résultats pourraient être confirmés grâce à des analyses *in vitro*. Le plasmide codant pour *KCNJ5* présentant, par exemple, la substitution G151A qui est la plus fréquemment retrouvée dans notre cohorte d'APA avec activation de la voie Wnt/ßcaténine (4/9, 44%) pourrait être transfecté dans les cellules où l'état de la voie Wnt/ßcaténine sera déterminé. Une activation de la voie Wnt/ßcaténine traduirait d'un contrôle possible de cette voie par *KCNJ5* à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Article 3 :

Coopération entre la voie Wnt/ßcaténine et la surexpression de Igf2 pour la progression tumorale

Présentation succincte du contexte scientifique

La caractérisation des souris ΔCat a permis de confirmer que la voie Wnt/ßcaténine est un oncogène surrénalien (Article 1). Toutefois, l'apparition de CCS seulement chez 30% des souris ΔCat de 17 mois démontre que une ou des altérations secondaires sont nécessaires pour l'évolution vers la malignité.

Chez l'Homme, l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les CCS est la surexpression de *IGF2* présente dans 80-90% des CCS et très rarement présente dans les ACS (Gicquel et al., 1997; Liu et al., 1997). De plus, le traitement des H295R avec un inhibiteur du récepteur IGFIR inhibe leurs proliférations *in vitro* et en xénogreffes (Barlaskar et al., 2008). Ces données suggèrent donc la surexpression de *IGF2* peut être impliquée dans la tumorigénèse cortico-surrénalienne. En accord avec cette hypothèse, le syndrome Beckwith-Wiedmann (BW) causé par une dérégulation épigénétique du locus soumis à l'empreinte de *IGF2* est caractérisé par une surcroissance et des prédispositions au développement de tumeurs dont les CCS. Toutefois, dans les différents modèles de souris transgéniques générés pour démontrer le rôle de la surexpression de *IGF2* dans le BW, aucune tumeur cortico-surrénalienne n'a été mise en évidence, même chez des souris de 18 mois (Eggenschwiler et al., 1997; Sun et al., 1997; Weber et al., 1999). Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de *IGF2* n'initie pas la tumorigenèse cortico-surrénalienne mais qu'elle pourrait être impliquée dans la progression maligne.

A partir de ces données bibliographiques, nous avons voulu :

- Evaluer le rôle oncogénique de IGF2 dans un modèle de surexpression surrénalienne chez la souris
- Déterminer si l'association de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine et de la surexpression de *IGF2* induit une accélération du phénotype et/ou une augmentation de la pénétrance des CCS

Article 3 :

Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models.

Drelon C, Berthon A., Ragazzon B., Tissier F., Bandiera R., Sahut-Barnola I., De Joussineau C., Batisse-Lignier M., Lefrançois-Martinez AM., Bertherat J., Martinez A., Val P.

PLoS ONE. 2012 Aug 28.

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models

Coralie Drelon[1,2,3], Annabel Berthon[1,2,3☯], Bruno Ragazzon[4,5,6☯], Frédérique Tissier[4,5,6], Roberto Bandiera[7], Isabelle Sahut-Barnola[1,2,3], Cyrille de Joussineau[1,2,3], Marie Batisse-Lignier[1,2,3,8], Anne-Marie Lefrançois-Martinez[1,2,3], Jérôme Bertherat[4,5,6], Antoine Martinez[1,2,3], Pierre Val[1,2,3]*

1 Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, Clermont-Ferrand, France, **2** CNRS UMR 6293, GReD, Aubière, France, **3** Inserm U1103, GReD, Aubière, France, **4** Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS UMR 8104, Paris, France, **5** Inserm U1016, Paris, France, **6** Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Paris, France, **7** Inserm UMR636, Nice, France, **8** Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Adrenal cortical carcinomas (ACC) are rare but aggressive tumours associated with poor prognosis. The two most frequent alterations in ACC in patients are overexpression of the growth factor IGF2 and constitutive activation of Wnt/β-catenin signalling. Using a transgenic mouse model, we have previously shown that constitutive active β-catenin is a *bona fide* adrenal oncogene. However, although all these mice developed benign adrenal hyperplasia, malignant progression was infrequent, suggesting that secondary genetic events were required for aggressive tumour development. In the present paper, we have tested IGF2 oncogenic properties by developing two distinct transgenic mouse models of Igf2 overexpression in the adrenal cortex. Our analysis shows that despite overexpression levels ranging from 7 (basal) to 87 (ACTH-induced) fold, Igf2 has no tumour initiating potential in the adrenal cortex. However, it induces aberrant accumulation of Gli1 and Pod1-positive progenitor cells, in a hedgehog-independent manner. We have also tested the hypothesis that Igf2 may cooperate with Wnt signalling by mating Igf2 overexpressing lines with mice that express constitutive active β-catenin in the adrenal cortex. We show that the combination of both alterations has no effect on tumour phenotype at stages when β-catenin-induced tumours are benign. However, there is a mild promoting effect at later stages, characterised by increased Weiss score and proliferation. Formation of malignant tumours is nonetheless a rare event, even when Igf2 expression is further increased by ACTH treatment. Altogether these experiments suggest that the growth factor IGF2 is a mild contributor to malignant adrenocortical tumourigenesis.

Citation: Drelon C, Berthon A, Ragazzon B, Tissier F, Bandiera R, et al. (2012) Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models. PLoS ONE 7(8): e44171. doi:10.1371/journal.pone.0044171

Editor: Zoran Culig, Innsbruck Medical University, Austria

Received May 28, 2012; **Accepted** July 30, 2012; **Published** August 28, 2012

Copyright: © 2012 Drelon et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This project was supported by Université Blaise Pascal; Université d'Auvergne; Centre National de la Recherche Scientifique; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, grant #SFI 20101201397) and La Ligue Régionale Contre le Cancer, Allier committee. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pierre.val@univ-bpclermont.fr

☯ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Adrenocortical carcinomas (ACC) are rare with an incidence of 0.5 to 2 new cases per year and per million [1]. However, these tumours are associated with bad prognosis. Eighty percent of ACC patients develop metastases, which results in five years survival rates of 16 to 47% depending on the series [2]. Most ACC (76%) are also associated with excessive hormone secretion [3,4]. Clinical management of these cancers mostly relies on resection of primary tumours and mitotane treatment alone [5] or in combination with chemotherapy [6]. However, almost half of the patients present with incurable metastatic disease at diagnosis [2,7]. Molecular analyses have shown that the two most frequent alterations in ACC are overexpression of Igf2 [8–10] and constitutive activation of the Wnt/β-catenin signalling pathway [11–13]. We have recently shown that constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex of transgenic ΔCat mice resulted in adrenal hyperplasia and aggressive tumour formation in only a subset of 17 month-old animals [14]. This demonstrated that β-catenin was an adrenal oncogene but it also suggested that secondary genetic alterations were required for malignant progression. IGF2 is a growth factor involved in the control of cell proliferation and inhibition of apoptosis. The IGF2 gene locus at 11p15 is under the control of parental epigenetic imprinting. Loss of imprinting (LOI) at 11p15 causes Beckwith-Wiedmann syndrome (BWS) characterised by embryonic overgrowth and predisposition to tumour development, among which adrenocortical carcinomas [15]. In sporadic adrenal tumours, IGF2 is overexpressed in 80–90% of ACC but not in adrenocortical adenomas (ACA) [9,16]. In most cases, IGF2 overexpression results from loss of the maternal IGF2 allele and duplication of the paternal allele (paternal unidisomy) but it is also associated with alterations in epigenetic imprinting at 11p15 [8]. Other components of the IGF signalling pathway such as the IGFIR receptor [17] and IGF binding protein 2 (IGFBP2) [18] are also overexpressed in ACC. Altogether these observations suggest that overexpression of IGF2 could be involved in adrenal

tumourigenesis. Consistent with this idea, IGF1R antagonists can inhibit proliferation of the human adrenocortical carcinoma H295R cell line both in culture and in xenograft experiments [19,20].

Mouse models of increased Igf2 signalling recapitulate most of the developmental and growth abnormalities found in BWS, but fail to develop adrenal hyperplasia or tumours [21,22]. Transgenic mice with overexpression of human IGF2 under the control of the PEPCK promoter show 4 to 6 fold elevation of serum IGF2 levels and moderate transgene expression in the adrenal cortex. This results in mild adrenocortical hyperplasia characterised by a 1.5 fold increase in zona fasciculata volume [23]. However, these mice did not develop adrenocortical tumours over the 18 months time course of the study. This suggested that Igf2 overexpression might not initiate adrenal tumour development but that it could be involved in malignant progression.

In order to test this hypothesis, we have developed two transgenic mouse models in which mouse Igf2 is specifically overexpressed in the adrenal cortex through the regulatory regions of the Akr1b7 or the P450SCC gene, which allow basal and ACTH stimulated transgene expression. We have also engineered a mouse model in which the two most frequent genetic alterations found in ACC patients were combined by mating Igf2 overexpressing mice with mice that express a constitutive active β-catenin in the adrenal cortex (ΔCat mice) [14].

Our analysis of these models shows that Igf2 overexpression does not induce adrenal tumour development although it triggers aberrant recruitment of adrenal progenitors cells in a hedgehog independent manner. We also show that Igf2 overexpression in the context of constitutive β-catenin activation only has a mild promoting effect on tumour progression. Altogether, these data strongly suggest that despite marked overexpression in adrenal carcinomas, Igf2 is unlikely to play a major role in either tumour initiation or progression in the adrenal cortex.

Materials and Methods

Ethics statement

All animal studies were approved by Auvergne Ethics Committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare in order to minimize animal suffering.

Construction of the transgenes

The 0.5 Akr1b7:Igf2 transgene was constructed by inserting the cDNA of mouse Igf2 into the 0.5 Akr1b7-CAT-int backbone. The 0.5Akr1b7-CAT-Int construct contains the −510/+44 fragment of the mouse Akr1b7 gene fused to a reporter gene composed of the CAT coding sequence followed by the mini-intron and polyadenylation signal from SV40 T antigen sequences. These sequences are followed by 3.5 kb of an intragenic fragment spanning intron 1 to 2 of the Akr1b7 gene. The CAT reporter gene was excised from the 0.5 Akr1b7-CAT-Int transgene by a NcoI digestion. This was followed by a fill-in of the cohesive ends by Klenow polymerase and subsequent XhoI digestion. The complete mouse Igf2 cDNA (positions 1126 to 1668 on sequence NM_010514.2) was amplified from mouse liver mRNAs using primers Igf2-Fwd-5′-CCCTCGAGACCATGGGGATCCCAGTG-3′ and Igf2-Rev-5′-AAAGTACTTTTTCACTGATGGTTGCTGGAC-3′. These primers contained XhoI (Fwd) and ScaI (Rev) restriction sites that were included in the PCR fragment. After digestion with XhoI and ScaI, the PCR fragment was cloned into the XhoI and blunted NcoI sites of the 0.5 Akr1b7-Int construct.

The 4.5 Scc:Igf2 transgene was constructed by cloning the regulatory sequences of the human P450SCC gene and mouse Igf2 cDNA in the pBL-CAT3 backbone. For this, the CAT gene was excised from the pBLCAT3 reporter plasmid by a NcoI digestion. This was followed by a fill-in of the cohesive ends by Klenow polymerase and subsequent XhoI digestion. The mouse Igf2 cDNA was the inserted in this plasmid as described above, resulting in the pBL-Igf2 construction. Regulatory regions from the human P450SSC gene (−4400/+55) were amplified from human genomic DNA using primers SCC-Fwd-5′-GCTCTAGAGCGACCCCTCCCAAGGCCAAACAAA-3′ and SCC-Rev-5′-CCCTCGAGGGCCCACAGCTGTGACTGTAC-3′. These contained an XbaI (Fwd) and an XhoI (Rev) sequence. The PCR product was digested by XhoI and XbaI. It was subsequently cloned into pBL-Igf2 after an XhoI/XbaI digestion.

Mice

All animal studies were approved by Auvergne Ethics Committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare. Mice were culled by decapitation at the end of experiments. Tissues were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C.

Generation of transgenic mice

Transgenic mice were generated by additive transgenesis. Before micro-injection, the 0.5 Akr1b7:Igf2 and 4.5 Scc:Igf2 transgenes were excised by KpnI/HindIII and EcoRI/SalI digestions, respectively. The resulting linearized fragment was injected into fertilised B6D2 mouse oocytes. Detection of transgenic founders and determination of copy numbers were performed by southern blotting. Eight and three founders were generated for the 0.5 Akr1b7:Igf2 and 4.5 Scc:Igf2 lines, respectively (Figure S1). Founders F0–10, F0–20 and F0–22 transmitted the 0.5 Akr1b7:Igf2 transgene to their offspring. Founders F0–14 and F0–19 transmitted the 4.5 Scc:Igf2 transgene. Semi quantitative RT-PCR analyses were used to select the lines with the most specific expression pattern and highest expression levels in the adrenal gland. Lines F0–20 (0.5 Akr1b7:Igf2) and F0–19 (4.5 Scc:Igf2) were selected for further experiments. The line bearing the 0.5 Akr1b7:Igf2 transgene will be referred to as AdIgf2 throughout this manuscript. The line bearing the 4.5 Scc:Igf2 transgene will be referred to as Scc:Igf2. ΔCat mice were previously described [24]. They were generated by mating Catnblox$^{(ex3)}$ mice [25] with 0.5 akr1b7:Cre mice (24). ΔCat;AdIgf2 and ΔCat;Scc:Igf2 lines were generated by mating ΔCat mice with AdIGF2 and Scc:Igf2 transgenic lines respectively.

Treatment with ACTH

Twelve month-old mice were treated chronically with intramuscular injections of 1.2 units of Synacthene Retard (tetracosactide complexed with zinc chloride, Sigma-Tau Laboratories) every other day, for two months.

Reverse-transcription quantitative PCR

Frozen tissues were disrupted in Nucleospin RNA II lysis buffer (Macherey Nagel) using the Tissue-Lyser system (Qiagen). Total mRNAs were extracted using the NucleoSpin RNA II kit, according to manufacturer's instructions. Five hundred ng of mRNAs were reverse transcribed for 1 hour at 42°C with 5 pmol of random hexamer primers (U1240; Promega), 200 units reverse transcriptase (M1701; Promega), 2mM dNTPs and 20 units RNAsin (N2615; Promega). Igf1r and 36b4 were amplified by

standard PCR with 1.5 units of GoTaq polymerase (M8305; Promega), 2mM of MgCl2, 2.5mM of dNTPs and 10pmol of forward and reverse primers (Igf1R fwd-5′ GAGAAATTTGTGGGCCCGGCATTGA and rev -5′GCATCCAAGATGAGAGACCAGTCTA; 36b4 fwd-5′ GTCACTGTGCCAGCTCAGAA and rev-5′ TCAATGGTGCCTCTGGAGAT). Igf1R amplification was carried out using the following conditions: 94°C, 30 s; 68°C, 30s; 72°C, 30s for a total of 30 cycles. 36b4 was amplified using the following protocol: 94°C, 30 s; 60°C, 30s; 72°C, 30 s for 30 cycles. Gene expression levels were measured by real-time quantitative PCR (RTqPCR) using either probes from the Taqman gene expression assays pool (Aplied Biosystems) or SYBR green and standard PCR primers. In either case, 2 µl of diluted cDNAs (1/40) were used as a template in each PCR reaction. For Taqman analyses, each reaction was performed in duplicate in a final volume of 15µl with 0.75 µl of the appropriate probe mix and 7.5µl of PCR Mastermix (Precision, Ic., Primerdesign.co.uk). For SYBR Green analyses, each reaction was performed in duplicate in a final volume of 25µl with 12.5µl of MESA Green qPCR mix (Eurogentec) and 10 pmol of forward and reverse primer. Relative mRNA accumulation was determined by the ΔΔCt method with *peptidylprolyl isomerase B* (*ppib*) as a standard for Taqman analyses and with *36b4* as a standard for SYBR Green analyses. Unless otherwise stated, statistical analysis was performed with Student's *t*-test. Taqman gene expression assay probes that were used in the study are: Ppib Mm00478295_m1, Gli1 Mm004494645_m1, Patched1 Mm00436026_m1, Pod1 Mm00448961_m1, Shh Mm00436527_m1, Axin2 Mm00443610_m1, Lef-1 mM00550265_m1, Vegf-A Mm01281449_m1, Nov/Ccn3 Mm00456855_m1, Connexin-α43 (Gja1) Mm00439105_m1. Primer sequences for genes studied with SYBR Green are: 36b4 Fwd-5′ GTCACTGTGCCAGCTCAGAA and 36b4 Rev: 5' TCAATGGTGCCTCTGGAGAT; Cyclin D1 Fwd: 5' TCTCCTGCTACCGCACAAC and Cylin D1 Rev: 5' TTCCTCCACTTCCCCCTC.

Histology and immuno-histochemistry

Adrenals were fixed in 4% paraformaldehyde overnight. After two washes in PBS, adrenals were dehydrated through an ethanol gradient and incubated for two hours in Histoclear (HS200; National diagnostics). They were then embedded in paraffin and 5 µm sections were cut. For evaluation of general morphology, sections were stained with haematoxylin and eosin on a Microm HMS70 automated processor (Microm Microtech, France), according to standard procedures. Immunodection of Igf2 1/100 (ab9574, Abcam), phospho-S6 1/250 (2217, Cell signaling), phospho-S6Kinase 1/100 (Ab32359, Abcam), GATA4 1/50 (SC1237, Santa Cruz), β-catenin 1/1000 (610153, BD Biosciences Pharmingen) Dab2 1/1000 (610464, BD Biosciences), Akr1b7 1/200 [26], Sf-1 1/1000 (a kind gift of Dr Ken Morohashi, Fukuoka, Japan) and Ki-67 1/1000 (RM-9106, Thermo Fisher Scientific) were carried out on an Intavis InSitu Pro VSi automated processor (Intavis AG, Germany).

For immunohistochemical analyses, antigen retrieval was performed by boiling rehydrated sections in sodium citrate 10 mM pH 6 tween 0.05% for 20 min, with the exception of Sf-1 and GATA4, which were detected after 20 min boiling in Vector Antigen Retrieval Solution (H3300, Vector Labs). Primary antibodies were detected with the appropriate secondary antibodies, coupled to biotin (1/500, Jackson Immunoresearch). Biotin was then complexed with streptavidin coupled to Horse Radish Peroxidase (HRP) (016–030–084, Jackson Immunoresearch). HRP activity was detected with the chromogenic substrate Novared (SK4800, Vector Labs). The double staining for Dab2 and Akr1b7 was obtained following a similar protocol. The two proteins were sequentially detected by amplification with TSA-Alexa555 (Molecular Probes) and TSA-Alexa488 (Molecular Probes) flurorescent HRP substrates. To avoid cross-reaction, HRP was inactivated by incubation with 0.02% HCl for 20 min after detection of the first antibody.

In situ hybridisation

Paraffin-embedded tissues were cut as 10 µm sections on Superfrost Plus slides. In situ hybridisation was conducted according to a standard protocol [27].

Evaluation of cell proliferation

In smaller adrenals, Ki67-positive cells were counted on the entire adrenal surface. The number of cells was corrected to section surface and was expressed as a percentage of one of the wild-type control adrenals. Counting was performed separately in the cortex and medulla. Results represent the mean of at least 6 individual counts ± standard deviation. In larger tumours, proliferation index was evaluated by counting Ki67-positive cells in five high power field pictures (x40 magnification) for each individual tumour. This was then expressed as a percentage of the total cell count for each field. For each individual adrenal, results were expressed as the mean of counts in five independent fields.

Results

In order to induce overexpression of Igf2 in steroidogenic cells of the adrenal cortex we developed transgenic mice in which mouse Igf2 expression was driven by 500 bp of the regulatory regions and 3.5 kb of the intronic regions of the Akr1b7 gene (Figure S1A). This regulatory element has been previously shown to induce transgene expression in steroidogenic cells of the cortex starting at E14.5 [28]. Three transgenic lines differing by the genomic insertion site and copy numbers were generated (Figure S1B). Line 20, which showed highest expression in the adrenal by RT PCR (data not shown) was kept for further studies. It will thereafter be referred to as AdIgf2. We also generated a second transgenic line in which Igf2 expression was driven by 4.5 kb of the regulatory regions of the human P450SCC gene. This transgene allows expression from E11.5 in steroidogenic cells of both the adrenal cortex and the gonad [29]. Out of the two established lines, we selected line 19 in which expression in the adrenal was highest (Figure S1B and data not shown). These mice will be referred to as Scc:Igf2 line. They have been used as a control in order to confirm that the phenotypes observed in AdIgf2 adrenals were actually resulting from Igf2 overexpression and not from transgene insertion effects. The core of the experiments in the present manuscript has been conducted with females from the AdIgf2 transgenic line.

Further characterisation of the AdIgf2 transgenic line by RTqPCR showed a 6.8-fold increase in Igf2 in the adrenal cortex of transgenics compared with WT (Figure 1A). There was no significant overexpression in the other tissues tested, confirming the specificity of transgene activity. Igf2 expression was then assessed in situ by immunohistochemistry. Igf2 was barely expressed in the WT adrenal cortex (Figure 1B, a). In contrast, the protein was detected throughout the cortex, in virtually all steroidogenic cells of AdIgf2 adrenals (Figure 1B, b). Igf2 signals by binding to the Igf1-receptor and activates both the PI3K and MAPK pathways. RT-PCR showed expression of similar levels of Igf1r in WT and AdIgf2 adrenals (Figure S2A).

We then assessed the ability of Igf2 to induce signalling events in the adrenal cortex by analysing expression of the phosphorylated S6 protein. These experiments showed a basal level of S6 phosphorylation in WT adrenals with few cortical cells exhibiting cytoplasmic staining (Figure 1B, c). In contrast, AdIgf2 adrenals showed strong S6 phosphorylation in almost all steroidogenic cells of the cortex (Figure 1B, d). Similar observations were made for the upstream phosphorylated-S6Kinase (Figure S2B). Altogether, these experiments showed that AdIgf2 transgenic mice overexpressed Igf2, which resulted in increased Igf2 signalling in the adrenal cortex.

The effect of Igf2 overexpression on cortical organisation was then assessed by haematoxylin/eosin staining on sections from 10 month-old AdIgf2 adrenals. These experiments showed that the overall cord-like structure found in the zona fasciculata, was preserved in AdIgf2 adrenals (Figure 1C, b) compared with wild-type tissue (Figure 1C, a). However AdIgf2 adrenals were characterised by accumulation of large amounts of small basophilic cells at the periphery of the cortex, which in the most extreme cases, almost covered a third of cortical surface (Figure 1C, b black arrows). Most of these cells were elongated with scarce cytoplasm and resembled mesenchymal capsular cells (Figure 1C, b inset). Analysis of steroidogenic factor 1 (Sf–1, Figure 1C, d) and Akr1b7 (Figure 1C, f) expression showed that fasciculata cells maintained their molecular identity. Interestingly, the basophilic cells did not express Sf-1 (Figure 1C, d inset) or Akr1b7 (Figure 1C, f inset), indicating that they were undifferentiated. However, some but not all of these cells, expressed the transcription factor GATA4 (Figure S2 C, b) which was almost undetectable in wild-type adrenals (Figure S2 C, a). This was reminiscent of the spindle-shaped cells that accumulate at the cortical periphery in some strains of mice at the initiation of castration-induced neoplasia [30]. Disabled-2 (Dab2), a recently identified molecular marker of zona glomerulosa differentiation [31] was expressed under the capsule of wild-type adrenals (Figure 1C, g). In AdIgf2 adrenals, Dab2 was still expressed in the outer cortex. However, Dab2 expression domain was displaced inwards by accumulation of the undifferentiated basophilic cells (Figure 1C, h) that were negative for Dab2 expression (Figure 1B, h inset). Co-immunohistochemistry for Dab2 and Akr1b7 showed that the relative positions of zona glomerulosa (Dab2) and zona fasciculata (Akr1b7) were unaltered by Igf2 overexpression (Figure S2D). Altogether, these experiments suggested that Igf2 overexpression did not alter cortical architecture but that it induced accumulation of undifferentiated basophilic subcapsular cells. Absence of Igf2 (Figure 1D, a, black arrows) expression and S6 phosphorylation (Figure 1D, b, black arrows) in these cells suggested that their accumulation was triggered by indirect mechanisms that did not involve the PI3K/S6K pathway. Alternatively, this may reflect involvement of this pathway in the recruitment of these cells at an earlier time-point.

King and colleagues recently showed that adrenal cortex renewal occurred through recruitment of subcapsular progenitor cells in response to Shh signalling. Progenitors were undifferentiated (Sf-1 negative) and characterised by expression of Patched1 and Gli1. Shh was expressed by poorly differentiated Sf-1-positive cells localised in the vicinity of the zona glomerulosa [32]. The localisation, histological and molecular characteristics of the supernumerary mesenchymal subcapsular cells in AdIGF2 adrenals suggested that they could represent abnormally accumulated progenitors. Indeed, RTqPCR analysis showed markedly increased expression of both Gli1 and Ptch1 in 10 month-old AdIgf2 compared with wild-type adrenals (Figure 1E). Pod1, another putative marker of adrenal progenitor cells was also significantly upregulated in AdIgf2 adrenals (Figure 1E). These observations were further substantiated by the presence of increased Pod1 and to a lesser extent Gli1 in situ hybridisation staining in the outer cortex and capsule of AdIgf2 adrenals (Figure 1F, b, d) compared with wild-type (Figure 1F, a, c). Surprisingly though, Shh expression was significantly decreased (Figure 1E), suggesting that accumulation of progenitors in response to Igf2 overexpression was independent of Hedgehog signalling.

In order to confirm that these effects were strictly dependent on Igf2 over-expression, similar experiments were performed on Scc:Igf2 transgenic mice in which Igf2 expression was driven by P450SCC regulatory regions (Figure S1). RTqPCR analysis showed that Scc:Igf2 mice expressed levels of Igf2 that were slightly higher than in AdIgf2 adrenals (10–11 fold Figure S3A). Igf2 overexpression through P450SCC regulatory regions also induced phosphorylation of S6 (Figure S3B) and resulted in accumulation of progenitor cells albeit at a later timepoint (Figure S3C&D). Altogether these data showed that Igf2 overexpression in the adrenal cortex of transgenic mice did not alter adrenal architecture but induced accumulation of undifferentiated progenitor cells, independently of Shh expression.

Molecular analyses on cell culture models suggested that Igf2 signalling could be involved in the stimulation of canonical Wnt/β-catenin signalling. This crosstalk was assumed to play a role in the potential oncogenic effects of Igf2 [33–37]. We have recently shown that β-catenin is an adrenal oncogene involved in tumour initiation in the adrenal cortex [14]. Therefore, we wanted to investigate a potential involvement of Igf2 in Wnt signalling stimulation in the adrenal cortex. Nucleo-cytoplasmic staining of β-catenin is the gold standard in histological evaluation of canonical Wnt signalling. We thus analysed β-catenin expression by immunohistochemistry (Figure 2A). Adrenals from ΔCat mice in which β-catenin is constitutively activated were included as a control [14]. In the wild-type adrenal, nucleo-cytoplasmic β-catenin accumulation was restricted to zona glomerulosa (Figure 2A, a inset, white arrowheads). As previously published [14], ΔCat adrenals showed nucleo-cytoplasmic β-catenin staining throughout the cortex and within steroidogenic cells that invaded the medulla (Figure 2A, b inset). In contrast, nucleo-cytoplasmic β-catenin staining was restricted to zona glomerulosa in AdIgf2 adrenals (Figure 2A, c inset), although Igf2 was overexpressed throughout the cortex (Figure 1B, b). As shown in Figure 1, zona glomerulosa was displaced inwards by the accumulation of basophilic subcapsular cells (Figure 2A, d inset). Altogether, these observations suggested that Igf2 overexpression did not cause canonical Wnt pathway stimulation in the adrenal cortex. In order to confirm this hypothesis, we analysed expression of two β-catenin target genes by RTqPCR. As expected, expression levels of both Axin2 and Lef1 were markedly increased in ΔCat adrenals (Figure 2B). In contrast, overexpression of Igf2 did not alter expression of either target genes (Figure 2B). We thus concluded that Igf2 overexpression did not result in canonical Wnt signalling stimulation in the adrenal cortex.

IGF2 overexpression is found in almost all adrenal carcinomas compared with adrenal adenomas or healthy adrenals [8,9]. This suggests that Igf2 may be involved in carcinogenic transformation in the adrenal. We thus evaluated proliferation in 10 month-old AdIgf2 adrenals by counting the number of cells expressing Ki67 (Figure 2C). These experiments showed a modest but significant increase in Ki67-positive cells in the cortex of AdIgf2 mice compared with wild-type adrenals, whereas proliferation was unaltered in the medulla (Figure 2D). Increased Ki67 staining was randomly distributed throughout the cortex and was not associated with accumulating progenitor cells (data not shown).

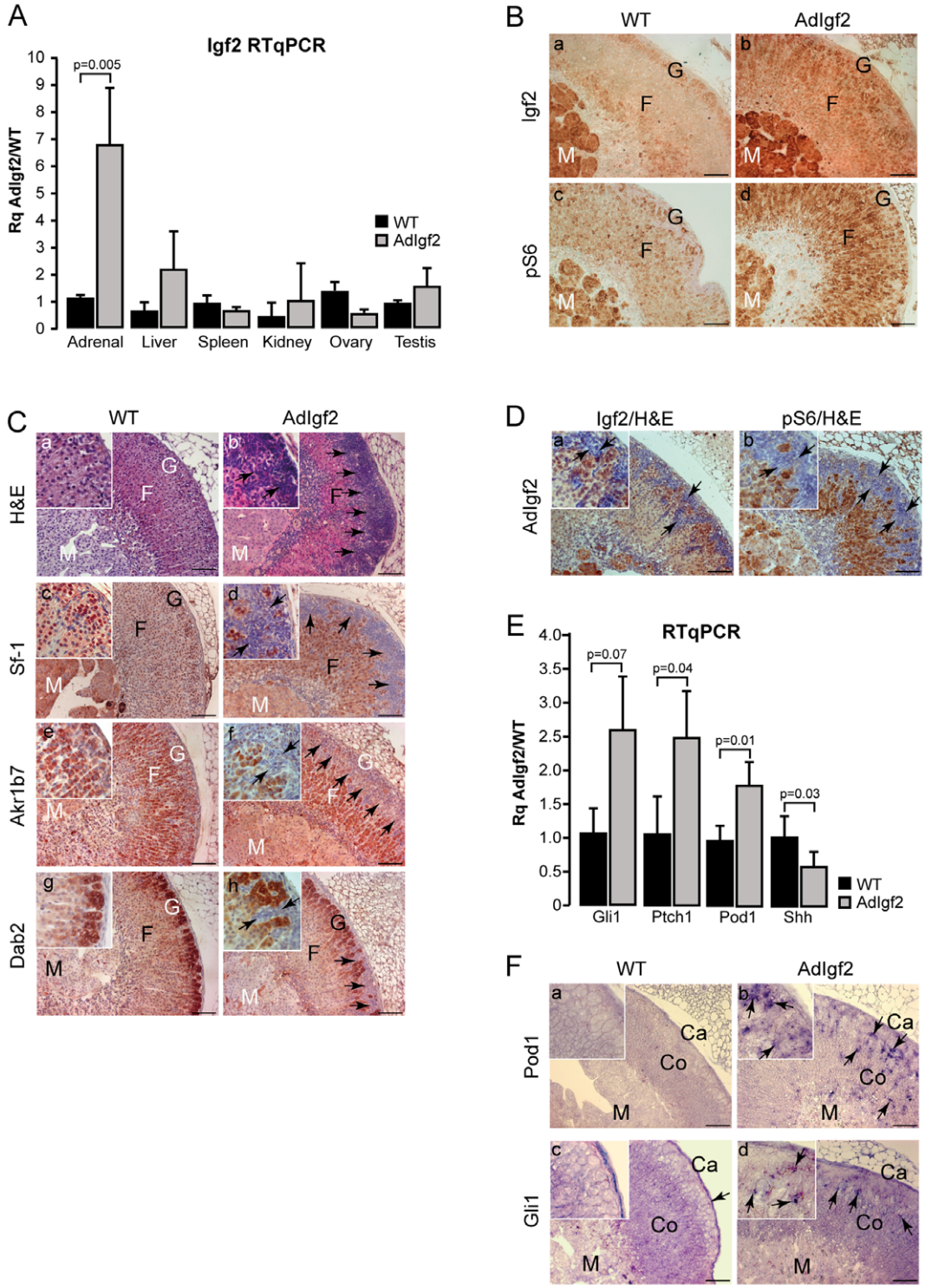


Figure 1. Characterisation of Adlgf2 transgenic mice adrenals. A- Igf2 is overexpressed in the adrenals of transgenic mice. Igf2 expression was analysed by RTqPCR on cDNAs from adrenals, kidneys, liver, spleen, ovaries and testes of 10 month-old wild-type (WT) and Adlgf2 transgenic mice. Bars represent the mean relative quantification (Rq Adlgf2/WT) of Igf2 expression for each tissue in at least 4 samples per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **B- Igf2 signalling is increased in Adlgf2 adrenals.** Expression of Igf2 (a–b) and of the phosphorylated ribosomal protein S6 (c–d) was analysed by immunohistochemistry in WT and Adlgf2 adrenals. **C- Effect of Igf2 overexpression on adrenal histology and differentiation.** Histology was analysed by haematoxylin & eosin staining in wild-type (a) and Adlgf2 (b) adrenals. Expression of Sf-1 (c–d), Akr1b7 (e–f) and Dab2 (g–h) was analysed by immunohistochemistry in WT and Adlgf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **D- Igf2 and phospho-S6 are not expressed in subcapuslar mesenchymal cells.** Igf2 (a) and phospho-S6 (b) were immunodetected in Adlgf2 adrenals and the tissue was counterstained with haematoxylin. **E- Adrenal progenitor cells markers are overexpressed in Adlgf2 adrenal.** Expression of the progenitor cells markers, Gli1, Ptch1, Pod1 and Shh was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT) and Adlgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Adlgf2/WT) of gene expression for each

marker in at least 6 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **F- Pod1 and Gli1 are overexpressed in AdIgf2 adrenals.** Pod1 and Gli1 expression domains were analysed by in-situ hybridisation in wild-type (a, c) and AdIgf2 (b, d) adrenals. In all panels, arrows show mesenchymal subcapsular cells. M, medulla; F, fasciculata; G, glomerulosa; Co, cortex; Ca, capsule. Scale bar is 80 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0044171.g001

This modest increase in proliferation was not associated with increased Cyclin D1 expression as measured by RTqPCR, which was in agreement with the absence of Wnt/β-catenin signalling stimulation (Figure 2E). Analysis of adrenal histology (Figure 2F, a–c) and Ki67 expression (Figure 2F, d–f) in 14 month-old adrenals showed that there was no progression of the adrenal phenotype over time. These observations suggested that Igf2 overexpression was not sufficient to trigger adrenal cortex tumourigenesis. However, Igf2 overexpression in this setup was mild (6.8 fold) compared to overexpression in ACC patients (from 10 to 1000 fold). We thus took advantage of the sensitivity to ACTH of the transgenic construct to increase Igf2 expression. For these experiments, 12 month-old AdIgf2 mice were treated three times a week with 1.2 units of long acting ACTH for two months. This resulted in an 87 ± 4 fold increase in Igf2 expression as measured by RTqPCR (Figure S3E). As expected, chronic ACTH exposure caused marked hypertrophy of cortical cells (Figure 2F, g) compared with both wild-type (Figure 2F, a) and untreated AdIgf2 adrenals (Figure 2F, b–c). However, the marked increase in Igf2 expression had no obvious effect on either cortical organisation (Figure 2F, g) or proliferation as measured by Ki67 expression (Figure 2F, h). Altogether, these data strongly suggested that Igf2 overexpression alone could not trigger tumour development in the adrenal cortex.

In ACC patients, IGF2 overexpression is frequently associated with constitutive activation of β-catenin. This suggests that

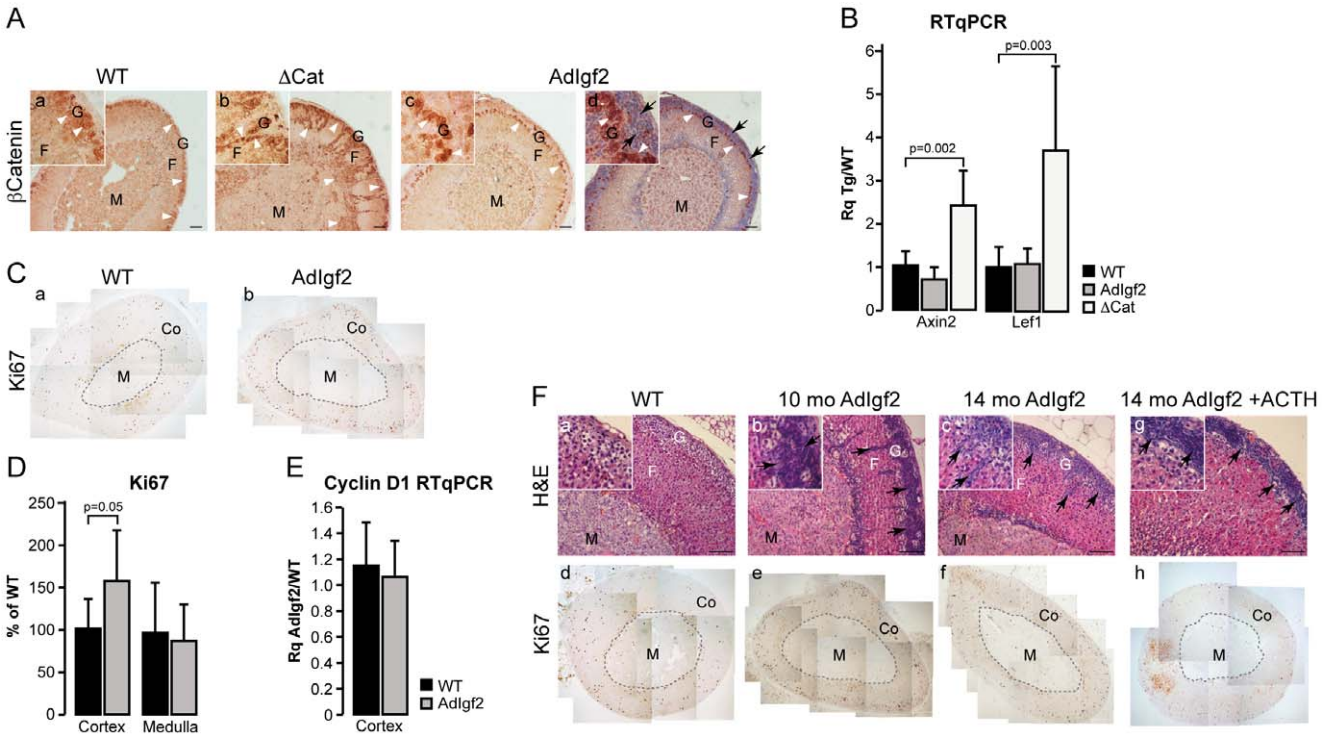


Figure 2. Igf2 overexpression does not initiate adrenal tumourigenesis. A- β-catenin is not activated in AdIgf2 adrenals. β-catenin expression was analysed by immunohistochemistry in wild-type (WT, a), ΔCat (positive control, b) and AdIgf2 (c–d) adrenals. Section in c was counterstained with haemotxylin. Nucleo-cytoplasmic staining of β-catenin (white arrowheads) is restricted to zona glomerulosa in WT and AdIgf2 adrenals but spreads throughout the cortex and inside the medulla in ΔCat adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **B -Wnt pathway is not activated in AdIgf2 adrenals.** Expression levels of Axin2 and Lef-1, two canonical Wnt pathway targets, were determined by RTqPCR with cDNAs from wild-type, AdIgf2 and ΔCat (positive control) adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each gene in at least 6 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **C- Analysis of Ki67 expression.** Ki67 was detected by immunohistochemistry on wild-type (WT, a) and AdIgf2 adrenals (b). **D- Proliferation is not increased in AdIgf2 adrenals.** Numbers of Ki67-positive cells in a whole adrenal section were counted separately in the cortex (Co) and medulla (M). For each zone, the number of cells was corrected for surface and is expressed as a percentage of Ki67-positive cells in one of the control individuals. Bars represent the mean of at least 7 individual counts in wild-type and AdIgf2 adrenals ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **E- Cyclin D1 expression is not increased in AdIgf2 adrenals.** Expression of Cyclin D1 was analysed by RTqPCR with cDNAs from Wild-type and AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq AdIgf2/WT) of gene expression in at least 5 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **F- Igf2 overexpression does not induce adrenal tumour formation.** The phenotype of AdIgf2 adrenals was followed over a 14 months time course by haematoxylin & eosin staining (b–c) and immunohistochemistry for Ki67 (e–f). A 10 month-old wild-type adrenal was included as a reference (WT, a, d). Some twelve month-old AdIgf2 mice were treated with ACTH for two months in order to increase Igf2 expression. Adrenal histology and proliferation were then assessed by haematoxylin & eosin staining (g) and Ki67 immunohistochemistry (h). Arrows show mesenchymal subcapsular cells. M, medulla; F, fasciculata; G, glomerulosa; Co, cortex. Scale bar is 80 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0044171.g002

alterations in both pathways may accelerate malignant tumour progression. We thus tested this hypothesis by mating AdIgf2 mice with ΔCat mice to generate ΔCat;AdIgf2 compound transgenics. Our initial analysis focused on 10 month-old mice for which we previously generated most of our data. As expected, constitutive activation of β-catenin through deletion of the third exon of the Ctnnb1 gene, resulted in benign adrenal hyperplasia, accumulation of basophilic sub-capsular cells (Figure 3A, b inset, black arrows) and ectopic differentiation of zona glomerulosa cells, shown by expansion of the domain of Disabled2 (Dab2) expression throughout the cortex and inside the medulla (Figure 3A, e). Surprisingly, overexpression of Igf2 in the context of constitutive β-catenin activation did not significantly alter adrenal histology (Figure 3A, c) or Dab2 expression (Figure 3A, f and Figure S4) in the majority of double transgenics when compared with ΔCat mice. The moderate effect of Igf2 overexpression in a ΔCat context was also observed by histological analysis of compound transgenics in which Igf2 was overexpressed through P450SCC regulatory regions (ΔCat;Scc:Igf2, Figure S5). Analysis of the proliferative parameters by Ki67 staining, showed that the number of proliferating cells was significantly increased in the cortex and medulla of ΔCat (Figure 3B, b & Figure 3C, a) and ΔCat;AdIgf2 (Figure 3B, c & Figure 3C, a) adrenals when compared with wild-type (Figure 3B, a & Figure 3C, a). However there was no significant difference between the two genotypes (Figure 3B & C, a). This was further corroborated by RTqPCR analysis of Cyclin D1 expression (Figure 3C, b). Altogether, these experiments suggested that there was no major acceleration of tumour development upon overexpression of Igf2 in the context of constitutive β-catenin activation in 10 month-old adrenals. In order to confirm these observations, we analysed expression of three markers associated with malignancy in ACC patients (Figure 3D). Expression of Vegf-A was significantly increased in both ΔCat and ΔCat; AdIgf2 adrenals. However, there was no further significant increase in ΔCat; AdIgf2 when compared with ΔCat adrenals. Absence of an additive effect of Igf2 was also confirmed for connexin-alpha 43 (Cnx43) for which there was a similar down-regulation in both genotypes. In contrast with our previous analysis of 18 month-old ΔCat adrenals [14], we did not observe an alteration of Nov/Ccn3 expression upon constitutive activation of β-catenin in 10 month-old mice. Again, overexpression of Igf2 had no impact on Nov/Ccn3 expression (Figure 3D). Collectively, these data suggested that Igf2 did not cooperate with β-catenin in the early steps of adrenal cortex tumourigenesis.

We then evaluated a possible cooperation at later stages by analysing 14 month-old transgenic mice. At this stage, ΔCat mice showed quite homogenous signs of tumour progression. Cortical dysplasia was evident (Figure 4A, b) and the cortex was mostly composed of glomerulosa cells as shown by Dab2 staining (Figure 4A, f). Fasciculata differentiation, analysed by Akr1b7 immunohistochemistry (Figure 4A, j), was also altered when compared with wild-type (Figure 4A, i). However there were no obvious signs of malignant progression. Consistent with these histological observations, Ki67 labelling index (Figure 4A, n) was increased when compared with wild-type mice but only one individual exceeded the 5% threshold considered as a marker of malignancy in patients [38] (Figure 4B, a). Anatomo-pathological evaluation showed that 4/5 ΔCat adrenals had a Weiss score of 0 and 1/5 had a Weiss score of 1 resulting from a marked decrease in the number of clear cells and accumulation of compact cells (Figure 4C & Figure S7). Histological analysis of ΔCat;AdIgf2 adrenals showed a broader range of phenotypes. Compound transgenics had histological features reminiscent of 14 month-old ΔCat adrenals, characterised by massive cortical dysplasia (Figure 4A, c–d), accumulation of basophilic spindle-shaped cells (Fig 4Ac) and cortical and medullary invasion by Dab2-positive zona glomerulosa cells (Figure 4A, g–h). However, these features were generally exacerbated when compared with stage-matched ΔCat adrenals. Indeed, the majority of ΔCat;AdIgf2 adrenals (6/7) exhibited a Weiss score of 1 or above (Figure 4C, $p = 0,01$ for Weiss ≥ 1 in Fisher's exact test), mostly characterised by prominent anisokaryosis and the presence of large nucleoli (Figure 4A, d, inset). One adrenal exhibited more profound alterations with both nuclear pleomorphism and the presence of mitoses (Weiss 2, Figure 4A, d, h, l, p). Small areas of oedematous remodelling (2/7) and leukocyte invasion (2/7) were also observed. In the most advanced tumours, Dab2 (glomerulosa, Figure 4A, h) and Akr1b7 (fasciculata, Figure 4A, l) were virtually undetectable, indicating loss of functional differentiation. The presence of these more aggressive features was correlated with increased Ki67 labelling index, which exceeded 20% in 2/7 ΔCat;AdIgf2 adrenals (Figure 4A, p & Figure 4B, a). The relative acceleration of tumour progression in response to Igf2 overexpression was also associated with a significant increase in Cyclin D1 expression in ΔCat;AdIgf2 when compared with ΔCat adrenals (Figure 4B, b), but did not result in further deregulation of malignancy markers expression (Figure S6 compared with Figure 3D). Altogether, these observations suggested that Igf2 overexpression had a moderate but significant promoting effect on tumour progression in 14 month-old ΔCat mice. This was also confirmed in the independent ΔCat;Scc:Igf2 compound transgenic line (Figure S7).

Adrenal tumour patients only show IGF2 overexpression in carcinomas but not adenomas. We thus decided to mimic this situation by further inducing Igf2 expression in ΔCat;AdIgf2 adrenals, right before the onset of spontaneous aggressive tumour transition. For this, 12 month-old ΔCat and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were treated with ACTH for two months. This resulted in a further 3.5 fold increase of Igf2 expression in adrenals from ACTH-treated ΔCat;AdIgf2 mice when compared with untreated animals (27 fold when compared with non transgenic animals, Figure S3E). As expected, this treatment did not induce Igf2 expression in ΔCat mice (Figure S3E). Histological analysis showed that ACTH treatment resulted in marked cellular hypertrophy (Figure 4D, d–e) in both ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. It also induced an exacerbation of the tumour phenotype in both genotypes. Indeed, all animals had at least a Weiss score of 2 (Figure 4C, $p = 0,0022$ for ΔCat *vs* ΔCat + ACTH; $p = 0,0047$ for ΔCat;AdIgf2 *vs* ΔCat;AdIgf2 + ACTH in Fisher's exact test). This score was associated with both accumulation of compact cells, marked nuclear pleomorphism and enlarged nucleoli in both genotypes (Figure 4D, d–e, insets, white arrowheads). However, all these features were much more obvious in ΔCat;AdIgf2 than in ΔCat adrenals. Large areas of oedematous remodelling (Figure 4D, b, c, f, g, dashed lines and inset in g) and leukocyte infiltration (Figure 4C) were also essentially observed in this group. One ACTH-treated ΔCat;AdIgf2 adrenal presented as an overt carcinoma *in situ* (Weiss 3) with diffuse architecture (Figure 4D, c) high grade nuclear alterations, oedematous remodelling (Figure 4D, f, dashed line) and large areas of necrosis (Figure 4D, f, inset). ACTH treatment also induced a significant increase in Ki67 labelling index in ΔCat adrenals compared with their untreated counterparts (Figure 4B, a). Although the increase in Ki67 index was not significant in the ΔCat;AdIgf2 group it resulted in a slight shift upwards (mean 15% vs 11%) and in one adrenal showing a 34% index. Despite these aggressive features,

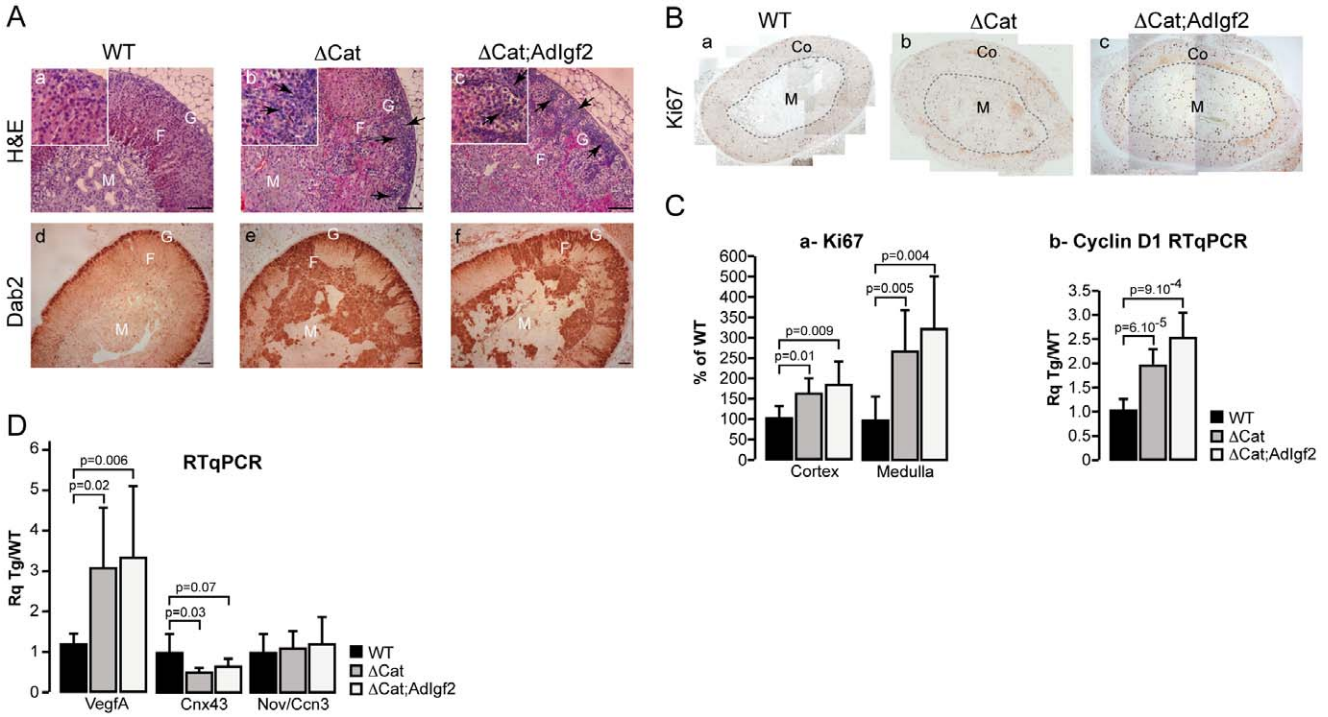
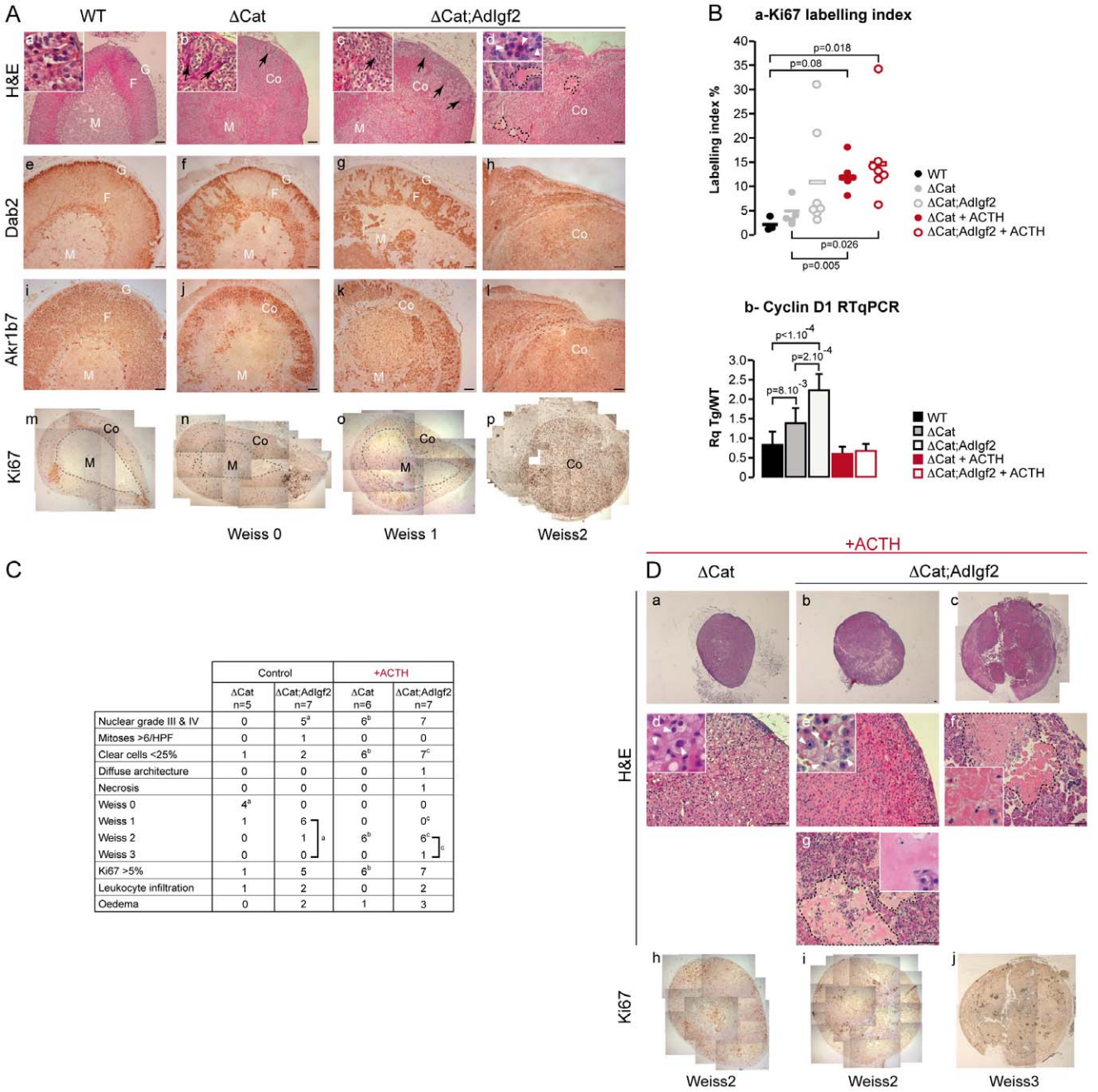


Figure 3. Analysis of the cooperation between β-catenin activation and Igf2 overexpression in 10 month-old mice. A- Igf2 overexpression in 10 month-old ΔCat mice does not significantly alter the adrenal phenotype. AdIgf2 mice were mated with ΔCat mice to generate ΔCat;AdIgf2 compound animals. The adrenal phenotype in 10 month-old mice was analysed by haematoxylin & eosin staining (a–c) and immunohistochemistry for Dab2. Black arrows show infiltrating subcapsular mesenchymal cells. **B- Analysis of Ki67 expression in 10 month-old ΔCat;AdIgf2 adrenals.** Ki67 expression was analysed by immunohistochemistry in wild-type (B, a), ΔCat (B, b) and ΔCat;Igf2 (B, c) adrenals. **C- Igf2 overexpression in ΔCat mice does not significantly increase proliferation. a-Counting of Ki67-positive cells.** Numbers of Ki67-positive cells in a whole adrenal section were counted separately in the cortex (Co) and medulla (M). For each zone, the number of cells was corrected for surface and is expressed as a percentage of Ki67-positive cells in one of the control individuals. Bars represent the mean of at least 7 individual counts in wild-type, ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **b- Analysis of Cyclin D1 expression.** Cyclin D1 expression was analysed by RTqPCR with cDNAs from wild-type, ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **D- Analysis of malignancy markers expression.** Expression of VegfA, Connexina43 (cnx43) and Nov/Ccn3 was analysed by RTqPCR with cDNAs from wild-type (WT), ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. M, medulla; F, fasciculata; G, glomerulosa. Scale bar is 80 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0044171.g003

ACTH treatment resulted in a normalisation of Cyclin D1 expression in both ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. From these experiments, we concluded that elevating Igf2 expression accelerated tumour progression and induced carcinoma in situ development in the context of constitutive β-catenin activation. However, ACTH also had an intrinsic effect on tumour progression in ΔCat adrenals even though Igf2 expression levels were not increased (Figure S3E).

Discussion

Despite recent progress, the molecular mechanisms of malignant adrenal cortical tumour development still remain elusive. The growth factor IGF2 is overexpressed in almost all adrenal cortical carcinomas, suggesting that it may play a role in malignant adrenal tumour formation in patients [8–10,39]. Here, we show that overexpression of Igf2 from 7 to 87 fold over basal levels does not result in adrenal tumour formation in transgenic mice over 14 months, despite a mild increase in cortical cell proliferation (Figures 1 & 2). This indicates that Igf2 alone may stimulate adrenal cortical proliferation but that it is not able to induce oncogenic transformation. This observation is consistent with previously published data, showing that a 4 to 6-fold elevation of serum IGF2 levels in PEPCK-IGF2 transgenic mice did not induce adrenal tumour development [23]. The absence of oncogenic activity of Igf2 in the adrenal gland of transgenic mice may seem surprising at first. However, most models of Igf2 overexpression do not develop tumours although they recapitulate developmental overgrowth alterations associated with BWS [21,22]. Interestingly though, about 20% of transgenic mice with overexpression of IGF2 under the control of the MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus) promoter develop lung tumours after 6 months of age. This proportion rises to about 70% after 18 months [40]. This suggests that in this particular tissue IGF2 may behave as a weak oncogene. Surprisingly, the same transgenic mice do not show tumour development in the mammary epithelium, despite a 50 to 100-fold increase in IGF2 expression in their mammary glands and an inhibition of apoptosis during involution [41]. Therefore the oncogenic potential of Igf2 seems tissue-specific. Igf2 signalling relies on the IGF1R receptor, which can mobilise multiple intracellular pathways, including PI3K/AKT and MAP Kinases [42]. One hypothesis that could account for tissue-specific activity of Igf2 is the coupling of IGF1R signalling with distinct pathways, depending on the cell type. In



C

	Control		+ACTH	
	ΔCat n=5	ΔCat;Adlgf2 n=7	ΔCat n=6	ΔCat;Adlgf2 n=7
Nuclear grade III & IV	0	5[a]	6[b]	7
Mitoses >6/HPF	0	1	0	0
Clear cells <25%	1	2	6[b]	7[c]
Diffuse architecture	0	0	0	1
Necrosis	0	0	0	1
Weiss 0	4[a]	0	0	0
Weiss 1	1	6	0	0[c]
Weiss 2	0	1 [a]	6[b]	6[c]
Weiss 3	0	0	0	1 [c]
Ki67 >5%	1	5	6[b]	7
Leukocyte infiltration	1	2	0	2
Oedema	0	2	1	3

Figure 4. Overexpression of Igf2 results in a mild acceleration of tumour progression in 14 month-old ΔCat adrenals. A- Histological analysis of the adrenal phenotype. Adrenal phenotype in ΔCat and ΔCat;Adlgf2 mice was evaluated by haematoxylin & eosin staining (a–d) and by immunohistochemistry for Dab2 (e–h), Akr1b7 (i–l) and Ki67 (m–p). One column represents analysis of different sections from the same adrenal. Two ΔCat;Adlgf2 individuals showing the mildest (c, g, k, o) and worst (d, h, l, p) phenotypes were included. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. White arrowheads show regions of nuclear pelomorphism. Black dashed lines in d demarcate areas of oedematous remodelling. **B- Analysis of proliferation. a**- Ki67 labelling-index was determined by counting the number of Ki67-positive cells over the total number of cells in five representative 40X fields per adrenal. Each individual index was plotted. The bar represents the mean index value for each group. ΔCat + ACTH and ΔCat;Adlgf2 + ACTH adrenals were obtained from 14 month-old ΔCat and ΔCat;Adlgf2 animals that were treated with ACTH for two months before culling. *P*-value was calculated using ANOVA followed by a post-hoc Fisher LSD test. **b-** Cyclin D1 expression was analysed by RTqPCR with cDNAs from wild-type, ΔCat, ΔCat;Adlgf2, ΔCat + ACTH and ΔCat;Adlgf2 + ACTH adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using ANOVA followed by a post-hoc Fisher LSD test. **C- Determination of the Weiss score.** Weiss score was determined by a trained pathologist, using the criteria defined by Weiss for human adrenal tumours. The table only shows the criteria that were observed in our cohort. The table also includes the number of animals showing a Ki67 index above the critical 5% threshold as well as leukocyte infiltration and occurrence of oedematous remodelling. Statistical analysis was performed by a Fisher Exact Test. Exponent letters correspond to statistically significant differences ($p<0.03$) between control ΔCat and ΔCat;Adlgf2 adrenals (a), control and ACTH-treated ΔCat adrenals (b) and control and ACTH-treated ΔCat;Adlgf2 adrenals (c). Some values had to be considered as a group, to reach significance in the paired comparisons (brackets). **D- Histological analysis of ΔCat and ΔCat;AdIGF2 adrenals in ACTH-treated animals.** Twelve month-old ΔCat and ΔCat;Adlgf2 mice were treated for two months with ACTH before culling. Their

adrenals were then analysed by haematoxylin & eosin staining (a–g) and proliferation was evaluated by Ki67 staining (h–j). One column represents analysis of a single adrenal. Two ΔCat;AdIgf2 + ACTH individuals showing the mildest (b, e, g, i) and worst (c, f, j) phenotypes were included. Pictures in d, e, f and g represent high magnification details of the corresponding adrenals in a, b and c. White arrowheads show areas of nuclear pleomorphism. Black dashed lines demarcate areas of oedematous remodelling (g) and necrosis (f). M, medulla; Co, Cortex; F, fasciculata; G, glomerulosa. Scale bar is 80 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0044171.g004

this respect, one interesting observation is that in various cell lines in culture, mobilisation of the Igf1 receptor by Igf2, Igf1 or insulin can stimulate Wnt signalling, through inhibition of GSK3β [33] or phosphorylation and activation of β-catenin [34–37]. These mechanisms were proposed to account for some of the oncogenic activities of Igf2 and would be particularly relevant for the adrenal, as we previously showed that β-catenin was a *bona fide* oncogene in the adrenal cortex [14]. However, our analysis of β-catenin expression by immunohistochemistry, and of Wnt target genes expression by RTqPCR, failed to show activation of the Wnt/β-catenin pathway in Igf2 transgenic adrenals (Figure 2). It is therefore tempting to speculate that the absence of oncogenic activity of Igf2 in the adrenal may result, at least in part, from its incapacity to activate canonical Wnt signalling in this particular tissue.

Although overexpression of Igf2 *per se* may have low oncogenic potential in transgenic mouse models, there is ample evidence that Igf2 can cooperate with other pathways to accelerate tumour progression. This has been particularly well established for Wnt-dependent carcinogenesis in the colon. Indeed, increasing Igf2 levels through LOI (heterozygous deletion of H19) or with a keratin 10 promoter increases the number and size of colon adenomas as well as malignant progression in $APC^{Min/+}$ mice [43–45]. Conversely, the reduction of Igf2 expression resulting from deletion of the transcriptionally active paternal allele or from the use of a soluble form of the scavenger IGF2R receptor, is associated with reduced number of adenomas and decreased malignant progression [44,45]. Similar observations were also made in hedgehog/patched-dependent medulloblastomas and rhabdomyosarcomas [46,47]. In malignant adrenal cortical tumours, the second most frequent alteration after IGF2 overexpression is constitutive activation of β-catenin [11,13]. Carcinomas that developed with low frequency in ΔCat mice never showed spontaneous overexpression of Igf2 (14 and unpublished observations). Here, we decided to mimic the genetic context of human ACC by mating ΔCat mice with both AdIgf2 and Scc:Igf2 transgenic mice. Our analysis initially focused on the comparison of 10 month-old ΔCat and ΔCat;AdIgf2 or ΔCat;Scc:Igf2 compound transgenics. At this stage, ΔCat mice only developed benign adrenal hyperplasia and dysplasia (14 and this manuscript). Analyses of proliferation, differentiation and expression of malignancy markers showed that overexpression of Igf2 in this context had no significant effect on tumour development (Figure 3). This suggests that Igf2 overexpression is dispensable in the early stages of adrenal tumour development, which is consistent with the low expression of IGF2 in human ACA [9]. We thus evaluated the effect of Igf2 at a later time-point by analysing 14 month-old ΔCat and compound transgenic adrenals. Although there was still heterogeneity in tumour presentation in both ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals at this stage, histopathological analysis showed an almost systematic acceleration of tumour progression in the adrenals that overexpressed Igf2 (Figure 4). Indeed, a vast majority (6/7) of the tumour tissue from ΔCat;AdIgf2 mice had a Weiss score of 1 whereas the majority of ΔCat adrenals (4/5) displayed features consistent with a Weiss score of 0. This acceleration was associated with a significant increase in Cyclin D1 expression in ΔCat;AdIgf2 *vs* ΔCat adrenals and in a large increase in Ki67 labelling index (>20%) in 2/7 adrenals. However, there was still no significant alteration of malignancy markers expression and no overt signs of malignant progression. Overall, these observations show that Igf2 has the potential to accelerate adrenal cortex tumourigenesis. However, this effect is only significant in already advanced lesions and does not induce adrenal carcinoma development even in aged animals.

The mechanisms accounting for the late involvement of Igf2 in adrenal tumour progression are unclear. Similar observations were made in medulloblastomas. Indeed, genetic studies in mouse, showed that Igf2 was dispensable at early pre-cancerous stages but that it was required at later stages of tumour progression [47]. In vitro studies on adrenal carcinoma cell lines with increased IGF2 expression showed that blocking IGF1R activity resulted in both decreased proliferation and induction of apoptosis, indicating that IGF2 was involved in the control of both processes [19,20]. However, we have shown that proliferation and to some extent, malignant transformation, are independent of Igf2 expression in ΔCat adrenals [14]. This suggests that Igf2 overexpression may stimulate another essential process to accelerate tumour progression. Here, we show that Igf2 overexpression in the context of constitutive β-catenin activation results in marked anisokaryosis and appearance of multiple and enlarged nucleoli that are not seen in stage-matched ΔCat adrenals (Figure 4A). Nucleoli are associated with RNA translation, a process dependent on ribosome biogenesis and the protein S6 [48]. Interestingly we show that one of the readouts of Igf2 overexpression in the adrenal cortex is the phosphorylation of the ribosomal protein S6 (Figure 1B). It is therefore tempting to speculate that one of the effects of Igf2 overexpression in adrenal tumour progression is dependent on an increased translation capacity, resulting from phosphorylation and activation of the S6 protein. This seems particularly relevant in light of the recent finding that mTOR pathway is activated and involved in growth stimulation of paediatric adrenocortical carcinomas [49], tumour entities that are also associated with IGF2 overexpression [20].

One surprising finding of our study is the relatively modest effect of Igf2 overexpression on tumour progression in compound transgenics. One may argue that the levels of overexpression achieved in our models are insufficient to induce aberrant stimulation of the IGF signalling pathway. We attempted to overcome this issue by stimulating transgene expression with chronic ACTH exposure over 2 months. This resulted in a marked 27-fold elevation of Igf2 expression (Figure S3E), which was in the range of overexpression in ACC patients [9]. This resulted in overall aggravation of the tumour phenotype in ΔCat;AdIgf2 adrenals, with one tumour presenting as an overt carcinoma *in situ* (Weiss 3). Some ΔCat;AdIgf2 tumours were also characterised by large areas of oedematous remodelling. Although the significance of this finding is unclear, it is correlated with the observation of large cystic hemorrhagic adrenal lesions in BWS patients [50], suggesting that Igf2 overexpression is directly responsible for the development of oedematous alterations. Altogether, these observations suggest that further increasing the levels of Igf2 expression can accelerate tumourigenesis in the context of β-catenin activation. However, one caveat of these experiments is the observation that tumours in the ΔCat group

switch from Weiss 0 or 1 to Weiss 2 and show a significant increase in Ki67 labelling index after ACTH treatment (Figure 4). One may argue that ACTH treatment may indirectly (through elevation of Akr1b7:Cre expression) or directly (through pathway cross-talks [51]) stimulate β-catenin activity. However, this is unlikely as there was no significant increase in Axin2 expression in ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals following ACTH treatment (Figure S8). Even though the role of ACTH on adrenal cells proliferation is still a controversial subject [52], our observations may thus reflect an intrinsic growth promoting effect of this hormone in this particular genetic setting. Interestingly, analysis of IGF pathway actors shows increased expression of IGFBP2 and of the IGF receptor IGF1R in AdIgf2, ΔCat and ΔCat;AdIGF2 adrenals following ACTH treatment (Figure S9). Increased expression of these two positive IGF signalling factors may account for increased proliferation in the different genetic backgrounds. This would be consistent with the observation that IGFBP2 promotes proliferation and cloning efficiency of Y1 adrenocortical cells in culture [53]. These observations further suggest that the growth promoting effect of ACTH could be dependent on increased IGF signalling, irrespective of the genetic context.

Collectively, our data show that IGF2 overexpression in the context of constitutive Wnt/β-catenin activation results in a moderate acceleration of tumour development but that it is not sufficient to trigger malignant tumour progression.

One interesting observation of our studies is the accumulation of Pod-1 positive subcapsular progenitor cells in the adrenal cortex of AdIgf2 transgenic mice (Figure 1). Adrenal cortex cell renewal normally occurs through the recruitment of mesenchymal subcapsular progenitor cells [54]. These are recruited by Sonic Hedgehog (Shh) produced by poorly differentiated steroidogenic cells, localised in the vicinity of adrenal zona glomerulosa. Upon stimulation by Shh, progenitor cells express the hedgehog receptor Patched 1 (Ptch1) and the transcription factor Gli1 [32,55]. Our RTqPCR analyses show overexpression of Ptch1 and Gli1 as well as Pod1. This strongly suggests that Igf2 induces the recruitment of adrenal cells progenitors. A similar role has been attributed to Igf2 for cerebellar granule cell precursors [56,57] and for the mesenchymal progenitors of chondrocytes and osteoblasts [58]. Surprisingly, in AdIgf2 adrenals, Shh expression is downregulated (Figure 1). This suggests that the effect of Igf2 on adrenal progenitor recruitment is independent of Hedgehog signalling. In the cerebellum, Igf2 signalling can cooperate with Hedgehog to favour recruitment of cerebellar granule cell precursors. However, although Igf2 signalling is required for Hedgehog activity, Igf2 activity is independent of smoothened [56]. This suggests a cascade of signalling events in which Hedgehog, through Ptch1 and Gli1, induces Igf2 expression, which in turn signals to progenitors to stimulate their recruitment. Consistent with this hypothesis, Igf2 has been shown to be downstream of Hedgehog signalling in pluripotent mesenchymal cells [24] as well as in medulloblastomas and rhabdomyosarcomas [46,47]. Based on these observations, it is tempting to speculate that Igf2 overexpression in the adrenal cortex bypasses hedgehog signalling to trigger progenitor cells recruitment. The use of Akr1b7 regulatory regions makes it unlikely for Igf2 to be expressed in the same cells that normally express Shh or Gli1 in the adrenal cortex. Consistent with this idea, Igf2 seems to be mostly expressed in differentiated cells of the cortex in AdIgf2 adrenals (Figure 1D). However, Igf2 is a diffusible factor that may act in a paracrine manner in this context. Interestingly, our unpublished analysis of ΔCat mice showed increased expression of Ptc1 and Gli1 in the adrenal cortex. However, in contrast with AdIgf2 transgenics, this was accompanied by overexpression of Shh (A. Berthon, unpublished observations). This suggests that Wnt signalling may be situated at the top of the cascade involved in the recruitment of adrenal progenitors. These observations obviously have implications for normal adrenal homeostasis but also suggest that aberrant recruitment of progenitor cells, resulting from deregulated Wnt, Hedgehog or IGF signalling, may participate in the development of adrenal cortex tumours.

In conclusion, using two distinct transgenic mouse lines allowing overexpression of Igf2, we have shown that increased Igf2 expression is not oncogenic *per se* in the adrenal cortex. We have also shown that it has a significant but moderate effect on tumour progression in the context of β-catenin activation, suggesting that these two alterations are not sufficient to trigger malignant adrenocortical tumourigenesis. These observations raise the question of the efficacy of IGF signalling targeted therapies in the context of ACC. Further studies are warranted to broaden our understanding of the molecular mechanisms involved in the formation of adrenocortical carcinomas.

Supporting Information

Figure S1 Establishment of transgenic lines overexpressing Igf2. A- Transgene constructs. The 0.5 akr1-b7:Igf2 transgene was constructed by cloning the full length mouse Igf2 cDNA (mIgf2) downstream of the Akr1b7 promoter (−510/+44) and upstream of a 3.5 kb segment of Akr1b7 intragenic regions, spanning intron 1 to intron 2 (Akr1b7 intron 2.1). The 4.5 Scc:Igf2 transgene was constructed by cloning mouse Igf2 cDNA downstream of a 4.5kb segment of human P450SCC regulatory regions (hP450SCC promoter) pA: mini intron and polyadenylation signal of SV40 T antigen. **B- Founders and lines.** Transgene constructs were microinjected into pronuclei of fertilized oocytes and transferred to pseudopregnant females. The table summarizes the outcome of these experiments by showing the number and identification (Id) of founders. Transgene copy numbers were evaluated by southern-blotting.
(TIF)

Figure S2 A- Igf1r is expressed in the adrenal. Expression of Igf1 receptor (igf1r) was evaluated by RT-PCR with cDNAs from wild-type (WT) and transgenic adrenals (AdIgf2). The positive control was composed of a mix of cDNAs from adrenals, testes, ovaries, spleen and liver. RT-PCR for 36b4 was included as a normalization reference. **B- S6Kinase phosphorylation is increased in AdIgf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated S6Kinase was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells that are negative for phospho-S6Kinase staining. White arrowheads show negative cells in the wild-type adrenals. **C- GATA4 expression is increased in AdIGF2 adrenals.** Expression of GATA4 was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show GATA4-positive infiltrating cells. **D- Relative positions of zona glomerulosa and zona fasciculata are maintained in AdIgf2 adrenals.** Expression of Akr1b7 (green, fasciculata) and Dab2 (red, glomerulosa) was detected by co-immunohistochemistry on sections from wild-type and AdIgf2 adrenals. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80 μm.
(TIF)

Figure S3 Characterisation of the adrenal phenotype in Scc:Igf2 transgenic mice. A- Expression levels of Igf2 in the two transgenic lines. Igf2 expression was analysed by

RTqPCR on cDNAs from 10 month-old wild-type, 0.5 AdIgf2 and Scc:Igf2 (10 and 14 month-old) adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq AdIgf2/WT) of Igf2 expression for each tissue in at least 5 samples per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **B- Igf2 signalling is increased in Scc:Igf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated ribosomal protein S6 was analysed by immunohistochemistry in WT (a) and AdIgf2 (b) adrenals. **C- Effect of Igf2 overexpression on adrenal histology and differentiation.** Histology was analysed by haematoxylin & eosin staining in wild-type (a), 10 month-old (b) and 14 month-old Scc:Igf2adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **D- Adrenal progenitor cells markers are overexpressed in Scc:Igf2 adrenal.** Expression of the progenitor cells markers, Gli1 and Pod1 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT) and Scc:Igf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq SccIgf2/WT) of gene expression for each marker in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **E- Expression of Igf2 after ACTH induction.** Twelve month-old ΔCat, AdIgf2 and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Igf2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 4 adrenals per genotype and per condition ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80 μm.
(TIF)

Figure S4. Expression of Dab2 in 10 month-old ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Expression of the zona glomerulosa marker Dab2 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT), ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.
(TIF)

Figure S5 Analysis of the adrenal phenotype in 10 month-old ΔCat;Scc:Igf2 mice. Scc:Igf2 transgenic mice were mated with ΔCat mice to generate ΔCat;SccIgf2 compound transgenics. The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 10 month-old animals. Two ΔCat;Scc:Igf2 individuals showing the mildest (c, d) and worst (e, f) phenotypes were included. Pictures in d and f and g represent high magnification details of the corresponding adrenals in c and e respectively. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. White dashed lines demarcate areas of compact cells accumulation. Accumulation of these cells in over 75% of the adrenal is considered as 1 point in Weiss score determination. Scale bar is 80μm.
(TIF)

Figure S6 Analysis of malignancy markers expression in 14 month-old ΔCat;AdIgf2 adrenals. Expression of VegfA, Connexinα43 (cnx43) and Nov/Ccn3 was analysed by RTqPCR with cDNAs from 14 month-old wild-type (WT), ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 6 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.
(TIF)

Figure S7 Analysis of the adrenal phenotype in 14 month-old ΔCat;SccIgf2 mice. The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 14 month-old animals. Three differentΔCat;SccIgf2 adrenals showing the range of phenotypes are presented (b-h). Pictures in f, g and h show high magnification details of pictures in b, c and d respectively. The adrenal in b and f is composed of a majority of compact cells (Weiss 1) delineated by white dashed lines. The adrenal in c and g is mostly composed of a central macro-nodule of spongiocytic cells, but only shows mild accumulation of compact cells (Weiss 0). The adrenal in d and h shows multiple areas of nuclear pleomorphism (white arrowheads, Weiss 1) and lymphocytic invasion (black arrowheads). Please note that the ΔCat adrenal in a and e also shows nuclear pleomorphism (Weiss 1), although overall cortical organisation is preserved. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. Scale bar is 80μm.
(TIF)

Figure S8 Expression of Wnt target gene Axin2 in ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals after ACTH treatment. Twelve month-old ΔCat and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Axin2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition ± standard deviation. There was no statistical difference between groups using Student's *t* test.
(TIF)

Figure S9 Expression of IGFBP2 and IGF1R in response to ACTH treatment. Twelve month-old AdIf2, ΔCat and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were untreated or treated for two months with ACTH. IGFBP2 and IGF1R expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition ± standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t* test.
(TIF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Christelle Damon (Anipath Clermont) for excellent management of the histo-pathology core facility. They would also like to thank Khirredine Ouchen, Sandrine Plantade and Christine Puchol for animal care.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PV AM AMLM BR. Performed the experiments: CD AB BR FT RB ISB CDJ MBL. Analyzed the data: CD AB BR FT JB AM PV. Contributed reagents/materials/analysis tools: CD AB BR FT RB ISB CDJ MBL. Wrote the paper: PV.

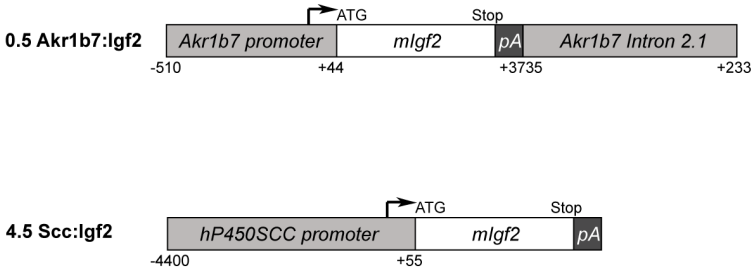
References

1. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, et al. (2000) Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. Cancer 88: 711–736.
2. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M (2011) Contemporary management of adrenocortical carcinoma. Eur Urol 60: 1055–1065.
3. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, et al. (2006) Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of

cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 91: 2650–2655.
4. Assie G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, et al. (2007) Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 92: 148–154.
5. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, et al. (2007) Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. N Engl J Med 356: 2372–2380.
6. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Casa SD, et al. (2005) Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. Endocr Relat Cancer 12: 657–666.
7. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, et al. (2001) Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. World J Surg 25: 891–897.
8. Gicquel C, Raffin-Sanson M, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, et al. (1997) 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: 2559–2565.
9. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, et al. (2003) Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. Am J Pathol 162: 521–531.
10. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, et al. (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: 1819–1829.
11. Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, et al. (2011) beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. Clin Cancer Res 17: 328–336.
12. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, et al. (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: 7622–7627.
13. Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P (2011) Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. Mol Cell Endocrinol 351: 87–95.
14. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, et al. (2010) Constitutive {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Hum Mol Genet 19: 1561–1576.
15. Rump P, Zeegers MPA, van Essen AJ (2005) Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. Am J Med Genet A 136: 95–104.
16. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, et al. (2001) Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. Cancer Res 61: 6762–6767.
17. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D (1997) Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. Eur J Endocrinol 136: 296–303.
18. Boulle N, Logié 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: 1713–1720.
19. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, et al. (2009) Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. J Clin Endocrinol Metab 94: 204–212.
20. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, et al. (2008) Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 93: 3524–3531.
21. Sun FL, Dean WL, Kelsey G, Allen ND, Reik W (1997) Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. Nature 389: 809–815.
22. Eggenschwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM, et al. (1997) Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. Genes Dev 11: 3128–3142.
23. Weber MM, Fottner C, Schmidt P, Brodowski KM, Gittner K, et al. (1999) Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. Endocrinology 140: 1537–1543.
24. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ (2002) Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. Oncogene 21: 8196–8205.
25. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, et al. (1999) Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. Embo J 18: 5931–5942.
26. Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Veyssiere G, et al. (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: 3010–3019.
27. Val P, Jeays-Ward C, Swain A (2006) Identification of a novel population of adrenal-like cells in the mammalian testis. Dev Biol 299: 250–256.
28. Lambert-Langlais S, Val P, Guyot S, Ragazzon B, Sahut-Barnola I, et al. (2009) A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. Mol Cell Endocrinol 300: 197–204.
29. Hu MC, Chou SJ, Huang YY, Hsu NC, Li H, et al. (1999) Tissue-specific, hormonal, and developmental regulation of SCC-LacZ expression in transgenic mice leads to adrenocortical zone characterization. Endocrinology 140: 5609–5618.
30. Bielinska M, Kiiveri S, Parviainen H, Mannisto S, Heikinheimo M, et al. (2006) Gonadectomy-induced adrenocortical neoplasia in the domestic ferret (mustela putorius furo) and laboratory mouse. Vet Pathol 43: 97–117.
31. Romero DG, Yanes LL, de Rodriguez AF, Plonczynski MW, Welsh BL, et al. (2007) Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. Endocrinology 148: 2644–2652.
32. King P, Paul A, Laufer E (2009) Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 21185–21190.
33. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378: 785–789.
34. Morali OG, Delmas V, Moore R, Jeanney C, Thiery JP, et al. (2001) IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. Oncogene 20: 4942–4950.
35. Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, et al. (2005) Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. Mol Cell 19: 159–170.
36. Verras M, Sun Z (2005) Beta-catenin is involved in insulin-like growth factor 1-mediated transactivation of the androgen receptor. Mol Endocrinol 19: 391–398.
37. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, et al. (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. J Biol Chem 282: 11221–11229.
38. Papotti M, Libé R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, et al. (2011) The Weiss Score and Beyond-histopathology for Adrenocortical Carcinoma. Horm Canc 2: 333–340.
39. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, et al. (2009) Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. J Clin Oncol 27: 1108–1115.
40. Moorehead RA, Sanchez OH, Baldwin RM, Khokha R (2003) Transgenic overexpression of IGF-II induces spontaneous lung tumors: a model for human lung adenocarcinoma. Oncogene 22: 853–857.
41. Moorehead RA, Fata JE, Johnson MB, Khokha R (2001) Inhibition of mammary epithelial apoptosis and sustained phosphorylation of Akt/PKB in MMTV-IGF-II transgenic mice. Cell Death Differ 8: 16–29.
42. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P (2007) The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. Endocr Rev 28: 20–47.
43. Sakatani T, Kaneda A, Iacobuzio-Donahue CA, Carter MG, de Boom Witzel S, et al. (2005) Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. Science 307: 1976–1978. Available:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15731405. Accessed 27 March 2012.
44. Harper J, Burns JL, Foulstone EJ, Pignatelli M, Zaina S, et al. (2006) Soluble IGF2 receptor rescues Apc(Min/+) intestinal adenoma progression induced by Igf2 loss of imprinting. Cancer Res 66: 1940–1948.
45. Hassan AB, Howell JA (2000) Insulin-like growth factor II supply modifies growth of intestinal adenoma in Apc(Min/+) mice. Cancer Res 60: 1070–1076.
46. Hahn H, Wojnowski L, Specht K, Kappler R, Calzada-Wack J, et al. (2000) Patched target Igf2 is indispensable for the formation of medulloblastoma and rhabdomyosarcoma. J Biol Chem 275: 28341–28344.
47. Corcoran RB, Bachar Raveh T, Barakat MT, Lee EY, Scott MP (2008) Insulin-like growth factor 2 is required for progression to advanced medulloblastoma in patched1 heterozygous mice. Cancer Res 68: 8788–8795.
48. Holland EC, Sonenberg N, Pandolfi PP, Thomas G (2004) Signaling control of mRNA translation in cancer pathogenesis. Oncogene 23: 3138–3144.
49. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, et al. (2010) Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. Cancer Res 70: 4666–4675.
50. McCauley RG, Beckwith JB, Elias ER, Faerber EN, Prewitt LH Jr, et al. (1991) Benign hemorrhagic adrenocortical macrocysts in Beckwith-Wiedemann syndrome. AJR Am J Roentgenol 157: 549–552.
51. Taurin S, Sandbo N, Yau DM, Sethakorn N, Dulin NO (2008) Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 294: C1169–C1174.
52. Mattos GE, Jacysyn JF, Amarante-Mendes GP, Lotfi CFP (2011) Comparative effect of FGF2, synthetic peptides 1-28 N-POMC and ACTH on proliferation in rat adrenal cell primary cultures. Cell Tissue Res 345: 343–356.
53. Hoeflich A, Fettscher O, Lahm H, Blum WF, Kolb HJ, et al. (2000) Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. Cancer Res 60: 834–838.
54. Kim AC, Barlaskar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, et al. (2009) In search of adrenocortical stem and progenitor cells. Endocr Rev 30: 241–263.

55. Laufer E, Kesper D, Vortkamp A, King P (2012) Sonic hedgehog signaling during adrenal development. Mol Cell Endocrinol 351: 19–27.
56. Fernandez C, Tatard VM, Bertrand N, Dahmane N (2010) Differential modulation of Sonic-hedgehog-induced cerebellar granule cell precursor proliferation by the IGF signaling network. Dev Neurosci 32: 59–70.
57. Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schüller U, et al. (2005) Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. Am J Pathol 166: 1153–1162.
58. Hardouin SN, Guo R, Romeo P-H, Nagy A, Aubin JE (2011) Impaired mesenchymal stem cell differentiation and osteoclastogenesis in mice deficient for Igf2-P2 transcripts. Development 138: 203–213.

A



B

Construct	Founders	Id	Copy number	establishment of lines
0.5 Akr1b7:Igf2	8	F0-10	2	yes
		F0-14	4	no transmission
		F0-16	4	recombined tg
		F0-20	**25**	**yes**
		F0-22	4	yes
		F0-26	4	no
		F0-30	8	no
		F0-34	4	no
4.5 Scc:Igf2	3	F0-2	>30	dead at birth
		F0-14	2	yes
		F0-19	**5**	**yes**

Figure S1. Establishment of transgenic lines overexpressing Igf2.
A- Transgene constructs. The 0.5 akr1b7:Igf2 transgene was constructed by cloning the full length mouse Igf2 cDNA (mIgf2) downstream of the Akr1b7 promoter (-510/+44) and upstream of a 3.5 kb segment of Akr1b7 intragenic regions, spanning intron 1 to intron 2 (Akr1b7 intron 2.1). The 4.5 Scc:Igf2 transgene was constructed by cloning mouse Igf2 cDNA downstream of a 4.5kb segment of human P450SCC regulatory regions (hP450SCC promoter) pA: mini intron and polyadenylation signal of SV40 T antigen**. B- Founders and lines.** Transgene constructs were microinjected into pronuclei of fertilized oocytes and transferred to pseudopregnant females. The table summarizes the outcome of these experiments by showing the number and identification (Id) of founders. Transgene copy numbers were evaluated by southern-blotting.

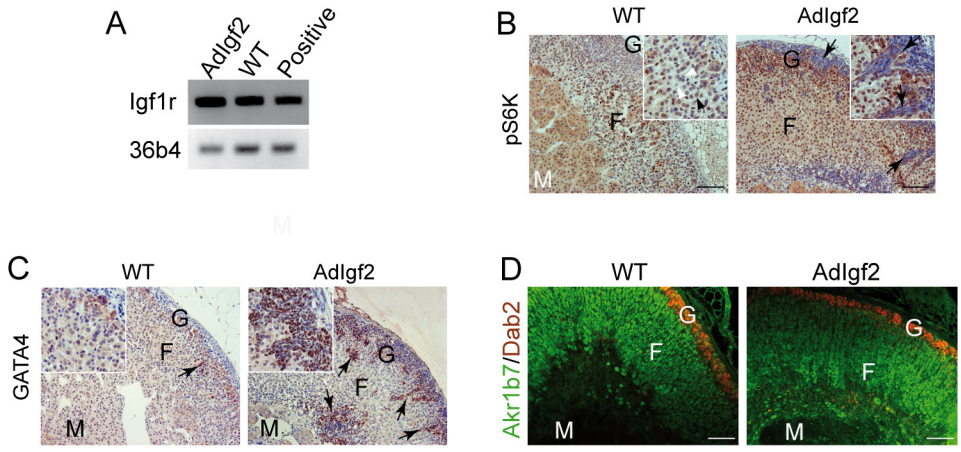


Figure S2. A- Igf1r is expressed in the adrenal. Expression of Igf1 receptor (igf1r) was evaluated by RT-PCR with cDNAs from wild-type (WT) and transgenic adrenals (AdIgf2). The positive control was composed of a mix of cDNAs from adrenals, testes, ovaries, spleen and liver. RT-PCR for 36b4 was included as a normalization reference. **B- S6Kinase phosphorylation is increased in AdIgf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated S6Kinase was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells that are negative for phospho-S6Kinase staining. White arrowheads show negative cells in the wild-type adrenals. **C- GATA4 expression is increased in AdIGF2 adrenals.** Expression of GATA4 was analysed by immunohistochemistry in wild-type and AdIgf2 adrenals. Black arrows show GATA4-positive infiltrating cells.**D- Relative positions of zona glomerulosa and zona fasciculata are maintained in AdIgf2 adrenals.** Expression of Akr1b7 (green, fasciculata) and Dab2 (red, glomerulosa) was detected by co-immunohistochemistry on sections from wild-type and AdIgf2 adrenals. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80 µm.

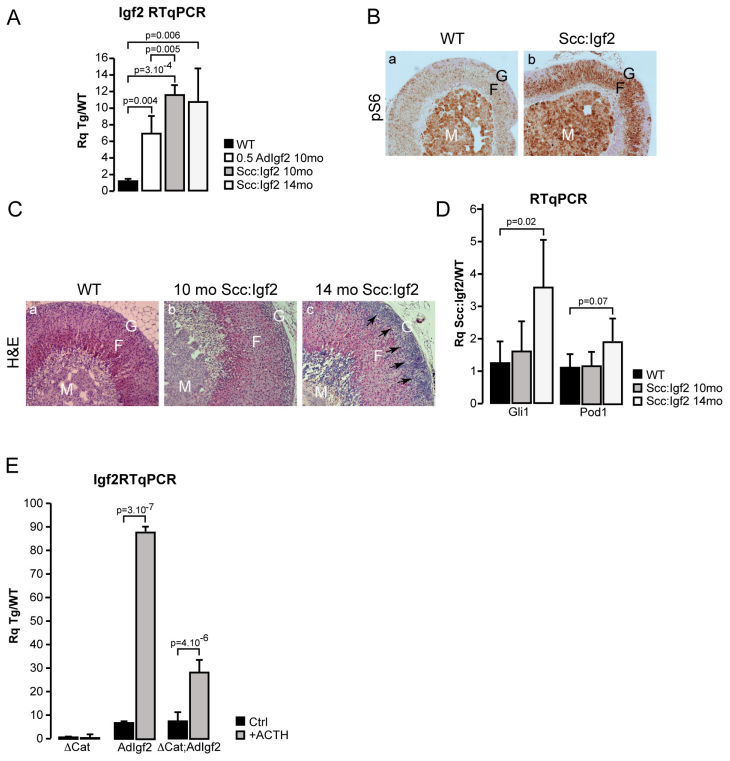


Figure S3. Characterisation of the adrenal phenotype in Scc:Igf2 transgenic mice.

A- Expression levels of Igf2 in the two transgenic lines. Igf2 expression was analysed by RTqPCR on cDNAs from 10 month-old wild-type, 0.5 AdIgf2 and Scc:Igf2 (10 and 14 month-old) adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq AdIgf2/WT) of Igf2 expression for each tissue in at least 5 samples per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **B- Igf2 signalling is increased in Scc:Igf2 adrenals.** Expression of the phosphorylated ribosomal protein S6 was analysed by immunohistochemistry in WT (a) and AdIgf2 (b) adrenals. **C- Effect of Igf2 overexpression on adrenal histology and differentiation.** Histology was analysed by haematoxylin & eosin staining in wild-type (a), 10 month-old (b) and 14 month-old Scc:Igf2adrenals. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. **D- Adrenal progenitor cells markers are overexpressed in Scc:Igf2 adrenal.** Expression of the progenitor cells markers, Gli1 and Pod1 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT) and Scc:Igf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq SccIgf2/WT) of gene expression for each marker in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. **E- Expression of Igf2 after ACTH induction.** Twelve month-old ΔCat, AdIgf2 and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Igf2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 4 adrenals per genotype and per condition ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test. M, medulla; F, Fasciculata; G, Glomerulosa. Scale bar is 80 µm.

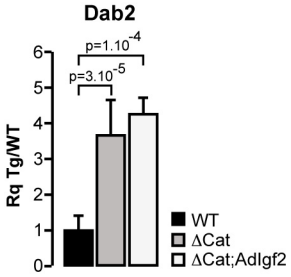


Figure S4. Expression of Dab2 in 10 month-old ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Expression of the zona glomerulosa marker Dab2 was analysed by RTqPCR on cDNAs from wild-type (WT), ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression in at least 7 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.

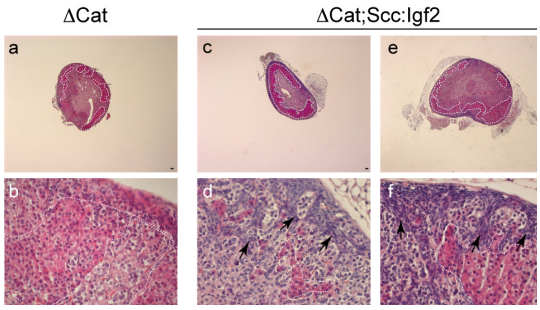


Figure S5. Analysis of the adrenal phenotype in 10 month-old ΔCat;Scc:Igf2 mice.
Scc:Igf2 transgenic mice were mated with ΔCat mice to generate ΔCat;SccIgf2 compound transgenics. The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 10 month-old animals. Two ΔCat;Scc:Igf2 individuals showing the mildest (c,d) and worst (e,f) phenotypes were included. Pictures in d and f and g represent high magnification details of the corresponding adrenals in c and e respectively. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. White dashed lines demarcate areas of compact cells accumulation. Accumulation of these cells in over 75% of the adrenal is considered as 1 point in Weiss score determination. Scale bar is 80µm.

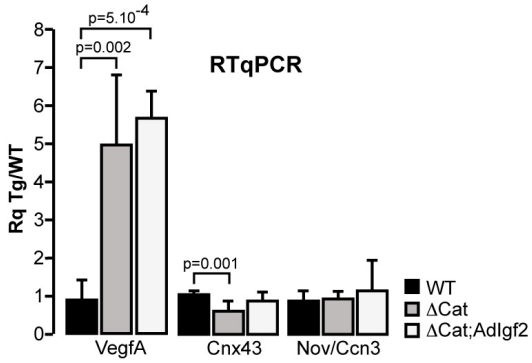


Figure S6. Analysis of malignancy markers expression in 14 month-old ΔCat;AdIgf2 adrenals.
Expression of VegfA, Connexina43 (cnx43) and Nov/Ccn3 was analysed by RTqPCR with cDNAs from 14 month-old wild-type (WT), ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 6 adrenals per genotype ± standard deviation. *P*-value was calculated using Student's *t*-test.

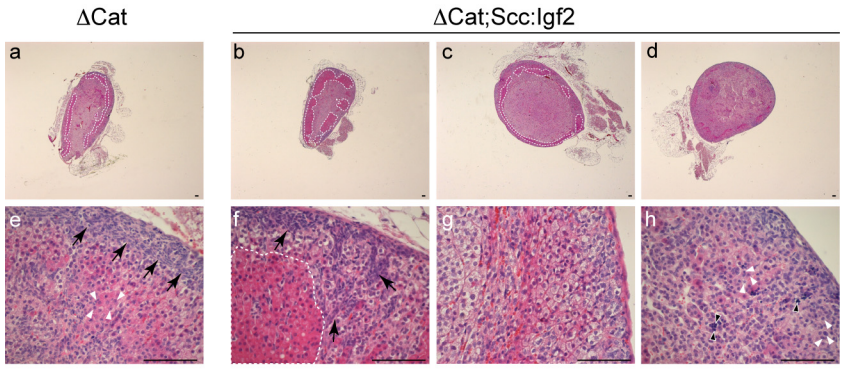


Figure S7. Analysis of the adrenal phenotype in 14 month-old ΔCat;SccIgf2 mice.
The adrenal phenotype was analysed by haematoxylin & eosin staining in 14 month-old animals. Three different ΔCat;SccIgf2 adrenals showing the range of phenotypes are presented (b-h). Pictures in f,g and h show high magnification details of pictures in b,c and d respectively. The adrenal in b and f is composed of a majority of compact cells (Weiss 1) delineated by white dashed lines. The adrenal in c and g is mostly composed of a central macro-nodule of spongiocytic cells, but only shows mild accumulation of compact cells (Weiss 0). The adrenal in d and h shows multiple areas of nuclear pleomorphism (white arrowheads, Weiss 1) and lymphocytic invasion (black arrowheads). Please note that the ΔCat adrenal in a and e also shows nuclear pleomorphism (Weiss 1), although overall cortical organisation is preserved. Black arrows show infiltrating mesenchymal subcapsular cells. Scale bar is 80µm.

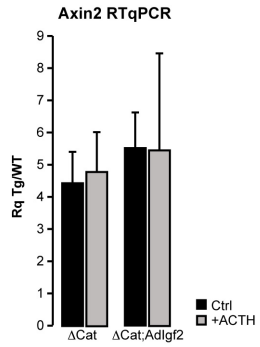


Figure S8. Expression of Wnt target gene Axin2 in ΔCat and ΔCat;AdIgf2 adrenals after ACTH treatment.
Twelve month-old ΔCat and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were treated for two months with ACTH or vehicle (ctrl). Axin2 expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition ± standard deviation. There was no statistical difference between groups using Student's *t* test.

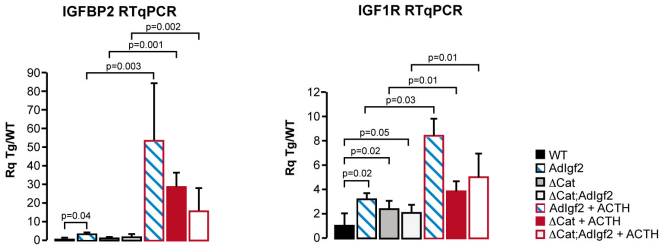


Figure S9. Expression of IGFBP2 and IGF1R in response to ACTH treatment.
Twelve month-old AdIf2, ΔCat and ΔCat;AdIgf2 transgenic mice were untreated or treated for two months with ACTH. IGFBP2 and IGF1R expression levels in the adrenals were analysed by RTqPCR. Levels of accumulation in each group are presented relative to wild-type untreated adrenals. Bars represent the mean relative quantification (Rq Tg/WT) of gene expression for each marker in at least 5 adrenals per genotype and per condition ± standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's *t* test.

Conclusions et discussions

La caractérisation des souris qui surexpriment *Igf2* dans le cortex surrénalien (souris AdIgf2) a permis de montrer que la surexpression de *Igf2* seul n'induit pas le développement de tumeurs cortico-surrénaliennes. De la même manière, quand elle est associée génétiquement avec une activation de la voie Wnt/ßcaténine, la surexpression de *IGF2* n'induit pas d'aggravation du phénotype au stade bénin et ne semble donc pas requise pendant cette phase. En accord avec ces résultats, la surexpression de *IGF2* est très rare dans les adénomes cortico-surrénaliens sporadiques humains (ACS) (Giordano et al., 2003). Toutefois, dans les stades tardifs, l'association des deux altérations entraine une augmentation de la prolifération avec un index Ki67>5% et l'apparition d'un haut grade nucléaire et d'œdèmes qui conduisent à une augmentation du score de Weiss chez les souris double-transgéniques par rapport au souris ΔCat. L'augmentation de la prolifération constatée chez les souris ΔCat ;AdIgf2 confirme que la surexpression de *IGF2* induit chez la souris comme chez l'Homme (Barlaskar et al., 2008) la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes. Malgré ces effets de la surexpression de *Igf2* sur les cellules cortico-surrénaliennes, la prévalence des carcinomes cortico-surrénaliens n'est pas augmentée dans les souris double transgéniques. La surexpression de *Igf2* induit donc certaines caractéristiques malignes mais n'est pas suffisante à elle seule pour induire la progression vers un carcinome cortico-surrénalien.

Les altérations secondaires responsables de la progression maligne chez l'Homme, mais également chez les souris ΔCat, restent donc à identifier. Depuis quelques années, il a été démontré qu'outre les évènements « classiques » de transformation cellulaire (les mutations dans les proto-oncogènes, les suppresseurs de tumeurs et les instabilités génomiques), il existe également des épimutations qui fournissent le second hit nécessaire à l'initiation du cancer (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011). Ces épimutations correspondent à une rupture de la machinerie épigénétique qui est responsable de la régulation de la transcription des gènes au travers du contrôle de la méthylation de l'ADN et des patrons de modifications d'histones. Lors de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la dérégulation de EZH2 (Enhancer of Zeste 2) qui est responsable de la mise en place d'une marque dite « répressive » de la transcription de ses gènes cibles. Ainsi, EZH2 est la principale enzyme responsable de la mise en place de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) qui induit une compaction de l'ADN et limite ainsi l'accessibilité des promoteurs pour les facteurs de transcription. Même s'il présente le domaine SET nécessaire pour son activité histone

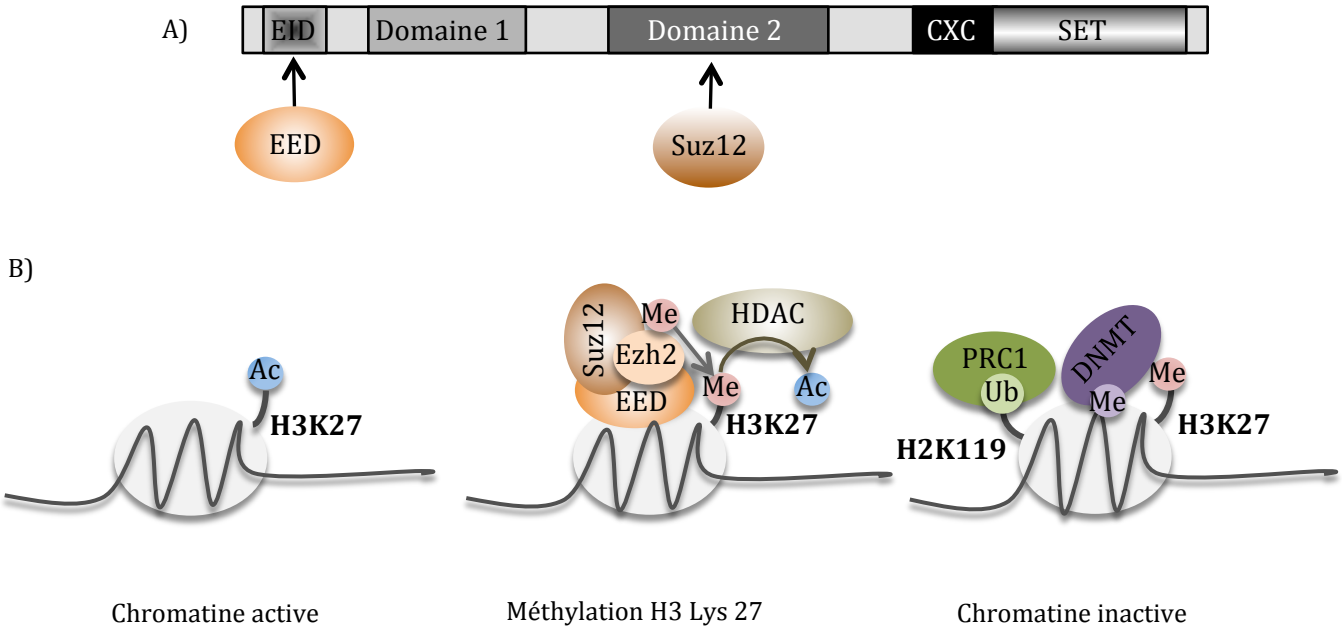


Figure 46 : Représentation de EZH2 et de la fonction du complexe PRC2-PRC1
A) Schéma représentant les différents domaines de la protéine EZH2 (Enhancer of Zest 2), dont les domaines de liaison avec deux autres membres du complexe PRC2 (Polycomb Repressor Complex 2), EED (Embryonic Ectoderm Development) et Suz12 (Suppressor of zeste 12). B) Lorsque la chromatine est active, l'histone H3 est associée avec des marques dites « permissives » tels qu'une acétylation (Ac). Quand EZH2 est au niveau de l'histone H3, il recrute des histones désacétylases (HDAC) qui enlèvent l'acétylation des histone et les autres membres du complexe PRC2, Suz12 et EED nécessaires pour sa pleine activité d'histone méthyltransférase. La tri-méthylation (Me) de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27), déposée par le complexe PRC2, est reconnue par le complexe PRC1 qui ubiquitine (Ub) la lysine 119 de l'histone H2A (H2K119). Enfin, les DNA méthyltransférases (DNMT) méthylent l'ADN afin de verrouiller la répression transcriptionnelle.

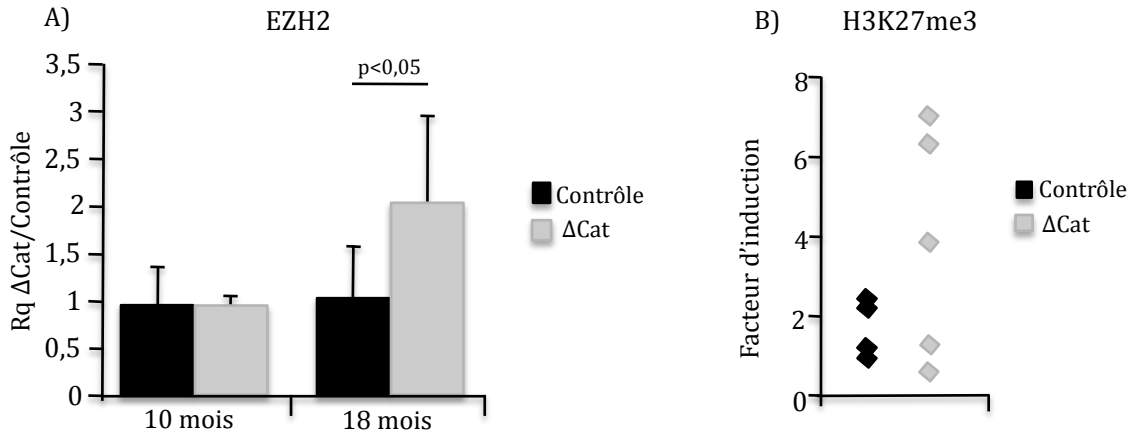


Figure 47 : Ezh2 est surexprimé uniquement dans les tumeurs avancées des souris ΔCat
A) **Analyse de l'expression de Ezh2**. L'expression d'Ezh2 (Enhancer of Zest 2) a été analysée par RTqPCR sur les ARNm reverse transcrits extraits des surrénales des souris contrôles et ΔCat âgées de 10 mois (stade bénin pour les souris ΔCat) et de 18 mois (stade avancé pour les souris ΔCat). Les niveaux d'expression ont été normalisés par rapport à l'expression du gène de ménage PPIB. Le graphique représente la moyenne des niveaux relatifs d'expression chez les deux groupes de souris. B) **Analyse de la marque H3K27me3**. Etude en Western Blot de la présence de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) déposée par EZH2, dans des extraits protéiques totaux de surrénales contrôles et ΔCat.

méthyltransférase (HMT), l'interaction de EZH2 avec les autres membres du complexe PRC2 (Polycomb Repressor Complex 2), SUZ12 (Suppressor of zeste 12) et EED (Embryonic Ectoderm Development) est nécessaire pour une activité méthyltransférase optimale. Une fois posée, la marque H3K27me3 est reconnue par le complexe PRC1 composé des protéines des familles Polycomb et polyhoméotiques. Le complexe PRC1 monoubiquitine alors la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119ub1) pour empêcher l'élongation transcriptionnelle dépendante de l'ARN polymérase II et donc conforter la répression de la transcription (Chang and Hung, 2012). D'autre part, EZH2 interagit directement avec des DNA méthyltransférase (Figure 46) qui méthylent les îlots CpG pour inhiber stablement la transcription des gènes préalablement marqués par EZH2, dont certains suppresseurs de tumeurs (Simon and Lange, 2008). Ce mécanisme de répression par le complexe PRC2 contrôle de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que le cycle cellulaire, la sénescence, la différenciation et le cancer (Sauvageau and Sauvageau, 2010). En effet, *EZH2* est surexprimé dans de nombreux cancers dont le sein, la prostate, le colon, le poumon, le pancréas, le lymphome, le sarcome. Son pouvoir oncogénique a été validé par le phénotype d'hyperplasie épithéliale mammaire, observé suite à sa surexpression dans un modèle de souris. De plus, il a été démontré dans différents modèles cellulaires que l'action de EZH2 sur les cellules tumorales passe au moins en partie par le contrôle de la prolifération (Chang and Hung, 2012). Ces dernières années, le rôle de EZH2 dans la tumorigenèse a donc été défini et sa surexpression est associée avec des stades avancées de cancers et un mauvais pronostic (Sauvageau and Sauvageau, 2010). Par conséquent, la surexpression de EZH2 peut être un candidat intéressant dans la progression des tumeurs cortico-surrénaliennes.

1) Surexpression de EZH2 chez les souris ΔCat âgées de 18 mois

Nous avons analysé l'expression de *EZH2* chez des souris ΔCat et contrôles âgées de 10 et 18 mois afin de déterminer si sa surexpression est retrouvée au cours de la progression tumorale. A 10 mois, lorsque les souris ΔCat présentent un adénome cortico-surrénalien, l'expression de *EZH2* n'est pas modifiée par rapport aux souris sauvages (Figure 47). Par contre, à 18 mois, quand les tumeurs des souris ΔCat ont progressé vers la malignité, elles présentent une surexpression de *EZH2* qui est associée avec les plus grosses masses tumorales. L'augmentation de l'expression de *EZH2* semble donc associée avec la progression tumorale dans les CCS murins des souris ΔCat. Nous avons donc cherché à déterminer si cette surexpression de *EZH2* s'accompagne d'une augmentation de son activité, visible au travers de l'analyse de la marque H3K27me3 sur l'ensemble du génome. Cette analyse réalisée en Western Blot a permis de démontrer que les surrénales des souris ΔCat de 18 mois ont une augmentation globale de la présence de la marque H3K27me3 suggérant que la surexpression de *EZH2* se

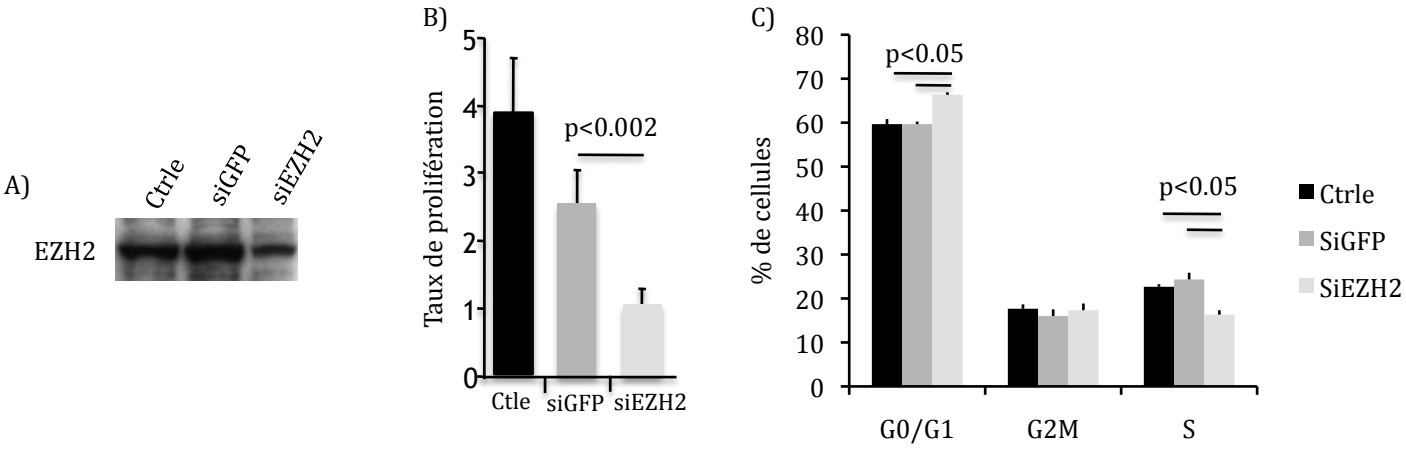


Figure 48 : Rôle de EZH2 dans les cellules H295R

A) **Analyse de l'expression de EZH2**. Le niveau de protéines EZH2 (Enhancer of Zest 2) a été analysée en Western Blot dans des extraits protéiques de cellules H295R contrôles ou transfectées avec des siRNA dirigés contre la GFP ou EZH2. B) **Niveau de la prolifération dans les cellules H295R.** Le nombre de cellules présentes dans un puits de plaque 6 puits a été compté 5 jours après la transfection des siRNA contrôle (siGFP) ou siRNA EZH2. Le graphique représente le taux de prolifération par rapport aux nombres de cellules ensemencées au départ. Ces expériences ont été réalisées trois fois. C) **Analyse du cycle cellulaire**. Le graphique représente le pourcentage de cellules en phase G0/G1, G2M ou S 5 jours après transfection. La répartition dans le cycle a été analysée en cytométrie en flux, après incorporation de iodure de propidium.

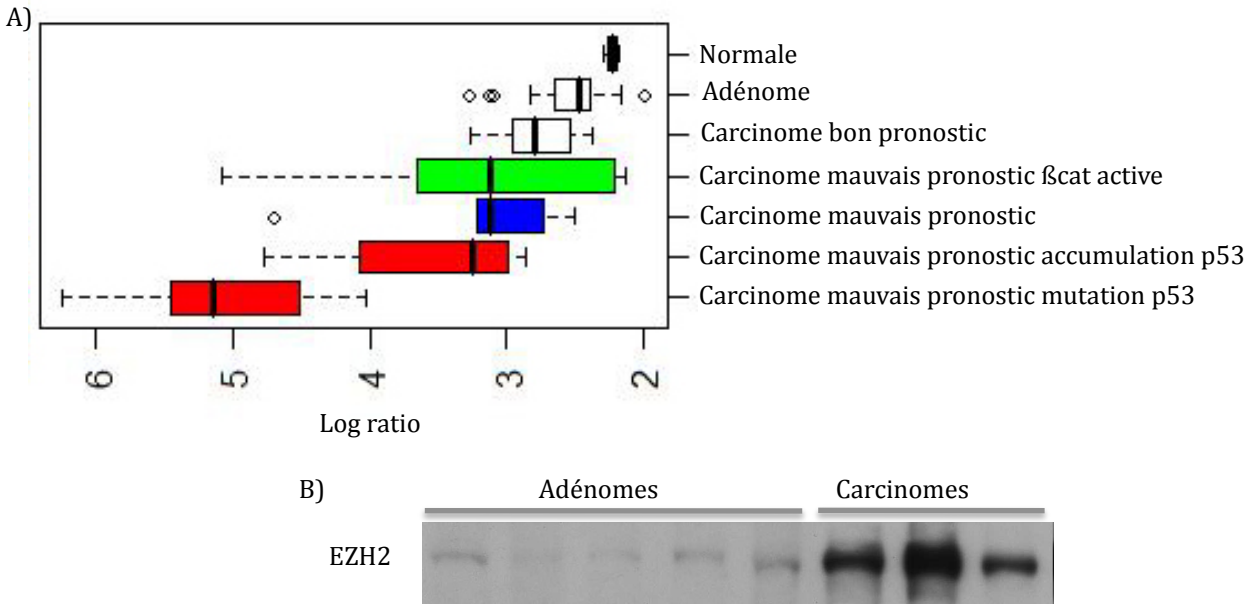


Figure 49 : Expression de EZH2 dans des surrénales de patients

A) L'expression de EZH2 exprimée en log ratio a été analysée dans les données de transcriptome et représentée en fonction des groupes de CCS (bon ou mauvais pronostic avec ßcaténine activée, accumulation ou mutation de p53), établis dans l'article de Ragazzon et al., 2011. B) Analyse en Western Blot de l'expression de EZH2 dans des extraits protéiques d'adénomes ou de carcinomes de l'enfant, présentant des mutations de p53.

traduit par sa suractivité dans les surrénales des souris ΔCat. Par conséquent, EZH2 pourrait être impliqué dans la progression des CCS au moins chez les souris ΔCat.

2) Rôle de EZH2 dans les cellules cortico-surrénaliennes H295R

EZH2 étant impliqué dans le contrôle de nombreux processus cellulaires, nous avons cherché à savoir s'il jouait un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes humaines, les H295R. La diminution de l'expression de *EZH2* par des transfections de siARN anti-EZH2 induit un arrêt de la prolifération des H295R : leur nombre n'a pas augmenté 5 jours après la transfection du siARN spécifique alors que les cellules transfectées avec le siARN contrôle (GFP) ont vu leur nombre multiplié par 3 (Figure 48). Cette perte de prolifération est associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. EZH2 joue donc un rôle important dans le contrôle de la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes et sa dérégulation pourrait donc être impliquée dans la progression tumorale humaine au travers de ce contrôle.

3) Surexpression de EZH2 dans les carcinomes cortico-surrénaliens humains

Une analyse rétrospective du transcriptome de la cohorte Cochin de TCS (De Reynies et al., 2009) a permis de déterminer que la surexpression de *EZH2* est retrouvée dans les adénomes et les carcinomes cortico-surrénaliens humains par rapport aux surrénales normales (Figure 49). Toutefois, l'augmentation d'expression de *EZH2* est clairement supérieure dans les carcinomes par rapport aux adénomes. Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus chez les souris ΔCat et suggèrent que EZH2 est associé avec la progression maligne. L'analyse fine des données de transcriptomique a par ailleurs permis de montrer que la surexpression de *EZH2* est plus importante dans le groupe de carcinomes de mauvais pronostic (Figure 49) qui est lui même divisé en quatre sous-groupes reposant sur les anomalies génétiques associées (Ragazzon et al., 2010). Nous retrouvons donc le groupe des CCS avec une activation de la voie Wnt/ßcaténine, celui avec une mutation de p53, celui avec une accumulation de p53 (signe d'une dérégulation de p53) et un groupe de CCS dont l'altération génétique reste toujours à déterminer. L'analyse de l'expression de *EZH2* démontre clairement que sa surexpression est certes retrouvée dans chacun de ces groupes, dont celui de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine, mais qu'elle est plus conséquente dans le groupe présentant une mutation de p53 (Figure 49).

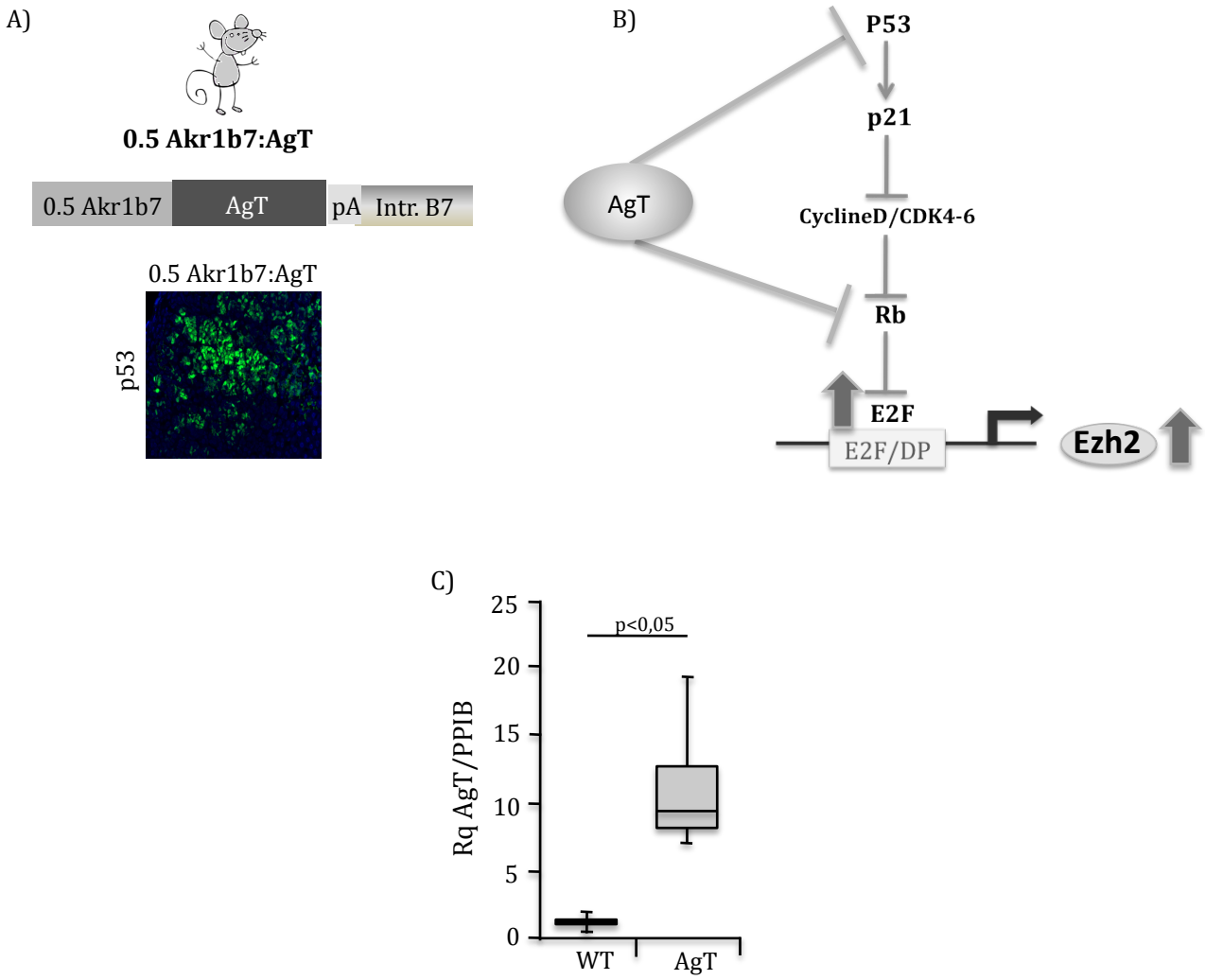


Figure 50 : Expression de EZH2 dans les surrénales de souris transgéniques qui surexpriment l'AgT.
A) **Présentation des souris AgT.** Représentation schématique du transgène présent chez les souris AgT, qui permet le ciblage de l'expression de l'AgT de SV40 dans la cortico-surrénale. p53 a été détecté par immunohistochimie sur des coupes de surrénales de souris AgT. B) Schématisation de la voie de contrôle de l'expression de EZH2 (Enhancer of Zest 2) par p53 et de l'effet possible de l'AgT sur cette régulation. C) **Analyse de l'expression de Ezh2**. L'expression de Ezh2 a été analysé en RTqPCR sur les ARN extraits de surrénales de souris contrôles et AgT de 5 mois, qui avaient été préalablement reverse transcrits. Les niveaux d'expression ont été normalisés sur l'expression du gène de ménage, PPIB. Le graphique représente la moyenne des niveaux relatifs d'expression. L'analyse statistique a été réalisée par le test de Student.

4) La dérégulation de P53 pourrait causer la surexpression de EZH2

L'association de la surexpression de *EZH2* avec les mutations de p53 n'est pas forcément surprenante compte tenu des données bibliographiques qui montrent que p53 réprime l'expression de *EZH2* en contrôlant l'expression de p21 (Figure 50) (Tang et al., 2004). Nous avons donc cherché à déterminer si p53 régule l'expression de *EZH2* dans le cortex surrénalien. Nous possédons au laboratoire un modèle de souris transgéniques qui exprime l'antigène T de SV40 spécifiquement dans le cortex surrénalien grâce aux régions régulatrices du gène *Akr1b7* (Figure 50). Comme attendu, les images d'immunohistochimie montrent que l'antigène T séquestre p53 dans le cytoplasme des surrénales des souris AgT mais pas des souris contrôles (Figure 50). Cette séquestration inhibe son activité et induit le développement de tumeurs cortico-surrénaliennes initialement bénignes qui progressent vers la malignité et la formation de métastases à 7-8 mois (Résultats non montrés). Si la répression de l'expression de *EZH2* par p53 décrite dans d'autres tissus est retrouvée dans la surrénale, l'action de l'AgT devrait permettre la surexpression de *EZH2*. Ceci est d'autant plus probable que l'AgT agit également sur Rb, un autre acteur intervenant dans la cascade de contrôle de l'expression de EZH2. Conformément à cette hypothèse, l'expression de *EZH2* est fortement augmentée chez les souris AgT, dès les stades précoces de la tumorigenèse (Figure 50). La perte de *p53* est donc associée à la surexpression de *EZH2* dans le cortex surrénalien murin.

Nous avons donc voulu valider cette relation entre p53 et EZH2 dans les tumeurs cortico-surrénaliennes humaines en analysant l'expression de *EZH2* dans les tumeurs (ACS ou CCS) de l'enfant du Sud du Brésil qui sont majoritairement causées par des mutations inactivatrices R337H de *p53* (Wasserman et al., 2012). De manière intéressante, la surexpression de *EZH2* visualisée en Western Blot est très importante dans ces carcinomes cortico-surrénaliens par rapport aux adénomes (Figure 49). Il semble donc que même dans des tumeurs mutées pour *p53*, la surexpression de *EZH2* est associée à la malignité. Bien que nous n'ayons pas à notre disposition de surrénales contrôles permettant de le confirmer, l'expression de *EZH2* est relativement faible dans les ACS pédiatriques mutants pour *P53* par rapport aux CCS ce qui suggère que la perte de *p53* est certes associée avec la surexpression de *EZH2* mais que la forte surexpression de *EZH2* est corrélée avec la malignité.

Reste maintenant à déterminer si la surexpression de EZH2 dans les CCS avec activation de la voie Wnt/ßcaténine est causée par la dérégulation de p53. Chez l'Homme adulte, cette hypothèse paraît peu probable puisque les CCS avec perte de *p53* et activation de la voie Wnt/ßcaténine sont deux groupes essentiellement mutuellement exclusifs (Ragazzon et al., 2010). Ceci suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans la surexpression de EZH2 dans le groupe de tumeurs avec activation de la voie Wnt/ßcaténine. Outre p53, certains miARN dont miR-26a (Sander et al., 2008) et miR-101 (Cao et al., 2010) sont également capables de

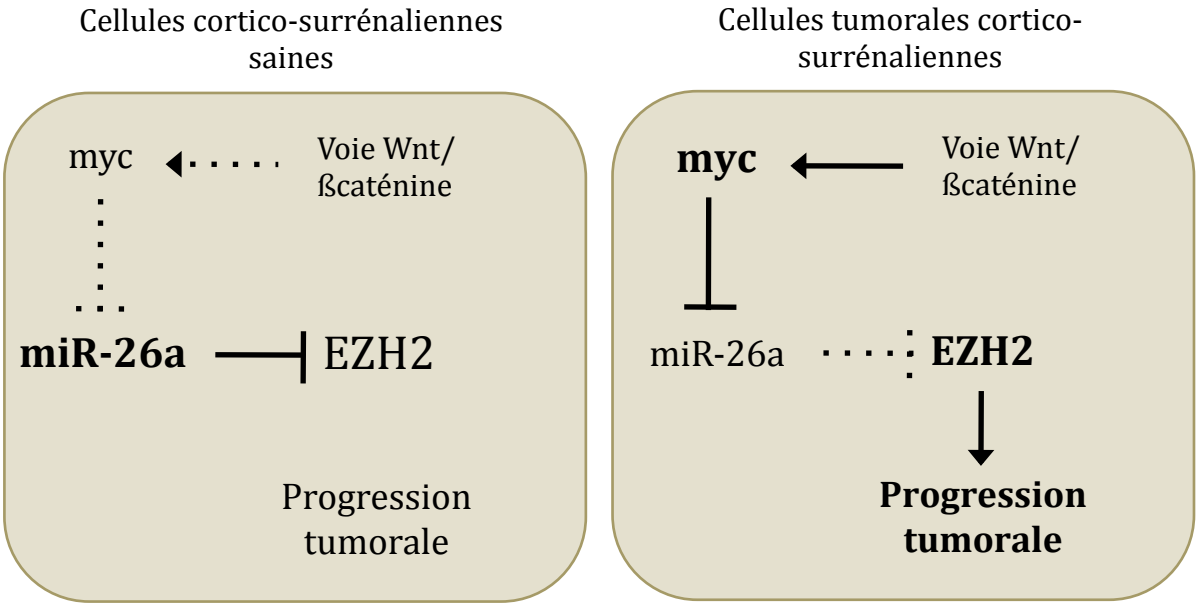


Figure 51 : Modèle hypothétique du mécanisme de surexpression de EZH2 dans les CCS avec activation de la voie Wnt/ ßcaténine

L'augmentation de l'expression de c-myc, un des gènes cibles de la voie Wnt/ßcaténine, réprime l'expression du miR-26a qui inhibe normalement la transcription de EZH2 (Enhancer of Zest 2). Par conséquent, la perte du miR-26a induit la surexpression de EZH2 et favorise la progression tumorale. La taille des polices symbolise la quantité relative des protéines entre les deux types de cellules. Les pointes de flèches représentent une activation alors que les barres représentent une inhibition. L'épaisseur des lignes dépend du degré de contrôle en fonction des situations.

réguler l'expression de *EZH2*. Le miR-26a est d'autant plus intéressant dans le cadre des CCS avec une activation de la voie Wnt/ßcaténine que son expression est inhibée par un des gènes cibles de la ßcaténine, *c-myc* dans des leucémies myéloïde aigüe (Salvatori et al., 2011). Par conséquent, même si l'expression de *c-myc* est diminuée sur l'ensemble des CCS (Liu et al., 1997b), il serait intéressant de déterminer son niveau d'expression dans les CCS avec activation de la voie Wnt/ßcaténine. Si l'expression de c-myc est augmentée dans ce groupe particulier, cela pourrait inhiber l'expression du miR-26a ce qui lèverait la répression exercée sur le transcrit de *EZH2* et induirait par conséquent, sa surexpression (Figure 51).

5) Rôle de EZH2 dans la progression maligne des tumeurs cortico-surrénaliennes

La stimulation de la prolifération cellulaire par EZH2 n'est surement pas sa seule action favorisant la progression maligne. En effet, EZH2 est également capable de stimuler l'activité de la voie Wnt par au moins deux mécanismes. Il est tout d'abord capable de réprimer l'expression d'antagonistes de la voie tels que *SFRP5* et *Axine2* en augmentant la présence de la marque H3K27me3 sur leurs promoteurs (Cheng et al., 2011) ce qui favorise l'activation de la voie Wnt/ßcaténine. *SFRP4* dont l'expression est significativement diminuée dans les ACS et CCS (Berthon et al., 2012) fait également partie des cibles de EZH2 décrites dans des cellules de prostate (Varambally et al., 2002). De plus, EZH2 est capable d'interagir directement avec la ßcaténine et d'induire sa localisation nucléaire dans le cancer mammaire (Li et al., 2009). La surexpression de *EZH2* pourrait donc participer à la mise en place de l'accumulation nucléaire de la ßcaténine retrouvée dans les CCS et qui est associée avec la présence d'une maladie métastatique locale ou avancée (Gaujoux et al., 2011). Toutefois, ces mécanismes ne sont sans doute pas universels. En effet, aucune activation de la voie Wnt/ßcaténine sans mutation de *CTNNB1* n'est retrouvée dans les CCS avec perte de *p53* (Ragazzon et al., 2010). L'action de EZH2 sur la voie Wnt/ßcaténine pourrait donc se limiter aux CCS présentant déjà une activation qu'il pourrait potentialiser.

En conclusion, bien que des preuves expérimentales restent à apporter (voir « perspectives »), l'ensemble de ces données suggère que la surexpression de EZH2 pourrait être impliquée dans la progression tumorale des ACS avec activation de la voie Wnt/ßcaténine mais également dans l'établissement de caractères malins dans les CCS avec perte de *p53*.

PERSPECTIVES

Les tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes et malignes sont associées à une morbidité élevée résultant de l'hypersécrétion des hormones cortico-surrénaliennes, retrouvée chez près de 60% des patients. Au delà des perturbations endocrines, les carcinomes cortico-surrénaliens sont des tumeurs de mauvais pronostic avec 16 à 38% de survie à 5 ans (Allolio and Fassnacht, 2006). Cette agressivité résulte à la fois de la présence de métastases chez de nombreux patients, au moment du diagnostic (30 à 40% des cas) et de l'absence d'approches thérapeutiques, au delà de la résection chirurgicale de la tumeur primaire. Ces difficultés thérapeutiques sont également rencontrées dans le cas des tumeurs bénignes sécrétrices bilatérales, pour lesquelles la pharmacopée actuelle présente un manque d'efficacité et de spécificité. Il est donc nécessaire d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ces tumeurs afin de proposer des approches médicamenteuses efficaces et ciblées.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la physiopathologie du cortex surrénalien. La caractérisation des souris ΔCat qui présentent une activation de la voie de la Wnt/ßcaténine a été le point de départ de mon projet de thèse. Cette analyse a tout d'abord permis de démontrer le rôle oncogénique de la ßcaténine dans le cortex surrénalien. Cependant, elle a également ouvert de nouvelles pistes concernant à la fois la compréhension du rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans la physiologie de la surrénale normale et dans le syndrome de Conn. D'autre part, nous avons découvert que la surexpression de *EZH2* pourrait être impliquée dans la progression maligne des tumeurs cortico-surrénaliennes. Les expériences complémentaires proposées dans ce chapitre permettraient de confirmer les différentes hypothèses pouvant être émises à la suite des résultats obtenus pendant ma thèse.

1) La voie Wnt/ßcaténine et le contrôle de l'homéostasie des cellules progénitrices du cortex surrénalien

Nous avons montré que l'activation constitutive de la ßcaténine dans l'ensemble du cortex surrénalien conduisait à l'accumulation anormale de cellules progénitrices putatives et que cette accumulation semblait associée à une activation de la voie Hedgehog (Article 1). La voie Hegehog étant impliquée dans le recrutement et l'engagement des progéniteurs (King et al., 2009), nous avons émis l'hypothèse que la voie Wnt/ßcaténine était un acteur du renouvellement du cortex surrénalien, situé en amont de Hedgehog. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait tout d'abord nécessaire de démontrer que les cellules de type fibroblastique qui s'accumulent chez les souris ΔCat sont bien des cellules progénitrices. Pour ce faire, étant donné que les anticorps commerciaux ne fonctionnent pas en immunohistochimie, l'expression des marqueurs *Shh*, *Pod1* et *Gli1* sera analysée par hybridation *in situ*.

Nous avons également mis en place une collaboration avec l'équipe du Dr. Laufer à New York qui a publié l'article démontrant le rôle essentiel de la voie Hedgehog dans le cortex surrénalien (King et al., 2009) et qui possède de nombreux modèles de souris transgéniques permettant d'analyser l'activité et la fonction de cette voie de signalisation. Grâce à cette collaboration, nous avons croisé les souris ΔCat avec différents modèles de souris invalidées pour des membres de la voie Hedegehog ou rapporteurs de l'activité de cette voie.

- le croisement des souris ΔCat avec des souris autorisant le suivi de l'expression de *Gli1* (Gli-LacZ) permettra d'analyser l'expression de *Gli1* chez les souris ΔCat afin de confirmer les résultats obtenus en hybridation *in situ* et de déterminer si les cellules fibroblastiques qui s'accumulent chez les souris ΔCat sont bien la sous population de cellules exprimant la voie Hh. Ces expériences permettront également d'évaluer la contribution des cellules Gli1 (+) à la formation de la masse tumorale chez ces souris.
- Nous supposons que l'accumulation des cellules fibroblastiques est causée par l'augmentation de leur prolifération résultant de la surexpression de Shh chez les souris ΔCat. Afin de confirmer cette hypothèse, des souris portant une invalidation inductible du gène codant pour *Shh* (système LoxP) ont été croisées avec les souris ΔCat. Cette combinaison génétique causera donc à la fois une activation de la voie Wnt/ßcaténine et une invalidation de Shh dans le cortex surrénalien (Akr1b7cre ; $Shh^{Co/-}$). Si notre hypothèse se vérifie, la perte de *Shh* devrait empêcher l'accumulation des cellules d'aspect fibroblastique chez les souris ΔCat ; $Shh^{Co/-}$. Il faudra alors évaluer l'effet de cette invalidation sur l'établissement et la progression du phénotype tumoral.

Cette collaboration initiée pendant ma thèse a déjà permis l'obtention de souris ΔCat ; $Shh^{Co/-}$ qui viennent d'être sacrifiées et doivent maintenant être analysées. Cette étude permettra une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le renouvellement du cortex et confirmera peut être le rôle de la voie Wnt/ßcaténine en amont de la voie Hh dans ce processus. Cependant, au delà de cet effet physiologique, si l'augmentation de l'expression de Shh est bien responsable de l'hyperplasie de ces cellules de type fibroblastiques chez les souris ΔCat, cela signifierait que la voie Hedgehog pourrait avoir un rôle à jouer dans le développement tumoral du cortex surrénalien. Cette hypothèse est particulièrement pertinente dans le contexte des APA, Shh étant surexprimé dans ces tumeurs (Boulkroun et al., 2011), dont nous venons de démontrer que le développement dépend de la voie Wnt (Article 2). A la lumière de nos résultats, il serait également intéressant d'évaluer l'état d'activation de la voie Hedgehog dans les tumeurs malignes de la cortico-surrénale. Ces données pourraient fournir une nouvelle cible thérapeutique pour laquelle des inhibiteurs sont validés en clinique (Raju and Pham, 2012).

2) Rôle de la ßcaténine dans la mise en place de la zonation du cortex surrénalien et la différenciation glomérulée

Comme nous l'avons vu suite au deuxième article, la voie Wnt/ßcaténine semble impliquée dans l'établissement de la zonation normale du cortex surrénalien mais des preuves restent à fournir pour le démontrer. La voie Wnt/ßcaténine est activée sous la capsule conjonctive dans les cellules stéroidogénes Sf1 (+) qui expriment ou non CYP11B2 (Article 1). A la lumière de nos résultats et des données bibliographiques, nous émettons l'hypothèse que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine dans les cellules Cyp11b2 (-) participe au renouvellement cortical en induisant l'expression de *Shh*. C'est cette fonction de la voie Wnt/ßcaténine qui pourrait être impliquée dans les défauts de renouvellement cortical chez les souris invalidées pour la ßcaténine dans l'ensemble des cellules stéroïdogènes avec le driver Sf-1 à faible activité de recombinaison (Kim et al., 2008). Cette hypothèse pourrait être démontrée en invalidant spécifiquement la ßcaténine dans les cellules Sf-1 (+) Cyp11b2 (-) avec une recombinase Cre sous le contrôle des régions régulatrices de Shh, qui est exprimé dans cette population cellulaire. D'autre part, nous proposons de déterminer le rôle de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine spécifiquement dans les cellules CYP11B2 positives. Pour ce faire, il serait nécessaire de croiser les souris *Ctnnb1*^{tm2kem} qui présentent des sites LoxP de part et d'autre de l'exon 2 et 6 de *Ctnnb1* avec des souris exprimant la recombinase Cre sous le contrôle des régions régulatrices de l'aldostérone synthase, Cyp11b2. Cette invalidation conditionnelle devrait permettre de maintenir le renouvellement du cortex surrénalien et donc d'évaluer les conséquences de l'inactivation de la ßcaténine sur la zonation du cortex et sur la différenciation de la zone glomérulée. Les souris Cyp11b2:Cre ne sont pas encore disponibles mais ont récemment été présentées au congrès Adrenal Cortex 2012 par le Dr Breault (Harvard Stem Cell Institute). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la perte de la ßcaténine dans les cellules CYP11B2 (+) devrait induire un phénotype proche des souris invalidées pour *Wnt4* (Heikkila, 2002) avec une régression de la zone glomérulée associée à une diminution des taux d'aldostérone plasmatique. Elle ne devrait par contre pas induire la létalité périnatale associée à l'invalidation totale de *Wnt4*.

Cette étude permettra donc d'une part, de valider le rôle de la voie Wnt/ßcaténine dans le contrôle de la zonation du cortex au travers de son rôle dans la régulation de la différenciation de la zone glomérulée. De plus, la caractérisation de ces souris transgéniques permettra de déterminer s'il existe une interrelation entre la différenciation et le renouvellement du cortex. En effet, nous verrons si la perte de la ßcaténine dans les cellules CYP11B2 (+) modifie la capacité des cellules ßcaténine (+) CYP11B2 (-) à induire la prolifération des cellules progénitrices.

3) Rôle de SFRP2 dans le développement d'adénomes producteurs d'aldostérone

Les données présentées dans le deuxième article montrent clairement le rôle de l'activation anormale de la ßcaténine dans le développement des APA. Toutefois, nous n'avons pas encore pu identifier le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans l'activation de la voie Wnt. Des données bibliographiques suggèrent que les SFRPs dont la diminution d'expression est associée au développement de tumeurs dans de nombreux tissus (Huang et al., 2007; Ko et al., 2002) pourraient être impliqués dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. En effet, la sensibilisation de certaines lignées de souris au développement de tumeurs surrénaliennes suite à la gonadectomie est liée au locus de *sfrp1* dont l'expression est diminuée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain adjacent (Bernichtein et al., 2008). De plus, chez l'Homme, des analyses de puces transcriptionnelles démontrent une diminution de l'expression de *SFRP4* à la fois dans les adénomes et les carcinomes cortico-surrénaliens (Giordano et al., 2003). La diminution d'expression de *SFRP2* observée dans les APA par rapport aux NAPA pourrait donc être responsable de l'activation de la voie Wnt/ßcaténine et par conséquent du développement des APA. Afin de confirmer cette hypothèse, nous proposons de répondre à deux grandes questions :

- Est ce que la diminution d'expression de *SFRP2* est capable à elle seule d'induire le développement d'adénomes producteurs d'aldostérone ?

- Pourquoi l'expression de *SFRP2* est diminuée spécifiquement dans les APA ?

A) Lien entre la perte d'expression de SFRP2 et l'apparition d'un HP

Afin d'évaluer la capacité de Sfrp2 à contrôler l'activation de la ßcaténine et en cascade la production d'aldostérone, nous avons obtenu des souris invalidées pour *Sfrp2* (Morello et al., 2008), grâce à une collaboration avec le Dr. Plateroti (IGFL, Lyon). Ces souris, comme l'autre modèle disponible d'invalidation totale de *Sfrp2* (*sfrp2-/-*) (Ikegawa et al., 2008) présentent des défauts de formation des doigts (raccourcissement ou fusion de plusieurs doigts), mais leur capacité à produire de l'aldostérone n'a jamais été évaluée. Nous avons observé que 7 des 13 femelles *sfrp2-/-* présentent une augmentation significative du taux d'aldostérone par rapport aux souris contrôles. Ceci démontre donc que les souris *sfrp2-/-* peuvent acquérir la capacité à produire de l'aldostérone indépendamment de ses sécrétagogues naturels. L'HP observé chez la moitié des souris *sfrp2-/-* suggère donc que *sfrp2* pourrait présenter la même fonction dans le cortex surrénalien humain et murin et que la diminution de son expression pourrait être causale dans le contexte des APA. Un autre argument en faveur de cette hypothèse est que le profil de méthylation des régions régulatrices de *SFRP2* est spécifique des APA (voir plus loin). La diminution d'expression de *SFRP2* joue donc un rôle dans l'activation de la voie Wnt et la mise en place de l'HP.

Il est dès lors possible qu'il existe chez les souris *sfrp2-/-* ne présentant pas un HP, un phénomène de compensation par les autres membres de la famille des Sfrp tels que Sfrp1, qui est naturellement exprimé dans l'ensemble du cortex surrénalien murin (Bernichtein et al., 2008). La perte de *sfrp2* pourrait donc induire une augmentation de l'expression de *sfrp1* qui empêcherait le développement d'APA, en inhibant l'activation de la voie Wnt/ßcaténine. Cette hypothèse est confortée par l'absence de développement tumoral chez les souris invalidées pour une seule isoforme de la famille des sfrp, *sfrp1-/-*, *sfrp2-/-* ou *sfrp4-/-* malgré leur rôle oncogénique connu (Ikegawa et al., 2008; Morello et al., 2008; Trevant et al., 2008; Christov et al., 2011). Nous proposons donc d'évaluer ce phénomène de compensation en analysant l'expression des autres membres de la famille des *sfrp* ainsi que l'état de la voie Wnt/ßcaténine par RTqPCR dans les surrénales des souris *sfrp2-/-* qui présentent ou non le phénotype d'HP. Cela nous permettra de déterminer si l'apparition du phénotype d'HP s'accompagne bien d'une absence de compensation permettant une activation de la voie Wnt/ßcaténine. Toutefois, même dans le groupe présentant des phénomènes compensatoires, la perte de *sfrp2* pourrait sensibiliser les cellules cortico-surrénaliennes à une stimulation physiologique de la sécrétion d'aldostérone. Afin de le vérifier, nous traiterons des souris *sfrp2-/-* avec une supplémentation en potassium ou un régime hyposodé qui induisent la sécrétion d'aldostérone chez des souris contrôles. Si les souris *sfrp2-/-* présentent une meilleure réponse à ces traitements que les souris contrôles, cela confirmera que même en présence de compensation, la perte d'expression de *sfrp2* sensibilise les cellules cortico-surrénaliennes à une sécrétion excessive d'aldostérone.

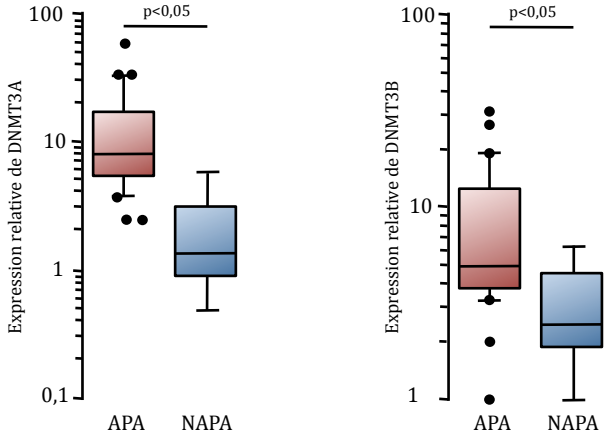
En conclusion, nous avons d'ores et déjà démontré qu'il existe un lien direct entre la perte de *sfrp2*, l'activation de la voie Wnt/ßcaténine et l'apparition d'un HP. Toutefois, les analyses complémentaires proposées devraient déterminer si dans un premier temps, la compensation de la perte de *sfrp2* peut limiter le développement d'un hyperaldostéronisme en conditions basales qui serait toutefois, déclenché par une stimulation excessive.

B) Causes de la diminution d'expression de SFRP2 dans les APA

A partir des données bibliographiques, deux hypothèses peuvent expliquer la perte d'expression de *SFRP2* : soit une hyperméthylation de son promoteur, soit la surexpression de miARN ciblant sa dégradation ou bloquant sa traduction.

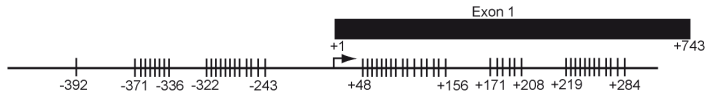
a) <u>Hyperméthylation de son promoteur</u>

L'hyperméthylation du promoteur de *SFRP2* est associée avec une activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine dans des cancers tels que celui du colon (Suzuki et al., 2004). Cette méthylation dite *de novo* des îlots CpG du promoteur qui inhibe la transcription du gène est mise

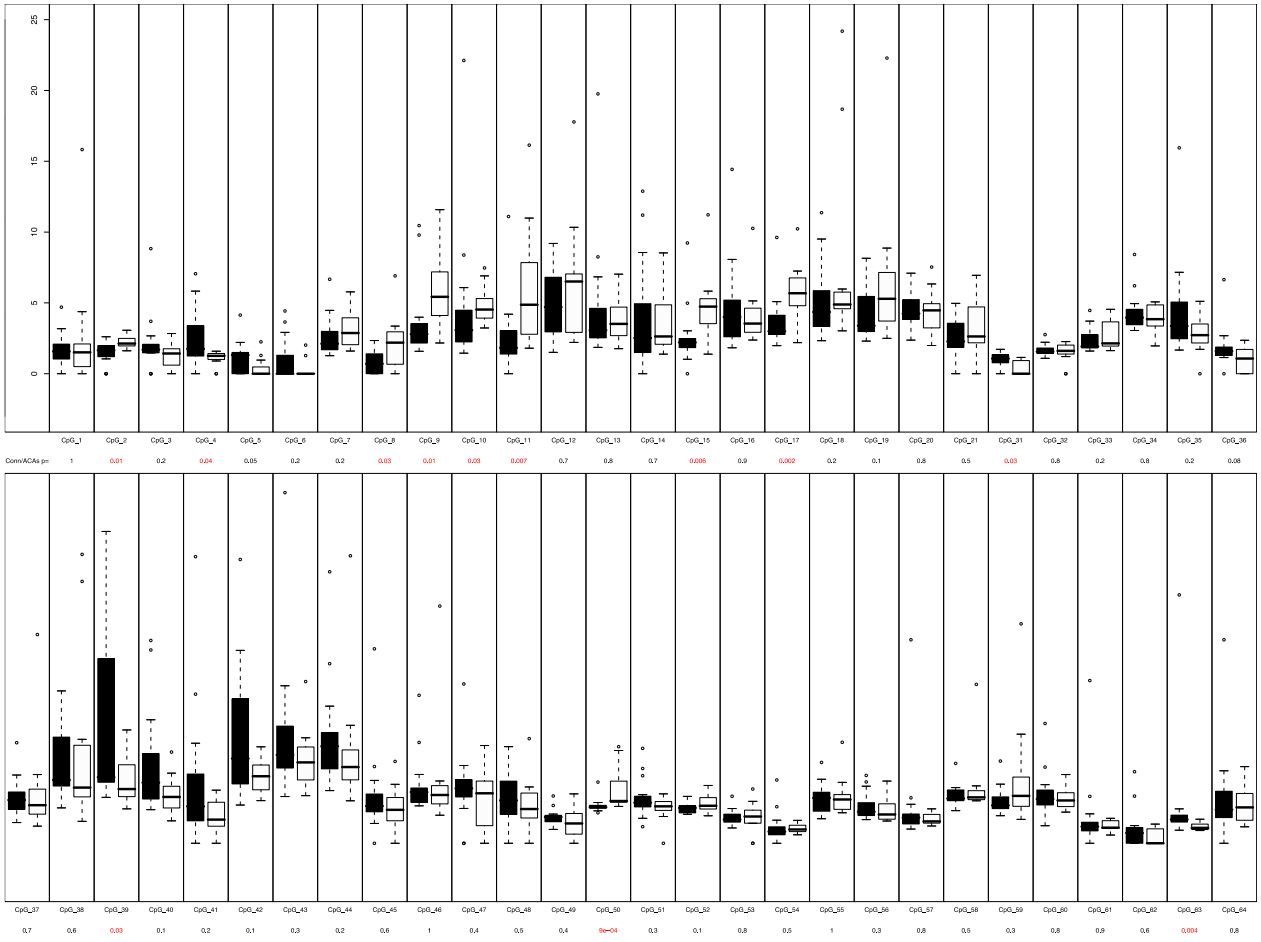


<u>Figure 52</u> : Augmentation de l'expression de DNMT3A et DNMT3B dans les APA versus NAPA.
Les niveaux d'expression de DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) et DNMT3B (DNA methyltransferase 3B) ont été analysés en RTqPCR par la technologie Taqman sur des ADNc d'adénomes producteurs d'aldostérone (APA) et d'adénomes non producteurs d'aldostérone (NAPA). L'expression des DNMT a été rapportée à l'expression d'un gène de ménage codant pour PPIB. La médiane relative de l'expression de 35 APA et 14 NAPA a été représentée en boite à moustaches, sur un axe des ordonnées en log10. Les statistiques de significativité ont été calculées par le test de Student.

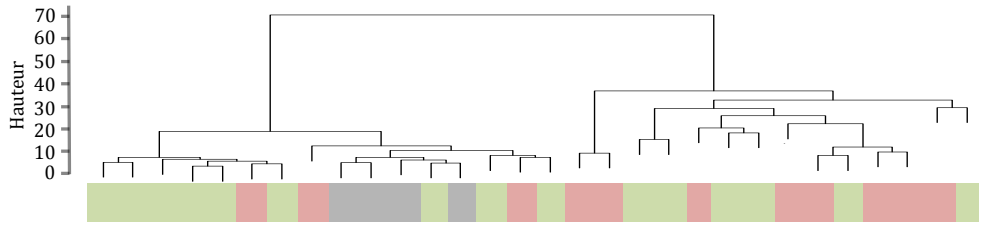
A)



B)



C)



Test de Fischer
p=0,057

<u>Figure 53</u> : Analyse de méthylation du promoteur de SFRP2

A) Représentation schématique de la localisation des CpG analysés sur le promoteur de SFRP2. B) Taux de méthylation (représentant le pourcentage de séquences méthylées, par rapport aux séquences totales) obtenus dans les tumeurs productrices d'aldostérone (APA, blanc) et les tumeurs non productrices d'aldostérone (NAPA, noir), pour chacun des CpG analysés. L'analyse statistique des différences entre APA et NAPA a été calculée par le test de Wilcoxon. Elle est indiquée en dessous de chaque colonne. C) Classification des tumeurs par clustering non supervisé à partir des taux de méthylation obtenus sur l'ensemble des CpG analysés du promoteur de SFRP2. Les APA (rouge) sont partiellement regroupés par rapport aux NAPA (vert) et aux surrénales normales (gris).

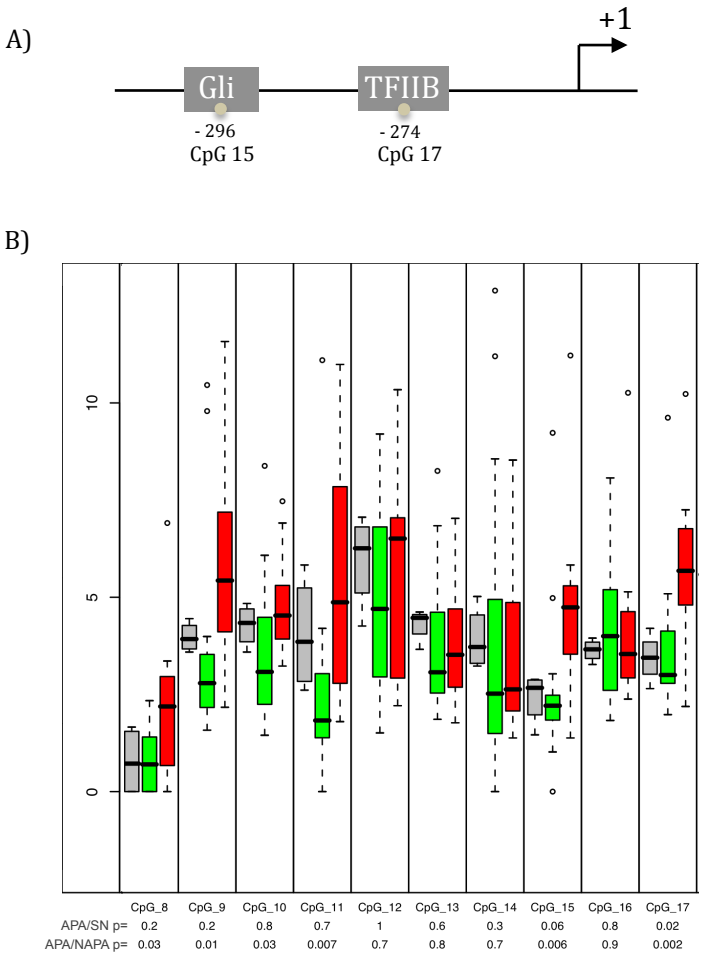
en place par les DNA méthyltransférase DNMT3A et DNMT3B. L'analyse de leur expression dans les APA a démontré qu'elles sont toutes les deux surexprimées dans ces tumeurs (Figure 52). Dans un modèle de souris présentant une mutation d'APC (APC^{min}) qui surexpriment *dnmt3a* ou *dnmt3b*, la surexpression de *dnmt3b* induit la méthylation du promoteur des *sfrp* dont *sfrp2*, ce qui accélère le processus tumoral (Linhart et al., 2007). Ces données suggèrent donc que la surexpression de *DNMT3B* peut mener à l'hyperméthylation du promoteur de *SFRP2*. Afin de déterminer si c'est le cas dans les APA, nous avons réalisé une analyse de la méthylation des régions régulatrices de *Sfrp2* par conversion au bisulfite suivie d'un pyroséquençage dans les APA et NAPA. De manière inattendue, nous n'avons pas constaté d'augmentation globale de la méthylation du promoteur de *SFRP2* (Figure 53), suggérant que la perte d'expression de *SFRP2* dans les APA n'est pas causée par l'hyperméthylation de son promoteur. Cependant, il est intéressant de noter que même si les APA ne présentent pas d'hyperméthylation globale, le profil de méthylation du promoteur de *SFRP2* permet le regroupement partiel des APA (p=0,057) lors d'une analyse en « clustering non supervisé » (Figure 53). Il semble donc que le profil de méthylation du promoteur de *SFRP2* soit spécifique des APA. De plus, nous avons constaté que l'augmentation de la méthylation du promoteur de *SFRP2* est concentrée au niveau d'un site putatif de liaison du facteur de transcription Gli1 et d'un site potentiel d'initiation alternative de la transcription reposant sur XCPE1 (Figure 54) (Juven-Gershon et al., 2008), prédits *in silico*. Nous allons donc décrire les analyses complémentaires nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer l'implication possible de ces sites dans le contrôle de la transcription de SFRP2 chez l'Homme.

(1) <u>Existence d'un transcrit alternatif de SFRP2 dans la cortico-surrénale ?</u>

L'existence du transcrit alternatif prédit *in silico* (site XCPE1) sera initialement évaluée par PCR sur des ADNc provenant de surrénales normales grâce à un couple d'amorces spécifiques de ce transcrit putatif. S'il est présent, il sera nécessaire d'identifier le site d'initiation de la transcription et de déterminer s'il correspond à celui prédit *in sillico*. Pour cela, une expérience de 5' RACE-PCR sera conduite sur les mêmes échantillons. Celle-ci sera complétée par des expériences de ChIP avec un anticorps dirigé contre la ARN Polymérase de type II, grâce à des amorces flanquant le site putatif d'initiation.

(2) <u>Rôle de la méthylation dans le contrôle de l'initiation de transcription</u>

Afin de montrer le rôle de la méthylation de la région initiatrice dans le contrôle de l'expression de *SFRP2*, nous comparerons le niveau d'accumulation du transcrit alternatif, dans des surrénales saines et des APA. Cette approche sera complétée par une analyse de l'effet de



<u>Figure 54</u> : Analyse de méthylation du promoteur de SFRP2 entre les sites CpG 8 et 17

A) Représentation schématique de la localisation des CpG analysés et des sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription (Gli, XCPE1) prédits *in silico* sur le promoteur de SFRP2. B) Taux de méthylation dans les tumeurs productrices d'aldostérone (APA, rouge), les tumeurs non productrices d'aldostérone (NAPA, vert) et les surrénales normales (SN, gris) pour chacun des CpG présents autour des sites putatifs de liaison pour Gli et XCPE1. L'analyse statistique des différences entre APA, NAPA et SN a été calculée par le test de Wilcoxon. Elle est indiquée en dessous de chaque colonne.

mutations du site d'initiation de transcription sur l'activité du promoteur, placé en amont d'un gène rapporteur luciférase.

La méthylation s'étend aussi au niveau d'un site putatif de fixation du facteur de transcription Gli1, médiateur trancriptionnel de la signalisation Hedgehog (Figure 54). Cette voie de signalisation est capable d'inhiber la voie Wnt/ßcaténine en stimulant l'expression d'un autre membre de la famille des SFRP, *SFRP1* (He et al., 2006). Par ailleurs, des analyses *in vitro* ont démontré que la voie Hedgehog contrôle également l'expression de *Sfrp2* par l'intermédiaire du facteur Gli1 (Milla et al., 2012). L'ensemble de ces données suggère donc que la voie Hedgehog peut contrôler l'expression de SFRP2 en conditions non pathologiques, afin d'inhiber la voie Wnt/ßcaténine dans les cellules environnantes. Toutefois, dans le cadre du syndrome de Conn, la méthylation du site de fixation de Gli1 sur le promoteur de *SFRP2* préviendrait son expression induisant une activation de la voie Wnt/ßcaténine, même en présence d'une activation de la voie Hedgehog, décrite dans ce contexte (Boulkroun et al., 2011).

Cette analyse nous permettra de comprendre si la méthylation d'une région spécifique du promoteur de *SFRP2* peut entrainer l'extinction de son expression dans le syndrome de Conn. Par ailleurs elle nous permettra peut être de démontrer pour la première fois que la fixation du facteur Gli1, médiateur essentiel de l'activité de la voie Hedgehog est sensible à la méthylation. Ces données s'étendront alors largement au-delà du syndrome de Conn, les voies Wnt/ßcaténine et Hedgehog étant essentielles au développement et au maintien de l'homéostasie de nombreux tissus.

D'autre part, SFRP2 n'a jamais été localisé dans la surrénale, son expression pourrait donc être analysée en immunohistochimie ou en hybridation *in situ* sur des coupes de surrénales humaines saines et issues d'APA. En effet, si l'hypothèse d'un contrôle par la voie Hedgehog se confirme, *SFRP2* devrait être exprimé dans les cellules progénitrices sous-capsulaires qui répondent à la signalisation Hedgehog dans le cortex surrénalien (King et al., 2009). Cela pourrait donc expliquer les faibles taux de méthylation observés, même au niveau du site putatif de transcription et de fixation à Gli1. En effet, si l'hyperméthylation du promoteur de *SFRP2* n'est présente que dans des cellules qui l'expriment normalement et qui représentent une minorité des cellules tumorales, notre analyse globale en pyroséquençage ne permet pas de clairement la mettre en évidence. Il serait donc intéressant d'effectuer une analyse de méthylation par conversion au bisulfite, suivie du clonage et du séquençage des produits de PCR. Cette analyse permettrait de démontrer l'existence de cellules dans lesquelles le promoteur de *SFRP2* est fortement méthylé et d'évaluer leur représentation dans la masse tumorale totale.

Micro ARN	mi Randa	miRDB	miR Walk	Targets can	Total
hsa-miR-1265	1	1	1	1	4
hsa-miR-569	1	1	1	1	4
hsa-miR-629	1	1	1	1	4
hsa-miR-548o	1	1	1	1	4
hsa-miR-606	1	1	1	1	4
hsa-miR-1323	1	1	1	1	4
hsa-miR-510	1	1	1	1	4
hsa-miR-218	1	1	1	1	4
hsa-miR-194	1	1	1	1	4
hsa-miR-495	1	1	1	1	4
hsa-miR-1203	1	1	1	1	4
hsa-miR-381	1	1	1	1	4
hsa-miR-300	1	1	1	1	4
hsa-miR-450b-5p	1	1	1	1	4
hsa-miR-548k	1	1	1	1	4
hsa-miR-561	1	1	1	1	4
hsa-miR-219-2-3p	1	1	1	1	4
hsa-miR-433	1	1	1	1	4
hsa-miR-548m	1	1	1	1	4
hsa-miR-206	1	0	1	1	3
hsa-miR-122	1	0	1	1	3
hsa-miR-548a-3p	1	0	1	1	3
hsa-miR-1	1	0	1	1	3
hsa-miR-19a	1	0	1	1	3
hsa-miR-758	1	0	1	1	3
hsa-miR-483-3p	1	0	1	1	3
hsa-miR-920	1	0	1	1	3
hsa-miR-218	1	0	1	1	3
hsa-miR-570	1	0	1	1	3
hsa-miR-128	1	0	1	1	3
hsa-miR-128	1	0	1	1	3
hsa-miR-636	1	0	1	1	3
hsa-miR-19b	1	0	1	1	3
hsa-miR-493	1	0	1	1	3
hsa-miR-940	1	0	1	1	3
hsa-miR-1272	1	0	1	1	3
hsa-miR-574-5p	1	0	1	1	3
hsa-miR-132	1	0	1	1	3
hsa-miR-610	1	0	1	1	3
hsa-miR-646	1	0	1	1	3
hsa-miR-19b	1	0	1	1	3
hsa-miR-1283	1	0	1	1	3
hsa-miR-1283	1	0	1	1	3
hsa-miR-576-5p	1	0	1	1	3
hsa-miR-613	1	0	1	1	3
hsa-miR-648	1	0	1	1	3
hsa-miR-20a	1	0	1	1	3
hsa-miR-516b	1	0	1	1	3
hsa-miR-1207-3p	1	0	1	1	3
hsa-miR-559	1	0	1	1	3
hsa-miR-1292	1	0	1	1	3
hsa-miR-106b	1	0	1	1	3
hsa-miR-340	1	0	1	1	3
hsa-miR-22	1	0	1	1	3
hsa-miR-516b	1	0	1	1	3
hsa-miR-224	1	0	1	1	3
hsa-miR-664	1	0	1	1	3
hsa-miR-582-5p	1	0	1	1	3
hsa-miR-194	1	0	1	1	3
hsa-miR-622	1	0	1	1	3
hsa-miR-654-5p	1	0	1	1	3
hsa-miR-345	1	0	1	1	3

Micro ARN	mi Randa	miRDB	miR Walk	Targets can	Total
hsa-miR-888	1	0	1	1	3
hsa-miR-522	1	0	1	1	3
hsa-miR-1	1	0	1	1	3
hsa-miR-548a-3p	1	0	1	1	3
hsa-miR-625	1	0	1	1	3
hsa-miR-549	1	0	1	1	3
hsa-miR-27a	1	0	1	1	3
hsa-miR-541	1	0	1	1	3
hsa-miR-499-5p	1	0	1	1	3
hsa-miR-212	1	0	1	1	3
hsa-miR-27b	1	0	1	1	3
hsa-miR-548a-3p	1	0	1	1	3
hsa-miR-627	1	0	1	1	3
hsa-miR-421	1	0	1	1	3

Figure 55 : Listes de micro ARN prédits *in silico* pour réguler l'expression de SFRP2.

Les miARN humains prédits pour cibler le 3'UTR de SFRP2 par au moins 3 des 4 outils bioinformatiques de prédiction testés, sont présentés ici. Le nom du miARN est indiqué dans la première colonne, suivi du résultat obtenu pour chacun des 4 logiciels utilisés : miRanda, miRDB, miRWalk et Targetscan qui sont tous basés sur des algorithmes différents. Le 1 (surligné en orange) représente une action prédite du miARN sur l'ARNm de SFRP2 et le 0 (surligné en rose), une absence d'effet prédit. Le total correspond à la somme des résultats obtenus pour chacun des tests d'un miARN donné.

Au delà de Sfrp2, la surexpression de *DNMT3A* et *DNMT3B* dans les APA par rapport aux NAPA suggère qu'il serait intéressant d'effectuer une analyse globale de la méthylation de l'ADN dans les tumeurs productrices d'aldostérone, afin d'identifier l'ensembles des gènes dérégulés par ces mécanismes. Une récente analyse focalisée sur les CCS, mais dans laquelle 16 APA étaient présents, a mis en évidence un profil global de méthylation spécifique des tumeurs productrices d'aldostérone (Rechache et al., 2012). Malheureusement, les données géniques individuelles ne sont pas disponibles.

b) Régulation de SFRP2 par des miARN

L'hyperméthylation de son promoteur n'est pas la seule manière de diminuer l'expression de *SFRP2*. En effet, des miARN tels que miR-29 sont capables de réguler négativement l'expression de *SFRP2 in vitro* (Kapinas et al., 2010). L'analyse *in silico* prédit que plusieurs miARN ont potentiellement la capacité de contrôler l'expression de *Sfrp2* (Figure 55). Il serait donc intéressant d'analyser l'expression de ces miARN dans les APA par rapport aux NAPA. En fonction des résultats obtenus, nous pourrons valider leur capacité à contrôler l'expression de *SFRP2 in vitro*. Pour ce faire, nous disposons d'un vecteur dans lequel l'extrémité 3'UTR de SFRP2 a été clonée en amont d'un rapporteur luciférase (Kapinas et al., 2010). Ce vecteur pourra être transfecté dans des cellules type HEK avec le miARN concerné. La mesure de l'activité luciférase permettra alors de déterminer si la co-transfection avec le miARN inhibe l'expression de *SFRP2*. Ces analyses permettront peut-être de démontrer l'implication de miARN au travers de l'expression de *SFRP2*, sur l'activité de la voie Wnt et l'établissement d'un hyperaldostéronisme primaire.

4) Mécanisme d'action de EZH2 dans le cortex surrénalien et conséquences de la surexpression de EZH2 *in vivo*

A) Identification des cibles de EZH2 dans les cellules cortico-surrénaliennes

Comme nous l'avons vu suite au troisième article, les expériences de knockdown de EZH2 dans les cellules H295R ont permis de démontrer que EZH2 régule positivement le cycle cellulaire dans ces cellules, ce qui est en accord avec son rôle décrit dans la littérature. Toutefois, il est intéressant de noter qu'alors que nous observons ici un blocage en phase G0/G1, la perte de EZH2 dans d'autres modèles cellulaires tels que des cellules de cancers de prostate induit un arrêt en G2/M (Varambally et al., 2002). Ceci signifie donc que le mécanisme d'action de EZH2 sur le contrôle de la prolifération cellulaire varie en fonction des modèles cellulaires et donc des tissus. Il serait donc intéressant de déterminer quels sont les acteurs impliqués dans le blocage en phase G0/G1 et plus généralement dans l'action de EZH2 dans les cellules cortico-surrénaliennes.

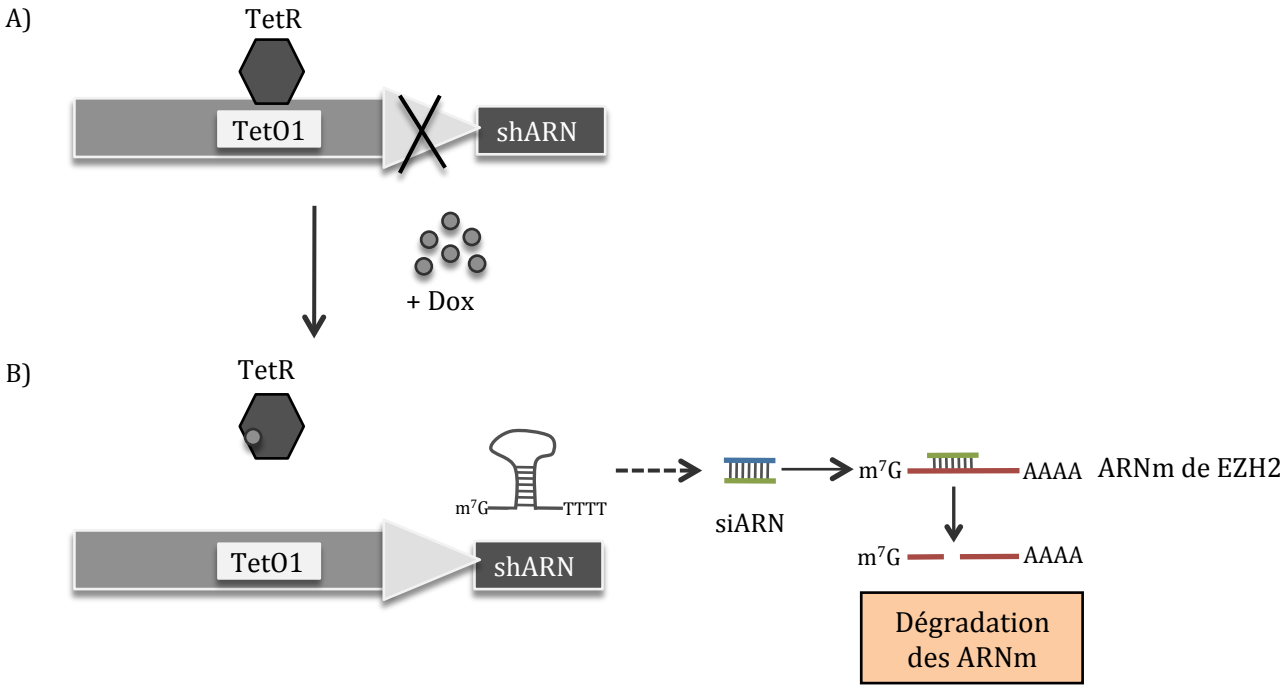


Figure 56 : Construction permettant l'expression du shEZH2 sous le contrôle de la doxycycline

A) En absence de doxycycline (Dox), le répresseur Tet (TetR) se lie au site TetO1 présent dans le promoteur et inhibe l'expression du shARN.

B) La doxycycline ajoutée dans le milieu de culture se lie au niveau du répresseur TetR, induisant la levée de répression de l'expression du shARN qui après processing, donnera des siARN. La flèche en pointillée représente plusieurs étapes qui n'ont pas été détaillées ici. Alors que la partie sens (trait bleu) du siARN est dégradée, la partie anti-sens (trait vert) est dirigée vers la séquence complémentaire du ARNm de EZH2, auquel il se liera afin d'induire sa dégradation.

Nous avons généré des clones de cellules H295R stablement transfectées avec un vecteur exprimant un shARN dirigé contre EZH2 et dont l'expression est inductible à la doxycycline (Figure 56). Ces clones stables seront utilisés afin de déterminer les cibles de EZH2 par des approches sans a priori. En effet, nous identifierons les transcrits dont l'expression est modifiée suite au traitement à la doxycycline par une analyse différentielle sur micro-arrays. Parallèlement, nous chercherons à déterminer quelles sont les régions ciblées par la marque H3K27me3 et EZH2 grâce au ChIP sequencing. Ces analyses permettront à la fois de déterminer les acteurs en aval de EZH2 et de pouvoir identifier des cibles pertinentes pour la clinique.

B) Rôle de EZH2 dans le contrôle de croissance tumorale in vivo

EZH2 semble un bon candidat pour être impliqué dans la progression maligne. En effet, il est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes et pourrait donc participer au contrôle de la croissance tumorale. Afin de le vérifier *in vivo*, nous réaliserons des xénogreffes des clones stables de cellules H295R en absence ou en présence d'un traitement à la doxycyline. Nous suivrons ensuite la progression tumorale pour déterminer si dans des cellules cortico-surrénaliennes, comme dans les cellules du sein ou de la prostate (Chang and Hung, 2012), la diminution d'expression de *EZH2* induit un ralentissement de la croissance tumorale. Cependant, les cellules H295R ont une prolifération relativement faible. Compte-tenu de l'effet essentiel que semble avoir EZH2 sur leur prolifération *in vitro* les clones stables risquent donc d'avoir des difficultés à proliférer, ce qui peut empêcher la prise de greffes sur les souris nudes.

Une solution alternative pour déterminer le rôle de EZH2 dans le contrôle de la croissance tumorale est l'utilisation du 3-Deazaneplanocin A (DZNeP). Le DZNeP rompt le métabolisme de la méthionine au travers de sa capacité à inhiber la S-adenosylhomocysteine hydrolase ce qui résulte en l'inhibition des méthyltransferases. Son action n'est donc pas spécifique de EZH2 et bien qu'il inhibe, comme les siARN EZH2, la présence de la marque H3K27me3 (l'activité de EZH2), les gènes réexprimés dans ces deux conditions sont différents (Chase and Cross, 2011). Ces résultats démontrent donc que l'action du DZNeP est différente de celle des siARN dirigés contre EZH2 mais il est tout aussi capable de réduire la prolifération de lignées de cancers de prostate et de sein (Tan et al., 2007). Cependant, à ma connaissance, le DZNeP n'a encore jamais été testé dans un modèle de souris transgénique. Nous proposons donc d'évaluer sa capacité à bloquer la transition maligne en traitant des souris ΔCat à des stades tardifs de leur pathologie surrénalienne. Toutefois, un problème de taille avec ces souris est que la surexpression de *EZH2* n'apparaît qu'au stade de carcinomes, ce qui représente environ 30% des souris ΔCat de 18 mois. Vu cette faible pénétrance, il sera toujours difficile de déterminer avec précision l'efficacité du traitement. Nous pourrons donc utiliser les souris AgT développées

au laboratoire grâce aux régions régulatrices d'*Akr1b7* qui permettent la surexpression de l'AgT de SV40 dans le cortex. Ces souris présentent très tôt une surexpression de EZH2 et une évolution maligne des tumeurs surrénaliennes au-delà de 8 mois. Si le DZNeP a un effet bénéfique dans la régression tumorale ou au moins dans l'inhibition de la progression maligne, cela confirmera l'implication de EZH2 dans ces mécanismes ce qui fera de lui une cible thérapeutique potentielle dans les CCS humains. Toutefois, en cas d'effets secondaires importants du DZNeP, il est intéressant de noter que deux nouveaux inhibiteurs de EZH2 viennent d'être décrits : le GSK126 (McCabe et al., 2012) et le EPZ005687 (Knutson et al., 2012) qui pourraient être une alternative thérapeutique intéressante.

5) Implications des résultats obtenus au cours de ma thèse, pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques potentielles dans les tumeurs cortico-surrénaliennes

Les données obtenues au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence le pouvoir oncogénique de la voie Wnt/ßcaténine dans le cortex surrénalien, grâce à la caractérisation des souris ΔCat. L'utilisation d'inhibiteurs de la ßcaténine pourrait donc constituer une alternative thérapeutique intéressante dans le contexte des CCS. Cette voie de signalisation étant impliquée dans l'étiologie d'une large variété de tumeurs, le développement d'inhibiteurs spécifiques de la voie WNT est d'un intérêt majeur pour le traitement d'un large spectre de néoplasies (Kirschner, 2012). Le criblage d'inhibiteurs a mis en évidence trois niveaux d'actions majeurs : les inhibiteurs qui modulent l'interaction ligand/récepteur, les inhibiteurs de la signalisation cytosolique (favorisant la dégradation de la ßcaténine) ou de la signalisation nucléaire (Curtin and Lorenzi, 2010). Dans le cadre des TCS mutantes pour la ßcaténine, la classe d'inhibiteurs qui pourrait être utilisée, correspondrait plutôt aux molécules ciblant l'activité nucléaire de la ßcaténine, telles que le PKF115-584 (Lepourcelet et al., 2004). Conformément à cette hypothèse, le PKF115-584 est capable de diminuer la prolifération des cellules cortico-surrénaliennes humaines H295R en culture (Doghman et al., 2008), suggérant que le ciblage de la voie Wnt/ßcaténine pourrait induire une régression tumorale. Ces données encourageantes du PKF115-584 sont retrouvées dans de nombreux modèles *in vitro* et de xénogreffes (Sukhdeo et al., 2007; Wei et al., 2010). Pourtant, à ma connaissance, il n'a jamais atteint la phase I des tests cliniques ce qui suggère que son utilisation pour traiter les cortico-surrénalomes est pour le moment peu probable. Or, comme nous venons de le voir, aucune mutation de la ßcaténine n'est retrouvée dans les APA, dans 73% des ACS et 81% des CCS (Article 2 et (Berthon et al., 2012)). Dans ce contexte, d'autres molécules tels que le CWP232291 qui favorise la dégradation de la ßcaténine peuvent être utilisées. Contrairement au PKF115-584, l'action du CWP232291 sur la dégradation de la ßcaténine semble avoir été validée dans des modèles précliniques et serait

actuellement en test de phase I dans la leucémie myéloïde aigue réfractaire, même si aucune donnée n'a encore été publié (Kirschner, 2012).

Néanmoins, la voie Wnt/ßcaténine étant une voie de signalisation ubiquiste, l'utilisation d'inhibiteurs *in vivo* nécessite de prendre des précautions pour éviter une toxicité importante. Bien que ces effets adverses ait été décrits comme étant partiellement réversibles chez le zébrafish, ils seront inévitables chez l'Homme (Garber, 2009). Deux solutions alternatives peuvent donc être proposées afin de limiter ces effets indésirables :

- combiner les inhibiteurs de la voie Wnt/ßcaténine avec des systèmes permettant le ciblage des drogues aux tumeurs

- agir sur des acteurs en aval de la voie Wnt/ßcaténine qui favorisent son action dans la tumorigenèse

A) Ciblage des drogues thérapeutiques

Afin de limiter ces effets secondaires, des efforts conséquents sont réalisés afin de cibler les drogues thérapeutiques spécifiquement au niveau du tissu cible. Par exemple, la plus grande perméabilité vasculaire et le faible drainage lymphatique des tissus tumoraux a été utilisée pour développer des stratégies plus efficaces de « drug delivery ». En effet, cet effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) permet la libération sélective de macromolécules au sein des tumeurs solides (jusqu'à 10 à 50 fois plus que dans les tissus sains). Toutefois, ce ciblage passif nécessite l'utilisation de systèmes stables, non agrégés et avec un temps de circulation suffisamment long pour permettre l'accumulation dans les tumeurs. Il peut utiliser des nanoparticules polymériques ou des liposomes qui contiennent les drogues antitumorales à délivrer au niveau des tissus tumoraux (Iyer et al., 2006).

D'autre part, il existe également un ciblage actif qui nécessite cette fois d'avoir identifié des marqueurs de surface exprimés spécifiquement ou au moins préférentiellement au niveau des tissus tumoraux. Le ligand ou l'anticorps ciblant cette protéine de surface permettra alors la reconnaissance de la cible où sera libéré la drogue, principalement par endocytose (Kirpotin et al., 2006). Bien que de nombreux récepteurs de surface aient été décrits dans différents cancers et constituent des pistes potentielles, il serait intéressant de valider la présence de marqueurs de surface spécifiques dans les carcinomes cortico-surrénaliens.

Une autre piste potentielle dans le traitement du cancer de la cortico-surrénale serait d'utiliser les activités enzymatiques propres à la stéroïdogenèse afin d'activer les molécules thérapeutiques spécifiquement dans ce tissu. Ce principe est déjà utilisé pour le mitotane qui doit être métabolisé par les enzymes de type P450 pour être activé et ainsi exercé son action

anti-néoplasique (Hermsen et al., 2011). Nous pouvons imaginer étendre ce mécanisme à d'autres drogues déjà existantes, spécifiques des altérations génétiques présentes dans les CCS, tels que les inhibiteurs de la voie Wnt/ßcaténine. En effet, une pro-drogue inactive maturable par l'activité hydrolytique de la P450SCC (non spécifique de la surrénale) ou l'activité d'hydroxylation de CYP21 ou CYP11B1 pourrait être utilisé afin de limiter les effets systémiques indésirables. Néanmoins, bien que cette piste soit intéressante, elle reste à ce jour théorique et nécessite de nombreuses mises au point avant d'obtenir un composé circulant inactif qui serait activé uniquement suite à sa maturation dans les cellules surrénaliennes, par l'une des enzymes de la voie de stéroidogenèse.

B) Action sur les acteurs en aval de la voie Wnt/ßcaténine

Une solution alternative pour inhiber l'action tumorale de la voie Wnt/ßcaténine en limitant les effets néfastes, peut consister à viser directement ses cibles transcriptionnelles, essentielles au développement tumoral. Bien sûr cela nécessite d'avoir au préalable identifié les gènes cibles à l'origine du développement tumoral et que des inhibiteurs spécifiques de ces protéines existent. Dans le cadre de ma thèse, nous avons identifié deux acteurs potentiels en aval de la voie Wnt/ßcaténine :

- la voie Hedgehog qui même si cela doit encore être confirmé, semble intervenir dans le contrôle de la prolifération des cellules progénitrices au moins chez les souris ΔCat

- les facteurs NURs qui interviennent dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone dans les APA

a) La voie Hedgehog comme cible thérapeutique

Des données exposées au début de ces perspectives permettent de supposer que l'activation de la voie Hedgehog par la voie Wnt/ßcaténine contrôle la prolifération des cellules progénitrices. Par conséquent, l'activation constitutive de la voie Wnt/ßcaténine retrouvée dans les tumeurs cortico-surrénaliennes, pourrait induire une activation de la voie Hedgehog qui participerait à la mise en place du tissu tumoral. Bien que l'étude de la voie Hedgehog dans les CCS soit nécessaire pour valider cette hypothèse, ces données font de la voie Hedgehog, une cible thérapeutique potentielle, au moins dans les APA où la surexpression de Shh a récemment été décrite (Boulkroun et al., 2011).

Différents niveaux de la voie Hedgehog peuvent être ciblés par des inhibiteurs. Ainsi, il existe des antagonistes du ligand Shh (Stanton et al., 2009), des facteurs GLI1 (amplifiés dans certains cancers) et de Smoothened (Raju and Pham, 2012). Il existe 50 composés capables d'empêcher la levée de répression de Smoothened par les ligands Hh. Le plus utilisé est le GDC-

0449 dont les résultats en test clinique de phase I démontrent une réponse partielle ou totale chez près de 60% des patients présentant un carcinome de cellules basales (Von Hoff et al., 2009; Rudin et al., 2009). Cependant, une rechute 3 mois après la fin du traitement au GDC-0449 a été constatée chez certains patients porteurs de medulloblastomas dépendants de Hedgehog (Yauch et al., 2009). Actuellement, des études en cours ont mis en évidence des altérations génétiques pouvant causer cette résistance au traitement (Raju and Pham, 2012). Ainsi, les inhibiteurs de Smo pourraient être utilisés chez des patients ne présentant pas ces altérations génétiques ou en combinaison avec d'autres traitements visant ces altérations tels que les inhibiteurs de Gli1, dont l'amplification serait à l'origine de l'une des résistances.

Ces résultats qui démontrent la capacité des inhibiteurs de la voie Hh à bloquer la croissance tumorale sont donc encourageants, surtout que peu d'effet secondaire ont été décrits chez des patients adultes (LoRusso et al., 2011). Toutefois, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Hh doit être limité chez l'enfant où cette voie de signalisation joue un rôle essentiel dans le développement et la croissance de nombreux tissus (Raju and Pham, 2012).

b) Les facteurs NURs comme cible thérapeutique

Dans le cas des APA, nous avons déterminé que les facteurs NURs sont des acteurs en aval de la voie Wnt/ßcaténine, essentiels pour l'hypersécrétion d'aldostérone, ce qui fait d'eux une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de ces tumeurs.

Les facteurs NURs et principalement NUR77 jouent un rôle pro-oncogénique dans certains tissus tels que le pancréas (Lee et al., 2010; Mohan et al., 2012; Wu et al., 2011). Des drogues ciblant l'activité de NUR77 ont donc été développées même cela a été compliqué par l'absence de ligand naturel connu de ces récepteurs. A ce jour, il est possible de cibler son expression, son export nucléaire ou son interaction avec ses co-activateurs (Lee et al., 2011). Le DIM-C-pPOH (1,1-Bis(3'Indoyl)-1-p-hydroxyphenylmethane) qui inhibe la transactivation nucléaire de NUR77 diminue la croissance tumorale dans un modèle orthotopique de cancer pancréatique (Lee et al., 2010). De plus, cet inhibiteur ne semble présenter qu'une relativement faible toxicité. Son utilisation pourrait être validée chez les souris ΔCat qui présentent une surexpression de *NUR77*. Elle pourrait permettre de diminuer la sécrétion d'aldostérone plasmatique et peut être même agir sur la croissance tumorale. Toutefois, nos analyses en RTqPCR mettent uniquement en évidence une surexpression de *NURR1* dans les APA humains (Article 2) suggérant que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette isoforme serait plus indiquée. Cependant, à ma connaissance, il n'a pas été identifié d'inhibiteurs spécifiques de NURR1. C'est pourquoi, même si le DIM-C-pOH agit sur la partie amino terminale de NUR77 qui est la partie la moins conservée entre les deux isoformes (Safe et al., 2011), il serait intéressant

de déterminer si le DIM-C-pPOH est également capable d'inhiber la transactivation de *NURR1*. D'autre part, il serait également intéressant d'évaluer l'expression des différents membres de la famille dans les CCS afin d'évaluer leur potentiel comme cibles thérapeutiques dans le cadre des tumeurs malignes de la cortico-surrénale, en particulier chez les patients présentant une activation constitutive de la voie WNT/ßcaténine.

ANNEXES

Article 4 :

Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development.

Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P.

Mol Cell Endocrinol. 2011 Sep 10. Review

Molecular and Cellular Endocrinology 351 (2012) 87–95

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Review

Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development

Annabel Berthon [a], Antoine Martinez [a], Jérôme Bertherat [b,c], Pierre Val [a,*]

[a] CNRS UMR6247, Génétique Reproduction et Développement (GReD), Clermont Université, Aubière, France
[b] Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université René Descartes, 75005 Paris, France
[c] Centre de Référence des maladies rares de la surrénale, Département d'Endocrinologie, Hôpital Cochin, APHP, 75014 Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 10 September 2011

Keywords:
Wnt/β-catenin
Tumourigenesis
Adenoma
Carcinoma
Physiopathology

ABSTRACT

Wnt/β-catenin signalling plays essential roles during embryonic development and in adult tissue homeostasis. Canonical signalling through Wnt secreted ligands relies on the control of β-catenin cytoplasmic accumulation and translocation to the nucleus. In this compartment, β-catenin serves as a transcription coactivator for transcription factors such as Lef/Tcf or some nuclear receptors. Constitutive Wnt signalling resulting from inactivation of inhibitors of the pathway or from activating mutations in β-catenin, triggers tumour development in a number of tissues. Analysis of patients' samples and genetically engineered mouse models has shown that Wnt signalling was involved in adrenal development and tumourigenesis. This review will summarise all these recent findings and will focus on some of the mechanisms that may lead to aberrant accumulation of β-catenin in adrenocortical tumours.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 87
2. The Wnt signalling pathway . . . 88
3. Wnt signalling in adrenal development and homeostasis . . . 89
   3.1. Role of β-catenin in adrenal development and cell renewal . . . 89
   3.2. Role of β-catenin in zona glomerulosa differentiation . . . 89
4. Wnt/β-catenin signalling is involved in adrenal tumourigenesis . . . 89
   4.1. Evidence from FAP patients and APC mutations . . . 89
   4.2. Immuno-histochemical and molecular evidence of Wnt pathway activation in adrenal tumours . . . 90
   4.3. Wnt/β-catenin pathway in adrenocortical carcinomas . . . 90
   4.4. Wnt/β-catenin pathway in benign adrenocortical tumours . . . 90
5. Mechanisms involved in abnormal Wnt pathway activation in adrenal tumours . . . 91
   5.1. Activating mutations of β-catenin and inactivating mutations of APC . . . 91
   5.2. Role of Wnt ligands . . . 91
   5.3. Role of extracellular inhibitors of the Wnt pathway . . . 92
   5.4. Role of IGF2 signalling pathway . . . 92
   5.5. Role of PKA signalling pathway . . . 92
   5.6. Menin as an inhibitor of nuclear β-catenin accumulation . . . 92
6. Closing remarks . . . 93
   References . . . 93

1. Introduction

The adrenal is composed of two tissues with different embryological origins: the mesodermal cortex and a neural crest ectoderm-derived medulla. The adult adrenal cortex forms the major part of the gland and is split in three concentric zones named from outer to inner: zonae glomerulosa, fasciculata and reticularis. All zones are steroidogenic and produce mineralocorticoids (zona glomerulosa), glucocorticoids (zonae fasciculata/reticularis) and adrenal androgens (in primates but not rodents) (Orth and Kovacs, 1998). Benign and malignant adrenocortical tumours (ACT) indifferently present characteristics of the three cortical zones and can be divided in functional and non-functional tumours on the basis

* Corresponding author. Address: CNRS UMR6247, Génétique Reproduction et Développement (GReD), Clermont Université, BP80026, 24 avenue des Landais, 63171 Aubière, France. Tel.: +33 4 73 40 74 09; fax: +33 4 73 40 70 42.
E-mail address: pierre.val@univ-bpclermont.fr (P. Val).

0303-7207/$ - see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mce.2011.09.009

of hormone secretion or lack thereof. Functional tumours induce four different types of chronic hormone excess depending on their secretion profile: Cushing's syndrome (cortisol excess), Conn's syndrome (aldosterone excess), virilising syndrome (androgen excess) or a mixed secretion syndrome (Groussin et al., 2007). Benign adrenocortical adenomas (ACA) are common, with an estimated prevalence of 3–7% in the fifth decade of life (Grumbach et al., 2003). In contrast, adrenocortical carcinomas (ACC) are rare tumours with an estimated incidence of 0.5–2 cases per million per year in adults and they account for 0.02–0.4% of all deaths by cancer (Wajchenberg et al., 2000). However, ACC are very aggressive tumours with an overall poor prognosis and a 5 years survival rate of 16–38% (Abiven et al., 2006; Allolio et al., 2004; Libe et al., 2007; Luton et al., 1990). About forty percent of ACC do not show increased hormone secretion and are therefore detected incidentally or during evaluation for abdominal or flank pain. Consequently, median tumour size is 10 cm, and 30–40% of patients already have evidence of metastasis at first presentation (Dackiw et al., 2001; Ng and Libertino, 2003). To date, complete tumour resection remains the only curative option for these patients as adjuvant treatment is of limited effectiveness. In the past 15 years, considerable efforts have aimed at understanding the molecular mechanisms involved in adrenal tumour development, in order to engineer novel targeted therapies for these highly morbid tumour entities. Recent data originating from clinical observations and analyses of genetically engineered mouse models have provided ample evidence for a role of Wnt/β-catenin signalling in adrenal tumourigenesis but also in adrenocortical development and homeostasis (Berthon et al., 2010).

The present review will gather all these observations and will shed light on potentially clinically relevant regulators of the Wnt/β-catenin pathway.

2. The Wnt signalling pathway

Wnt signalling is a highly conserved system throughout evolution. This pathway regulates a vast array of cellular processes including proliferation, differentiation, survival and/or apoptosis, all of which are essential for embryonic development and adult tissue homeostasis. Activity of this pathway relies on glycoproteic extracellular ligands of the Wingless family (Wnts). Three different Wnt signalling pathways can be activated upon binding of Wnts to their receptor complex: the planar cell polarity (PCP) pathway, involved in ciliogenesis, the Wnt/Ca^{2+} pathway, involved in the control of cell movement and behaviour and the canonical Wnt/β-catenin pathway. Although the first two pathways may play a yet unrecognised role in adrenal pathogenesis, this review will focus on the canonical pathway in which β-catenin transduces the Wnt signal to the nucleus.

β-catenin is a multifunctional protein, which can be found associated with E-cadherins at the plasma membrane or as a cytoplasmic/nuclear protein. When associated with cadherins, β-catenin is involved in cell–cell adhesion processes. Disruption of this interaction is thought to participate in the malignant progression of epithelial tumours. The cytoplasmic form of β-catenin can translocate in the nucleus where it acts as a transcription cofactor. Activity of the canonical Wnt signalling pathway is dependent on controlling the cytoplasmic and nuclear accumulation of β-catenin (Fig. 1). In the absence of Wnt ligands, cytoplasmic β-catenin is phosphorylated on a set of conserved Ser and Thr residues in its amino terminus by a "destruction" complex (Liu et al., 2002). This complex is composed of scaffolding proteins Axin and adenomatous polyposis coli (APC), the glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) and casein kinase I (CKI) (Fig. 1A). Phosphorylated β-catenin is recognised by the E3 ubiquitin ligase β-TrCP and targeted to proteosomal degrada-

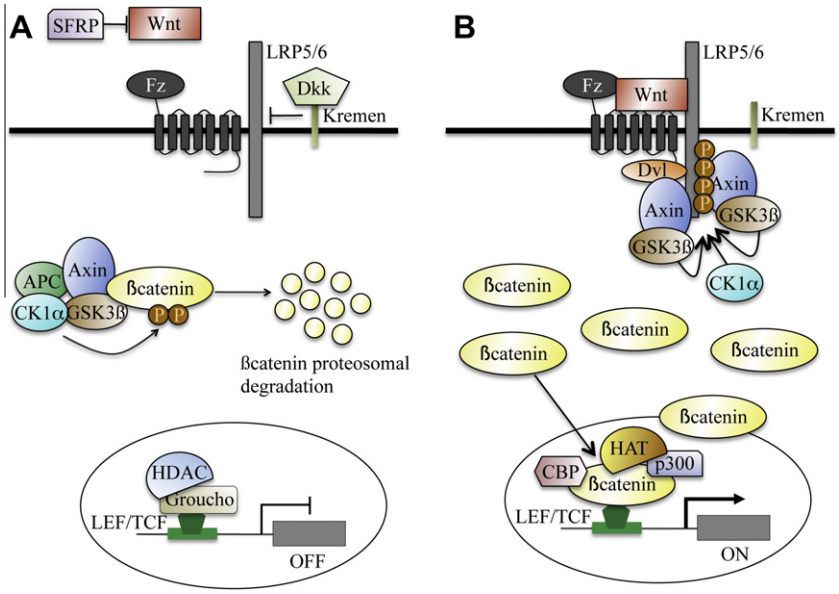


Fig. 1. The Wnt/β-catenin signalling pathway. (A) In the absence of Wnt ligands, cytoplasmic β-catenin is phosphorylated on a set of conserved Ser and Thr residues in its amino terminus by a "destruction" complex composed of Axin, adenomatous polyposis coli (APC), the glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) and casein kinase I (CKI). Phosphorylated β-catenin is then targeted to proteosomal degradation, which results in low cytosolic levels. Extracellular Wnt signalling can be inhibited by members of the Secreted frizzled related proteins (SFRPs) and Dickkopf (DKK) families. (B) Wnt signalling is initiated when the secreted Wnt ligands bind to their receptor complex, consisting of Frizzled (Fz) and one member of the low-density lipoprotein (LDL) receptor family, LRP5/6. This binding disrupts the "destruction complex" by recruiting Dishevelled (Dvl) to the cytoplasmic domain of Fz. This association induces the delocalization of cytoplasmic Axin to the cytoplasmic tail of LRP after GSK3β-dependent phosphorylation of the Fz co-receptor. Membrane sequestration of the "destruction" complex prevents phosphorylation and subsequent degradation of β-catenin. This results in cytoplasmic accumulation of active β-catenin. Active β-catenin then translocates in the nucleus where it behaves as a transcriptional co-factor for the T cell-specific factors (Tcf)/lymphoid enhancer-binding factor (Lef). In the absence of Wnt signal, Tcf/Lef proteins repress target genes expression through a direct association with transcriptional inhibitors of the Groucho family and histone deacetylases (HDACs). Interactions between β-catenin and TCF/LEF-1 recruit histone acetylases, the Legless family docking protein (Bcl9) and CBP/p300, thereby converting TCF/LEF into transcriptional activators of their target genes.

tion, resulting in low cytosolic levels (Aberle et al., 1997). Wnt signalling is initiated when the secreted Wnt ligands bind to their receptor complex, consisting of a serpentine receptor of the Frizzled (Fz) family and one member of the low-density lipoprotein (LDL) receptor family, LRP5/6 (Bhanot et al., 1996; Yang-Snyder et al., 1996). This binding disrupts the "destruction complex" by recruiting Dishevelled (Dvl) to the cytoplasmic domain of Fz. This association induces the delocalization of cytoplasmic Axin, a key negative regulator of β-catenin, to the cytoplasmic tail of LRP after GSK3β-dependent phosphorylation of the Fz co-receptor. Membrane sequestration of the "destruction" complex prevents phosphorylation and subsequent degradation of β-catenin. This results in cytoplasmic accumulation of active β-catenin. Active β-catenin then translocates in the nucleus where it behaves as a transcriptional co-regulator. For its nuclear action, β-catenin interacts with the N-terminus of DNA-binding proteins of the T cell-specific factors (Tcf)/lymphoid enhancer-binding factor (Lef-1) (Eastman and Grosschedl, 1999). In the absence of Wnt signal, Tcf/Lef proteins repress target genes expression through a direct association with transcriptional inhibitors of the Groucho family and histone deacetylases (HDACs) (Cavallo et al., 1998). Interactions between β-catenin and TCF/LEF-1 recruit histone acetylases, the Legless family docking protein (Bcl9) and CBP/p300 thereby converting TCF/LEF-1 into transcriptional activators of their target genes. Targets of the Wnt pathway include genes involved in a wide array of essential cellular functions. As such, Wnt signalling is essential for the development of numerous tissues and β-catenin inactivation results in marked developmental defects. In contrast, abnormal activation of the pathway, following inactivation of proteins of the destruction complex or activating mutations of β-catenin, disrupts tissue homeostasis and promotes tumour formation.

3. Wnt signalling in adrenal development and homeostasis

3.1. Role of β-catenin in adrenal development and cell renewal

Expression of different actors of Wnt signalling has been demonstrated in the adrenal cortex either during embryonic development or in adults. These included the Wnt ligands Wnt11 (Lako et al., 1998) and Wnt4, the Wnt receptors Fzd1 and 2, the cytosolic protein Dvl3 and the signalling modulator DKK3 (Suwa et al., 2003). This suggested that Wnt/β-catenin signalling could be involved in adrenal development and homeostasis.

Indeed, a role for β-catenin in adrenal development has recently been shown by the analysis of mice bearing a conditional allele of β-catenin. In these mice, adrenal-specific recombination of the floxed β-catenin locus was achieved through the use of two transgenic Cre lines in which different levels of recombination efficiency were achieved by using different regulatory elements of the Sf-1 gene (Kim et al., 2008). Complete inactivation of β-catenin as early as E12.5 resulted in a drastic decrease in proliferation and differentiation (decreased expression of Sf-1, Cyp11a1 and 3βHSD). Most of the adrenal gland had subsequently disappeared in E18.5 deficient embryos, showing that β-catenin was required for the early steps of adrenal development. In contrast, partial inactivation of β-catenin had no major effect on adrenal histology and differentiation until 30 weeks post partum. At this stage, some mice presented thinning, disorganisation and lack of differentiation of the adrenal cortex as well as increased apoptosis. Later on, cortical thinning was evident in all β-catenin deficient mice. This suggested that β-catenin was required for renewal of adrenal cortical cells over time. Consistent with this idea, we have shown that constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex of transgenic mice resulted in the accumulation of undifferentiated spindle-shaped cells originating from the capsular/subcapsular area (Berthon et al., 2010). This area contains Gli1-positive adrenal progenitor mesenchymal cells that are recruited in response to sonic hedgehog production by undifferentiated Sf-1 positive cells (King et al., 2009). Both Wnt and hedgehog signalling are known to play a role in the recruitment and commitment of progenitors in different systems (Silva-Vargas et al., 2005; Suzuki et al., 2009; Yang et al., 2008). It is thus tempting to speculate that β-catenin, possibly through interactions with hedgehog signalling, is involved in the recruitment of adrenal cortex progenitors throughout adult life.

3.2. Role of β-catenin in zona glomerulosa differentiation

Among the Wnt ligands expressed in the adrenal, Wnt4 showed a restricted expression pattern in the vicinity of zona glomerulosa. Interestingly, Wnt4 knockout mice had impaired zona glomerulosa differentiation characterised by decreased Cyp11b2 expression and lower plasma aldosterone concentration at birth. This effect was zone-specific as Cyp21a1 expression and corticosterone levels were not altered (Heikkila et al., 2002). A role for WNT4 in adrenal development in humans was confirmed by identification of a loss of function mutation (C341T) in patients with SERKAL syndrome, which is associated with sex reversal and dysgenesis of the kidneys and adrenals (Mandel et al., 2008). Unfortunately, aldosterone levels were not analysed in affected foetuses. Consistent with a potential role of WNT4 in the control of zona glomerulosa homeostasis, W*NT4* mRNA was found up-regulated in a subset of Conn's adenomas (Kuulasmaa et al., 2008). Accordingly, infection of human adrenocortical cells with adenoviruses encoding human WNT4, increased CYP11B2 expression and aldosterone production (Chen and Hornsby, 2006). Altogether, these observations suggested that Wnt4 and potentially β-catenin were involved in the establishment of the zonated function of the adrenal cortex. We recently confirmed this hypothesis in a mouse genetic model of adrenal-specific constitutive activation of β-catenin. Indeed, generalised activation of β-catenin in the adrenal resulted in ectopic differentiation of Cyp11b2-positive cells in the cortex and in the central adrenal region. This was associated with an increase in aldosterone and a concomitant decrease in plasma renin concentrations (Berthon et al., 2010). These observations strongly suggest that Wnt/β-catenin signalling acts as a driving force in the differentiation and homeostasis of the zona glomerulosa in mouse. Whether this is also true in human remains to be determined. One confusing observation is that β-catenin activation and/or mutations have only been described in cortisol secreting or non-secreting tumours. Although this would suggest that β-catenin is not involved in glomerulosa differentiation, it is probable that some of these tumours have undergone an unrecognized aldosterone-secreting phase before turning to cortisol secretion. Consistent with this hypothesis, the most aggressive tumours in mice with constitutive β-catenin activation are either hormonally silent or cortisol-secreting (Berthon et al., 2010 and unpublished observations). Work is currently underway in the lab to determine the extent of Wnt pathway activation in Conn's syndrome and the molecular pathways involving β-catenin in the control of aldosterone production.

4. Wnt/β-catenin signalling is involved in adrenal tumourigenesis

4.1. Evidence from FAP patients and APC mutations

Studies of rare hereditary syndromes predisposing to ACT such as Carney complex, Li–Fraumeni or Beckwith–Wiedemann syndromes, have been very important to identify key genetic alterations involved in familial as well as sporadic ACT (Libe and Bertherat, 2005). The first hint at a role of Wnt signalling in adrenal

tumourigenesis came from patients with familial adenomatous polyposis (FAP). In these families, inherited heterozygous germline mutations in the gene coding APC result in the formation of hundreds to thousands of benign polyps in the large intestine. Inevitably, a subset of these polyps undergoes biallelic inactivation of APC and progresses towards malignancy. This is associated with constitutive activation of β-catenin, resulting from impaired activity of the destruction complex. Interestingly, these patients not only develop intestinal polyps but also show increased incidence of ACT.

The first case of ACT in FAP was reported almost a century ago (Devic, 1912). Approximately 50 cases have since been described in the literature. Many of them were asymptomatic and discovered at autopsy (Alexander et al., 2000; Beuschlein et al., 2000; Chelaifa et al., 2003; Kartheuser et al., 1999; Marchesa et al., 1997; Naylor and Gardner, 1981; Ozuner and Hull, 1999; Painter and Jagelman, 1985; Pines Corrales et al., 2006; Smith et al., 2000; Wakatsuki et al., 1998; Yamakita et al., 1997). However, advances in imaging technologies have allowed a more precise evaluation of the prevalence of adrenal masses in the general population and in FAP patients. Two retrospective studies show the increased occurence of ACT in patients affected by FAP with an incidence of 7.4–13% compared to 0.6–3,4% in the non-FAP population (Marchesa et al., 1997; Smith et al., 2000). Although these values can be overestimated as a result of increased prescription of imaging in FAP patients, this suggests that ACT are two to four times more frequent in FAP patients than in the general population. Genetic analysis of ACT in FAP patients demonstrated that all of the ACT have germline and somatic APC mutations, according to Knudson's two-hit model for a tumour suppressor gene (Gaujoux et al., 2010). Somatic APC mutations are mainly nucleotides substitutions or frameshift mutations that lead to the production of a truncated APC protein. Inappropriate cytoplasmic an/or nuclear accumulation of β-catenin was observed in some ACT with APC mutations. This suggested that biallelic inactivation of APC in FAP patients resulted in constitutive activation of β-catenin and that this in turn, triggered tumour development. However, inactivating APC mutations were not found in a cohort of 20 ACC (Gaujoux et al., 2010), suggesting that this mechanism was unlikely to account for the vast majority of sporadic adrenocortical tumours.

4.2. Immuno-histochemical and molecular evidence of Wnt pathway activation in adrenal tumours

The first clinical evidence that aberrant Wnt/β-catenin signalling may be involved in the development of sporadic adrenal tumours came in 2005 when Tissier and collaborators showed that β-catenin was accumulated in the cytoplasm and/or nucleus of 22 out of 39 ACT as well as in the human ACC cell line H295R (Tissier et al., 2005). This abnormal accumulation of β-catenin was associated with activating mutations of β-catenin in a significant proportion of cases (11 out of 39). Most of these (8 out of 11) were point mutations resulting in a substitution of serine 45. The same mutation was also observed in H295R cells, in which the WNT reporter gene TOPFLASH was constitutively activated. Long deletions causing part or entire loss of exon 3 were also reported in ACT. All these mutations in exon 3 of the *β-catenin* gene affected specific serine and threonine residues, and amino acids adjacent to them, which are essential for the targeted degradation of β-catenin (Hagen and Vidal-Puig, 2002; Kikuchi, 2003; Liu et al., 2002). These mutations have now been reported in ACA, ACC and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). At present β-catenin activating mutation is the most frequent genetic defect observed both in sporadic ACA and ACC (Tadjine et al., 2008a; Tissier et al., 2005).

A causal role of β-catenin in adrenal tumour development was initially suggested by the effect of PKF115-584, an inhibitor of β-catenin/TCF interactions, which markedly reduced proliferation of H295R cells (Doghman et al., 2008). We recently confirmed this hypothesis by generating transgenic mice in which β-catenin was constitutively activated in the adrenal cortex. This activation resulted in adrenal hyperplasia and dysplasia in all transgenic animals, demonstrating the role of constitutive β-catenin activation in adrenal tumour initiation. However, only about 30% of transgenic mice developed malignant adrenal tumours by 17–18 months. This suggested that in this setting, further genetic alterations were required to trigger malignant adrenal tumour development (Berthon et al., 2010). This hypothesis is consistent with clinical observations showing increased β-catenin accumulation in malignant versus benign tumours (Tissier et al., 2005), although β-catenin mutations are more frequent in the benign group (Bonnet et al., 2011; Gaujoux et al., 2011).

4.3. Wnt/β-catenin pathway in adrenocortical carcinomas

Activation of the Wnt signalling pathway in ACC has been initially suggested by gene profiling studies reporting over-expression of target genes of the Wnt/β-catenin pathway in malignant tumours (Giordano et al., 2003). This has been further confirmed by immunohistochemical evaluation of the Cochin and German ENSAT ACC cohorts. These analyses showed nuclear accumulation of β-catenin in 64 out of 171 ACC (39.2%). This was associated with activating mutations of β-catenin in 8 out of 49 tumours available for sequencing and one inactivating mutation of APC (Gaujoux et al., 2011). Interestingly, the cytoplasmic and nuclear β-catenin accumulation pattern was more dramatic in ACC than in ACA, suggesting that higher activation of the Wnt/β-catenin pathway was correlated with aggressive tumour development (Tissier et al., 2005). Indeed, in the study of the Cochin ACC cohort, the presence of nuclear β-catenin staining was significantly associated with a higher tumour stage, higher Weiss score and Ki67 index, as well as more frequent necrosis and mitoses. Furthermore, nuclear β-catenin staining and the presence of mutations in CTNNB1 or APC were both associated with worse overall and disease-free survival, and were independent predictive factors of survival in multivariable analysis (Fig. 2) (Gaujoux et al., 2011). These immunohistochemical observations are also supported by transcriptome analyses that have shown an association between aggressive ACC and overexpression of β-catenin target genes (Ragazzon et al., 2010).

4.4. Wnt/β-catenin pathway in benign adrenocortical tumours

The involvement of the Wnt/β-catenin signalling pathway in ACA is now well documented. Tissier et al. (2005) first reported the frequent involvement of Wnt/β-catenin signalling pathways in ACA. In this initial study, immunohistochemistry revealed abnormal cytoplasmic and/or nuclear accumulation of β-catenin in 10 out of 26 adrenocortical adenomas, and activating somatic mutations of the β-catenin gene were shown in 7 out of 26 ACA. Interestingly, these mutations were only observed in adrenocortical tumours with abnormal β-catenin accumulation. β-catenin alterations were more frequent in non-functioning adenomas and activating mutations were associated with larger tumours (Bonnet et al., 2011). Overall this suggested that β-catenin pathway activation was mostly involved in the development of less differentiated and more aggressive adrenocortical adenomas.

Primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) is a bilateral form of benign ACT that can be observed in patients with Carney complex. These tumours are most frequently caused by germline mutations of the regulatory subunit R1A of the protein kinase A (*PRKAR1A*) gene (Groussin et al., 2002; Kirschner et al., 2000). *PRKAR1A* somatic mutations have also been observed in secreting ACA (Bertherat et al., 2003). PRKAR1A is a key component of the cAMP pathway, and the inactivating PRKAR1A mutations observed

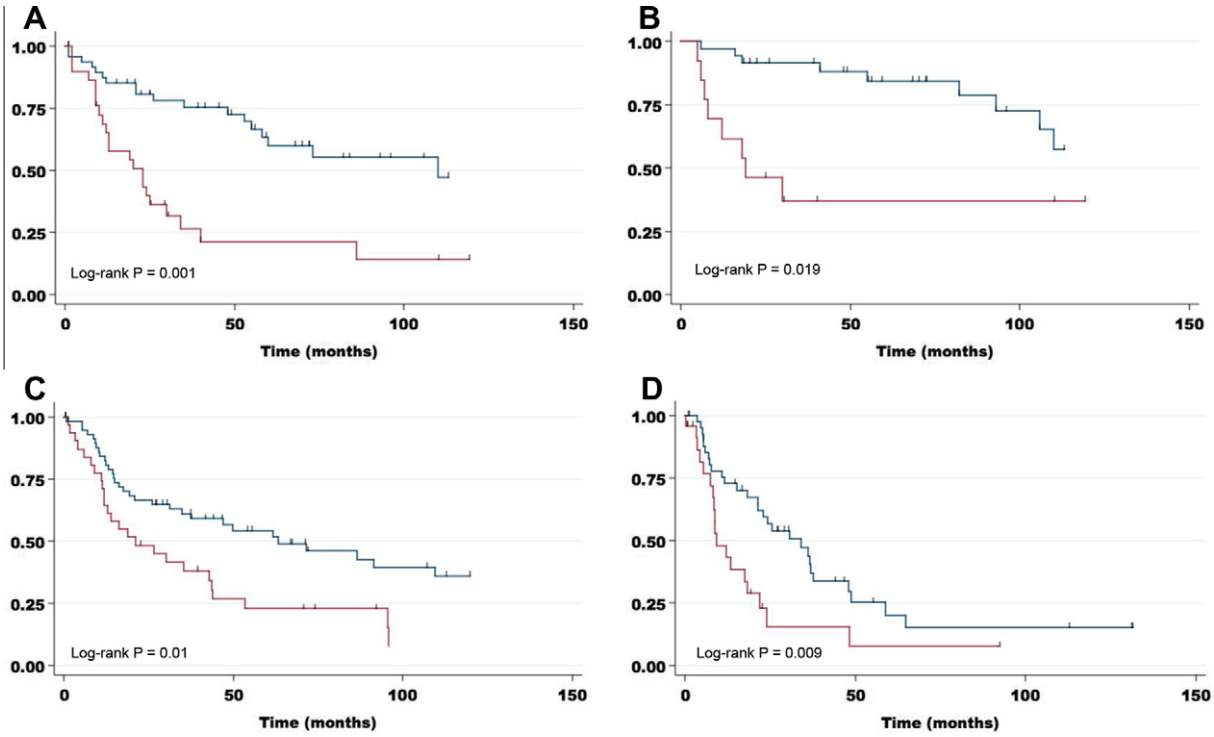


Fig. 2. Patients' overall and disease-free survival according to the presence of β-catenin nuclear staining (Kaplan–Meier method). (A) Overall survival of the patients ($n = 79$) of the Cochin-COMETE cohort according to the presence (dotted line) or absence (continuous line) of β-catenin nuclear staining. (B) Disease-free survival of the patients with complete surgical resection ($n = 50$) of the Cochin-COMETE cohort according to the presence (dotted line) or absence (continuous line) of β-catenin nuclear staining. (C) Overall survival of the patients ($n = 92$) of the German-ENSAT cohort according to the presence (dotted line) or absence (continuous line) of β-catenin nuclear staining. (D) Disease-free survival of the patients with complete surgical resection ($n = 67$) of the German-ENSAT cohort according the presence (dotted line) or absence (continuous line) of β-catenin nuclear staining. Reproduced from Gaujoux et al. (2011)s.

in Carney complex lead to stimulation of PKA activity (Bossis and Stratakis, 2004; Groussin et al., 2002; Horvath et al., 2008; Sahut-Barnola et al., 2010). Gene (Horvath et al., 2006b) or miRNA (Iliopoulos et al., 2009) profiling studies in PPNAD suggested activation of the Wnt/β-catenin pathway in PPNAD tumourigenesis. This was consistent with cytoplasmic and nuclear accumulation of β-catenin in tumour nodules (Gaujoux et al., 2008; Tadjine et al., 2008b). Interestingly, somatic activating mutations of β-catenin were only found in larger macronodules (>10 mm) but not in micronodules or in contralateral adrenals. This suggested that this molecular alteration might be linked to the appearance of these unusually big nodules in PPNAD, a type of ACT with a very low growth potential.

Over-activation of the cAMP/PKA pathway can also be found in ACTH-independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH), another type of benign bilateral adrenal tumours (Assie et al., 2010; Bourdeau et al., 2006; Lacroix et al., 2010). In these tumours, large-scale cDNA microarray analysis demonstrated the differential expression of several Wnt/β-catenin signalling related genes (Bourdeau et al., 2004), although there was no evidence of β-catenin activating mutations in the 13 AIMAH analysed by Tadjine et al. (2008a). Altogether, these observations suggest that the tumourigenic potential of deregulated PKA may be mediated at least in part, by stimulation of Wnt/β-catenin pathway activity. This is discussed in chapter V-5.

5. Mechanisms involved in abnormal Wnt pathway activation in adrenal tumours

5.1. Activating mutations of β-catenin and inactivating mutations of APC

From all the data discussed in the previous paragraphs, it is very clear that Wnt/β-catenin signalling plays an essential role in adrenal physiology (glomerulosa activity and cell renewal) and that constitutive activation of the pathway is involved in adrenal tumour initiation and progression. One essential question that arises from these observations is the identification of the physiological mechanisms that restrict β-catenin activation to the appropriate cell type at the appropriate time-point. Deregulation of such mechanisms would result in abnormal activation of the pathway and subsequent tumour development.

Activating mutations of the third exon of β-catenin are known to account for Wnt pathway activation in a number of tumour types. Such mutations were found in 36/100 (36.0%) benign adrenal tumours and in 8/49 (16.3%) carcinomas, all of which showed abnormal nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin (Bonnet et al., 2011; Gaujoux et al., 2011). Although this is one of the most frequent mutations found in adrenal tumours, a large number of ACA (23%) and a majority of ACC (74%) show abnormal β-catenin staining in the absence of β-catenin mutations. Biallelic inactivation of APC is frequent in adrenal tumours in patients with FAP (3/3) but not in sporadic ACC (0/20) (Gaujoux et al., 2010). Therefore, molecular alterations beyond β-catenin and APC mutations are involved in Wnt pathway activation in a significant proportion of adrenal tumours.

5.2. Role of Wnt ligands

Wnt signalling is activated by secreted Wnt glycoproteic ligands. There are 19 different Wnt proteins in humans and mouse, few of which seem to be expressed in the adrenal. Although their up-regulation would be expected to stimulate Wnt pathway activity, there is only one report in ACT showing association of WNT4 up-regulation with Conn's adenoma (Kuulasmaa et al., 2008). Our retrospective analysis of Giordano's micro-array data (Giordano et al., 2003) shows down-regulation of WNT11 in ACC versus normal adrenal (0.32-fold) and ACA (0.36-fold). Interestingly, WNT11

does not induce β-catenin stabilisation and is thought to inhibit canonical Wnt signalling through mechanisms involving Ca2 + and PKC activation (Maye et al., 2004; Railo et al., 2008). WNT11 expression is downregulated in oral squamous cell carcinoma (Andrade Filho et al., 2011) and in hepatocellular carcinoma (HCC) compared with adjacent uninvolved liver (Toyama et al., 2010). In human HCC cell lines, overexpression of Wnt11 activates PKC, inhibits canonical Wnt signalling and decreases cell proliferation and migration (Toyama et al., 2010). However, WNT11 is overexpressed in prostate carcinoma and its silencing in prostate cancer cell lines prevents neuroendocrine differentiation and induces apoptosis (Uysal-Onganer et al., 2010; Zhu et al., 2004). These data suggest that depending on the cellular context, WNT11 can either prevent or stimulate tumour development. In light of these observations, it will be interesting to determine if the decrease in WNT11 expression found in ACC is involved in increased β-catenin signalling and tumour progression.

5.3. Role of extracellular inhibitors of the Wnt pathway

Extracellular activation of Wnt signalling is controlled at multiple levels by proteins such as SFRPs (secreted frizzled related proteins) and DKKs (Dickkopf). SFRPs are proteins structurally related to the Frizzled receptors that contain the cysteine rich domain responsible for interaction with Wnt ligands. However, they lack the transmembrane segments required to anchor Frizzled to the plasma membrane and to initiate signal transduction. SFRPs are thus capable of sequestering Wnt ligands away from their receptors and of inhibiting Wnt signalling (Bovolenta et al., 2008). Consistent with this activity, decreased expression of SFRPs associated with β-catenin activation has been shown in a number of human carcinomas (Bovolenta et al., 2008). Down-regulation of SFRPs expression can be achieved by allelic losses (Ugolini et al., 1999) or epigenetic methylation of their promoters (Herman and Baylin, 2003; Suzuki et al., 2004). In line with a potential role as tumour suppressors, re-expression of SFRPs in cancer cell lines decreases β-catenin stabilisation, reduces their tumourigenic capacities and induces apoptosis, even in the context of activating mutations in the downstream Wnt signalling pathway (Suzuki et al., 2004; Zi et al., 2005). Interestingly, genetic mapping analysis in mouse showed that susceptibility to adrenal tumourigenesis after gonadectomy was linked with the Sfrp1 genomic locus. In susceptible mouse strains, Sfrp1 expression was decreased in tumour tissue when compared with adjacent healthy cortex (Bernichtein et al., 2008). Our analysis of previously published micro-array data (Giordano et al., 2003) shows that Sfrp4 but not Sfrp1 expression is decreased in both ACA (0.5-fold) and ACC (0.5-fold) compared with normal adrenal. This suggests that members of the Sfrp family of Wnt repressors may act as tumour suppressors in the adrenal. However, there is no report of spontaneous tumour formation in Sfrp1 or Sfrp4 knockout mice (Christov et al., 2011; Trevant et al., 2008). This observation may reflect functional redundancy among Sfrp members that may prevent constitutive β-catenin activation and subsequent oncogenesis.

The Dickkopf (DKK) family of glycoproteins is composed of five members in humans. DKK 1,2 and 4 inhibit Wnt signalling by interacting with their receptors of the Kremen (Krm) family and with Lrp5/6 Wnt co-receptors. One mechanism for Wnt inhibition relies on the formation of a trimeric complex involving DKK, Krm and Lrp, which induces internalisation of the Wnt receptors. DKK3 seems to be the only member of the family expressed in the adrenal (Suwa et al., 2003). It has been shown to decrease aldosterone production when overexpressed in primary human adrenocortical cells (Chen and Hornsby, 2006). DKK3 is a peculiar member of the DKK family. It does not interact with Kremen receptors at the cell surface (Nakamura and Hackam, 2010) and it can inhibit or stimulate Wnt signalling, depending on the cellular context (Nakamura et al., 2007). DKK3 is down-regulated in a number of Wnt-dependent tumours and its overexpression can be associated with growth inhibition and apoptosis induction (Lee et al., 2009; Mizobuchi et al., 2008; Niehrs, 2006; You et al., 2011). Consistent with these observations, DKK3 also seems to be down-regulated in ACC compared with normal adrenal (0.19-fold) and ACA (0.39) (our analysis of Giordano's data). However, as for SFRPs, deletion of Dkk3 alone does not increase spontaneous tumour development in mouse (Barrantes Idel et al., 2006).

5.4. Role of IGF2 signalling pathway

An almost constant finding in adult adrenal carcinomas when compared with adrenal adenomas is the dramatic overexpression of the growth factor IGF2 (de Fraipont et al., 2005; de Reynies et al., 2009; Gicquel et al., 2001, 1997; Giordano et al., 2003). IGF2 signalling involves binding of IGF to the IGFIR receptor. This triggers autophosphorylation of the receptor and allows recruitment of adaptor proteins such as IRS1 and Shc. These proteins are phosphorylated by activated IGFIR and recruit Grb2/SOS and PI3K. This in turn results in activation of the MAPKinase and PI3K/AKT pathways. Interestingly, in cell culture systems, IGF2 (Morali et al., 2001) and IGF1 (Verras and Sun, 2005) can stabilise β-catenin and induce Wnt target genes expression (Morali et al., 2001; Sawyer et al., 2003). This phenomenon can involve phosphorylation and inhibition of GSK3β by the PI3K and MAPK pathways, which in turn, prevents phosphorylation of β-catenin (Cross et al., 1995; Ding et al., 2005, 2010; Frame and Cohen, 2001). β-catenin is also a direct target of activated AKT1. Indeed, AKT1 can phosphorylate β-catenin on Ser552 in vivo and in vitro. Although the underlying mechanisms are still unclear, this phosphorylation triggers β-catenin translocation, increases Lef-dependent transcription and favours invasion in Matrigel assays (Fang et al., 2007). The observation of a more dramatic cytoplasmic/nuclear β-catenin staining in ACC compared with ACA (Tissier et al., 2005), suggests that IGF2 overexpression in ACC may be involved in increased Wnt/β-catenin signalling in malignant tumours.

5.5. Role of PKA signalling pathway

PKA can also phosphorylate and inactivate GSK3β (Fang et al., 2000; Taurin et al., 2007), which could promote Wnt signalling. Furthermore, β-catenin is a direct target of phosphorylation by PKA on Ser675 and Ser552. These phosphorylations prevent β-catenin degradation (Hino et al., 2005) and also enhance recruitment of coactivators such as CBP, on the promoters of β-catenin/lef target genes (Taurin et al., 2006, 2008). PKA is over-activated in a number of adrenal cortical tumours such as PPNAD (Azevedo and Stratakis, 2011; Horvath et al., 2006a; Kirschner et al., 2000; Sahut-Barnola et al., 2010) and AIMAH (Assie et al., 2010; Bourdeau et al., 2006; Lacroix et al., 2010). Consistent with a potential role of PKA in controlling Wnt signalling, β-catenin is accumulated in PPNAD samples, even in the absence of β-catenin activating mutations (Gaujoux et al., 2008; Tadjine et al., 2008b). This suggests that some of the tumourigenic properties of PKA may rely on constitutive Wnt pathway activation. However, our preliminary data on samples from mice with inactivation of PRKAR1A in the adrenal cortex (Sahut-Barnola et al., 2010) show that the crosstalk between the two pathways may not be relevant to adrenal oncogenesis, even though it may apply to other tissues (Almeida et al., 2010).

5.6. Menin as an inhibitor of nuclear β-catenin accumulation

Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) is a multi-tumour syndrome in which patients may present with more than 20 endo-

crine and non-endocrine lesions. These include parathyroid adenomas, entero-pancreatic, pituitary and adrenal cortical tumours in up to 20–40% of patients. ACT in MEN1 are mostly non-functional, but aldosterone excess has been reported in some cases (Beckers et al., 1992). MEN1 is an autosomal dominant disease associated with germline inactivating mutations in the gene coding the protein Menin (Almeida and Stratakis, 2010). Heterozygous Men1 mutant mice develop tumours reminiscent of human MEN1 syndrome (Bertolino et al., 2003). Tumours progress towards malignancy and exhibit Men1 loss of heterozygosity. These data show that Menin is involved in suppressing development of endocrine tumours. Menin is predominantly expressed in the nucleus and is involved in the control of multiple cellular processes including cell cycle progression, apoptosis and control of transcription. It interacts with transcription factors such as JunD, NF-κB and Smad3 as well as with nuclear receptors such as ER, VDR and PPAR. It is also associated with epigenetic gene expression control, through interaction with histone methyl transferases of the MLL family (Balogh et al., 2010). Interestingly, loss of Menin in the pancreas of Men1 knockout mice results in nuclear accumulation of β-catenin. Conversely, overexpression of Menin in Men1−/− MEFs reduces accumulation of β-catenin in the nucleus. This activity of Menin is dependent on its physical interaction with β-catenin and on nuclear export signals found on Men1. These are required for Menin to carry β-catenin out of the nucleus via nuclear-cytoplasmic shuttling (Cao et al., 2009). Altogether, these observations establish Menin as a good candidate negative regulator of β-catenin signalling in the adrenal. Surprisingly though, Men1 mutations are scarce in sporadic adrenal tumours, suggesting that Wnt/β-catenin pathway activation in these tumours is not dependent on Menin inactivation (Costa et al., 2001; Schulte et al., 1999, 2000; Zwermann et al., 2000). However, this does not rule out a potential involvement of β-catenin in the pathogenesis of adrenal cortical tumours in Men1 patients. Evaluation of Wnt/β-catenin pathway activation in these patients may shed light on new pathogenic mechanisms involved in adrenal tumourigenesis in the context of multiple endocrine neoplasia.

6. Closing remarks

All the literature presented in this review highlights the central role of β-catenin in adrenal physiology and tumourigenesis. One clear finding of the studies covered here, is that genetic alterations in β-catenin or APC only explain a minority of ACT with Wnt/β-catenin pathway activation. Therefore, the mechanisms involved in activation of the pathway in the majority of activated ACT remain to be determined. Further investigation of the mechanisms involved in the control of Wnt/β-catenin activity in physiological situations may unveil the alterations that lead to ACT development. The clear demonstration of the frequent alterations of the Wnt/β-catenin pathway in ACT supports the potential therapeutic interest of drugs targeting this pathway. In particular it provides a basis for the use of Wnt pathway inhibitors in ACC therapy. The next challenge will be to identify potent drugs that could be used in humans and to define the surrogate markers of Wnt/β-catenin activation to identify tumours that would benefit from such therapy.

References

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., Kemler, R., 1997. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 16, 3797–3804.

Abiven, G., Coste, J., Groussin, L., Anract, P., Tissier, F., Legmann, P., Dousset, B., Bertagna, X., Bertherat, J., 2006. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 91, 2650–2655.

Alexander, G.L., Thompson, G.B., Schwartz, D.A., 2000. Primary aldosteronism in a patient with familial adenomatous polyposis, Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic 75, 636–637.

Allolio, B., Hahner, S., Weismann, D., Fassnacht, M., 2004. Management of adrenocortical carcinoma. Clin. Endocrinol. 60, 273–287.

Almeida, M.Q., Muchow, M., Boikos, S., Bauer, A.J., Griffin, K.J., Tsang, K.M., Cheadle, C., Watkins, T., Wen, F., Starost, M.F., Bossis, I., Nesterova, M., Stratakis, C.A., 2010. Mouse Prkar1a haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the Trp53+/− or Rb1+/− backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. Hum. Mol. Genet. 19, 1387–1398.

Almeida, M.Q., Stratakis, C.A., 2010. Solid tumors associated with multiple endocrine neoplasias. Cancer Genet Cytogenet. 203, 30–36.

Andrade Filho, P.A., Letra, A., Cramer, A., Prasad, J.L., Garlet, G.P., Vieira, A.R., Ferris, R.L., Menezes, R., 2011. Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer. J. Dent. Res. 90, 740–746.

Assie, G., Louiset, E., Sturm, N., Rene-Corail, F., Groussin, L., Bertherat, J., Thomas, M., Lefebvre, H., Feige, J.J., Clauser, E., Chabre, O., Cherradi, N., 2010. Systematic analysis of G protein-coupled receptor gene expression in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia identifies novel targets for pharmacological control of adrenal Cushing's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, E253–E262.

Azevedo, M.F. and Stratakis, C.A., 2011. The transcriptome that mediates increased cAMP signaling in PRKAR1A defects and other settings, Endocr Pract. 1–19.

Balogh, K., Patocs, A., Hunyady, L., Racz, K., 2010. Menin dynamics and functional insight: take your partners. Molec. Cell. Endocrinol. 326, 80–84.

Barrantes Idel, B., Montero-Pedrazuela, A., Guadano-Ferraz, A., Obregon, M.J., Martinez de Mena, R., Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Franz, T.J., Kalaydjiev, S., Klempt, M., Holter, S., Rathkolb, B., Reinhard, C., Morreale de Escobar, G., Bernal, J., Busch, D.H., Wurst, W., Wolf, E., Schulz, H., Shtrom, S., Greiner, E., Hrabe de Angelis, M., Westphal, H., Niehrs, C., 2006. Generation and characterization of dickkopf3 mutant mice. Mol. Cell Biol. 26, 2317–2326.

Beckers, S., Abs, R., Willems, P.J., van der Auwera, B., Kovacs, K., Reznik, M., Stevenaert, A., 1992. Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus, J. Clin. Endocrinol. Metab. 75, 564–570.

Bernichtein, S., Petretto, E., Jamieson, S., Goel, A., Aitman, T.J., Mangion, J.M., Huhtaniemi, I.T., 2008. Adrenal gland tumorigenesis after gonadectomy in mice is a complex genetic trait driven by epistatic loci. Endocrinology 149, 651–661.

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., 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, 5308–5319.

Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrancois-Martinez, A.M., Martinez, A., Val, P., 2010. Constitutive {beta}-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Hum. Mol. Genet. 19, 1561–1576.

Bertolino, P., Tong, W.M., Galendo, D., Wang, Z.Q., Zhang, C.X., 2003. Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. Molec. Endocrinol. 17, 1880–1892.

Beuschlein, F., Reincke, M., Koniger, M., D'Orazio, D., Dobbie, Z., Rump, L.C., 2000. Cortisol producing adrenal adenoma – a new manifestation of Gardner's syndrome. Endocr. Res. 26, 783–790.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R., 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. Nature 382, 225–230.

Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libe, R., Rene-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.C., Groussin, L., Bertagna, X., Dousset, B., Bertherat, J., Tissier, F., 2011. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 96, E419–E426.

Bossis, I., Stratakis, C.A., 2004. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. Endocrinology 145, 5452–5458.

Bourdeau, I., Antonini, S.R., Lacroix, A., Kirschner, L.S., Matyakhina, L., Lorang, D., Libutti, S.K., Stratakis, C.A., 2004. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. Oncogene 23, 1575–1585.

Bourdeau, I., Matyakhina, L., Stergiopoulos, S.G., Sandrini, F., Boikos, S., Stratakis, C.A., 2006. 17q22–24 chromosomal losses and alterations of protein kinase a subunit expression and activity in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 91, 3626–3632.

Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. J. Cell Sci. 121, 737–746.

Cao, Y., Liu, R., Jiang, X., Lu, J., Jiang, J., Zhang, C., Li, X., Ning, G., 2009. Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin. Mol. Cell Biol. 29, 5477–5487.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., Bejsovec, A., 1998. *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. Nature 395, 604–608.

Chelaifa, K., Bouzaidi, K., Chouaib, S., Azaiz, O., Messaoud, M.B., Slim, R., 2003. Adrenal adenoma in a patient with Gardner's syndrome. A case report. Acta Radiol. 44, 158–159.

Chen, M., Hornsby, P.J., 2006. Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. Horm. Metab. Res. 38, 549–555.
Christov, M., Koren, S., Yuan, Q., Baron, R., Lanske, B., 2011. Genetic ablation of sfrp4 in mice does not affect serum phosphate homeostasis. Endocrinology 152, 2031–2036.
Costa, S.C., Nascimento, L.S., Ferreira, F.J., Mattos, P.S., Camara-Lopes, L.H. and Ward, L.S., 2001. Lack of mutations of exon 2 of the MEN1 gene in endocrine and nonendocrine sporadic tumors, Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica [et al.]. 34, 86.
Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B.A., 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378, 785–789.
Dackiw, A.P., Lee, J.E., Gagel, R.F., Evans, D.B., 2001. Adrenal cortical carcinoma. World J. Surg. 25, 914–926.
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., 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, 1819–1829.
de Reynies, A., Assie, G., Rickman, D.S., Tissier, F., Groussin, L., Rene-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E., Bertherat, J., 2009. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. J. Clin. Oncol. 27, 1108–1115.
Devic, A.B.M., 1912. Un cas de polypose adénomateuse: Generalitée à tout l'intestion. Arch. Mal. Appar. Dig. 6, 278–289.
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., Hung, M.C., 2005. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. Mol Cell. 19, 159–170.
Ding, V.M., Ling, L., Natarajan, S., Yap, M.G., Cool, S.M., Choo, A.B., 2010. FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. J. Cell Physiol. 225, 417–428.
Doghman, M., Cazareth, J., Lalli, E., 2008. The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115–584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 3222–3225.
Eastman, Q., Grosschedl, R., 1999. Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. Curr. Opin. Biol. 11, 233–240.
Fang, D., Hawke, D., Zheng, Y., Xia, Y., Meisenhelder, J., Nika, H., Mills, G.B., Kobayashi, R., Hunter, T., Lu, Z., 2007. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. J. Biol. Chem. 282, 11221–11229.
Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast Jr., R.C., Woodgett, J.R., Mills, G.B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97, 11960–11965.
Frame, S., Cohen, P., 2001. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. Biochem. J. 359, 1–16.
Gaujoux, S., Tissier, F., Groussin, L., Libe, R., Ragazzon, B., Launay, P., Audebourg, A., Dousset, B., Bertagna, X., Bertherat, J., 2008. Wnt/beta-catenin and 3′,5′-cyclic adenosine 5′-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 4135–4140.
Gaujoux, S., Pinson, S., Gimenez-Roqueplo, A.P., Amar, L., Ragazzon, B., Launay, P., Meatchi, T., Libe, R., Bertagna, X., Audebourg, A., Zucman-Rossi, J., Tissier, F., Bertherat, J., 2010. Inactivation of the APC gene is constant in adrenocortical tumors from patients with familial adenomatous polyposis but not frequent in sporadic adrenocortical cancers. Clin. Cancer Res. 16, 5133–5141.
Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libe, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiera, S., Vacher-Lavenu, M.C., Dousset, B., Bertagna, X., Allolio, B., Bertherat, J., Tissier, F., 2011. Beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. Clin. Cancer Res. 17, 328–336.
Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., Plouin, P.F., Luton, J.P., Le Bouc, Y., 2001. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. Cancer Res. 61, 6762–6767.
Gicquel, C., Raffin-Sanson, M., Gaston, V., Bertagna, X., Plouin, P.F., Schlumberger, M., Louvel, M., Luton, J.P., Le Bouc, Y., 1997. 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, 2559–2565.
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.G., Hanash, S., 2003. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. Am. J. Pathol. 162, 521–531.
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., Bertherat, J., 2002. 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, 1433–1442.
Groussin, L., Bertherat, J., Gicquel, C., le Bouc, Y., Bertagna, X., 2007. Insights into the molecular biology of adrenocortical tumors, Experimental and clinical endocrinology & diabetes: official journal, German Society of Endocrinology [and]. German Diabet. Assoc. 115, 175–178.
Grumbach, M.M., Biller, B.M., Braunstein, G.D., Campbell, K.K., Carney, J.A., Godley, P.A., Harris, E.L., Lee, J.K., Oertel, Y.C., Posner, M.C., Schlechte, J.A., Wieand, H.S., 2003. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). Ann. Intern. Med. 138, 424–429.
Hagen, T., Vidal-Puig, A., 2002. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. Biochem. Biophys. Res. Commun. 294, 324–328.
Heikkila, M., Peltoketo, H., Leppaluoto, J., Ilves, M., Vuolteenaho, O., Vainio, S., 2002. Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. Endocrinology 143, 4358–4365.
Herman, J.G., Baylin, S.B., 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. N. Engl. J. Med. 349, 2042–2054.
Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K.I., 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, 9063–9072.
Horvath, A., Boikos, S., Giatzakis, C., Robinson-White, A., Groussin, L., Griffin, K.J., Stein, E., Levine, E., Delimpasi, G., Hsiao, H.P., Keil, M., Heyerdahl, S., Matyakhina, L., Libe, R., Fratticci, A., Kirschner, L.S., Cramer, K., Gaillard, R.C., Bertagna, X., Carney, J.A., Bertherat, J., Bossis, I., Stratakis, C.A., 2006a. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. Nat. Genet. 38, 794–800.
Horvath, A., Mathyakina, L., Vong, Q., Baxendale, V., Pang, A.L., Chan, W.Y., Stratakis, C.A., 2006b. Serial analysis of gene expression in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 91, 584–596.
Horvath, A., Bossis, I., Giatzakis, C., Levine, E., Weinberg, F., Meoli, E., Robinson-White, A., Siegel, J., Soni, P., Groussin, L., Matyakhina, L., Verma, S., Remmers, E., Nesterova, M., Carney, J.A., Bertherat, J., Stratakis, C.A., 2008. Large deletions of the PRKAR1A gene in Carney complex. Clin. Cancer Res. 14, 388–395.
Iliopoulos, D., Bimpaki, E.I., Nesterova, M., Stratakis, C.A., 2009. MicroRNA signature of primary pigmented nodular adrenocortical disease: clinical correlations and regulation of Wnt signaling. Cancer Res. 69, 3278–3282.
Kartheuser, A., Walon, C., West, S., Breukel, C., Detry, R., Gribomont, A.C., Hamzehloei, T., Hoang, P., Maiter, D., Pringot, J., Rahier, J., Khan, P.M., Curtis, A., Burn, J., Fodde, R., Verellen-Dumoulin, C., 1999. Familial adenomatous polyposis associated with multiple adrenal adenomas in a patient with a rare 3′ APC mutation. J. Med. Genetics 36, 65–67.
Kikuchi, A., 2003. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. Cancer Sci. 94, 225–229.
Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., Hammer, G.D., 2008. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. Development 135, 2593–2602.
King, P., Paul, A., Laufer, E., 2009. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 21185–21190.
Kirschner, L.S., Carney, J.A., Pack, S.D., Taymans, S.E., Giatzakis, C., Cho, Y.S., Cho-Chung, Y.S., 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, 89–92.
Kuulasmaa, T., Jaaskelainen, J., Suppola, S., Pietilainen, T., Heikkila, P., Aaltomaa, S., Kosma, V.M., Voutilainen, R., 2008. WNT-4 mRNA expression in human adrenocortical tumors and cultured adrenal cells. Horm. Metab. Res. 40, 668–673.
Lacroix, A., Bourdeau, I., Lampron, A., Mazzuco, T.L., Tremblay, J., Hamet, P., 2010. Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. Clin. Endocrinol. (Oxf). 73, 1–15.
Lako, M., Strachan, T., Bullen, P., Wilson, D.I., Robson, S.C., Lindsay, S., 1998. Isolation, characterisation and embryonic expression of WNT11, a gene which maps to 11q13.5 and has possible roles in the development of skeleton, kidney and lung. Gene 219, 101–110.
Lee, E.J., Jo, M., Rho, S.B., Park, K., Yoo, Y.N., Park, J., Chae, M., Zhang, W., Lee, J.H., 2009. Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin. Int. J. Cancer 124, 287–297.
Libe, R., Bertherat, J., 2005. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. Eur. J. Endocrinol. 153, 477–487.
Libe, R., Fratticci, A., Bertherat, J., 2007. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. Endocr. Relat. Cancer 14, 13–28.
Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X., 2002. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell 108, 837–847.
Luton, J.P., Cerdas, S., Billaud, L., Guilhaume, B., Bertagna, X., Laudat, M.H., Louvel, A., Chapuis, Y., Blondeau, P., 1990. Clinical features of adrenal carcinoma, prognostic factors. And the effect of mitotane therapy. N. Engl. J. Med. 322, 1195–1201.
Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z.U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M., Sprecher, E., 2008. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. Am. J. Hum. Genet. 82, 39–47.
Marchesa, P., Fazio, V.W., Church, J.M., McGannon, E., 1997. Adrenal masses in patients with familial adenomatous polyposis. Dis. Colon Rectum 40, 1023–1028.
Maye, P., Zheng, J., Li, L., Wu, D., 2004. Multiple mechanisms for Wnt11-mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. J. Biol. Chem. 279, 24659–24665.

Mizobuchi, Y., Matsuzaki, K., Kuwayama, K., Kitazato, K., Mure, H., Kageji, T., Nagahiro, S., 2008. REIC/Dkk-3 induces cell death in human malignant glioma. Neurol. Oncol. 10, 244–253.
Morali, O.G., Delmas, V., Moore, R., Jeanney, C., Thiery, J.P., Larue, L., 2001. IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition. Oncogene 20, 4942–4950.
Nakamura, R.E., Hunter, D.D., Yi, H., Brunken, W.J., Hackam, A.S., 2007. Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina. BMC Cell Biol. 8, 52.
Nakamura, R.E., Hackam, A.S., 2010. Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors. Growth Factors 28, 232–242.
Naylor, E.W., Gardner, E.J., 1981. Adrenal adenomas in a patient with Gardner's syndrome. Clin. Genet. 20, 67–73.
Ng, L., Libertino, J.M., 2003. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. J. Urol. 169, 5–11.
Niehrs, C., 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. Oncogene 25, 7469–7481.
Orth, D.N., Kovacs, N.J., 1998. The adrenal cortex. In: Wilson, J. et al. (Eds.), Williams Text book of Endocrinology, ninth ed. WB Saunders Company, Philadelphia, pp. 517–664.
Ozuner, G., Hull, T.L., 1999. Familial desmoids in association with adrenal and ovarian masses and leiomyomas: report of three cases. Dis. Colon Rectum 42, 529–532.
Painter, T.A., Jagelman, D.G., 1985. Adrenal adenomas and adrenal carcinomas in association with hereditary adenomatosis of the colon and rectum. Cancer 55, 2001–2004.
Pines Corrales, P.J., Gonzalez-Albarran, O., Peralta, M., Roa, C., Anton, T., 2006. Clinically inapparent adrenal mass in a patient with familial adenomatous polyposis. Horm. Res. 66, 207–210.
Ragazzon, B., Libe, R., Gaujoux, S., Assie, G., Fratticci, A., Launay, P., Clauser, E., Bertagna, X., Tissier, F., de Reynies, A., Bertherat, J., 2010. Transcriptome analysis reveals that p53 and {beta}-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. Cancer Res. 70, 8276–8281.
Railo, A., Nagy, I.I., Kilpelainen, P., Vainio, S., 2008. Wnt-11 signaling leads to down-regulation of the Wnt/beta-catenin, JNK/AP-1 and NF-kappaB pathways and promotes viability in the CHO-K1 cells. Exp. Cell Res. 314, 2389–2399.
Sahut-Barnola, I., de Joussineau, C., Val, P., Lambert-Langlais, S., Damon, C., Lefrancois Martinez, A.M., Pointud, J.C., Marceau, G., Sapin, V., Tissier, F., Ragazzon, B., Bertherat, J., Kirschner, L.S., Stratakis, C.A., Martinez, A., 2010. Cushing's syndrome and foetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. PloS Genet. 6, e1000980.
Sawyer, E.J., Hanby, A.M., Poulsom, R., Jeffery, R., Gillett, C.E., Ellis, I.O., Ellis, P., 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, 627–632.
Schulte, K.M., Heinze, M., Mengel, M., Simon, D., Scheuring, S., Kohrer, K., Roher, H.D., 1999. MEN I gene mutations in sporadic adrenal adenomas. Hum. Genet. 105, 603–610.
Schulte, K.M., Mengel, M., Heinze, M., Simon, D., Scheuring, S., Kohrer, K., Roher, H.D., 2000. Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN I gene in adrenal cancer. J. Clin. Endocrinol. Metab. 85, 441–448.
Silva-Vargas, V., Lo Celso, C., Giangreco, A., Ofstad, T., Prowse, D.M., Braun, K.M., Watt, F.M., 2005. Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. Dev. Cell. 9, 121–131.
Smith, T.G., Clark, S.K., Katz, D.E., Reznek, R.H., Phillips, R.K., 2000. Adrenal masses are associated with familial adenomatous polyposis. Dis. Colon Rectum 43, 1739–1742.
Suwa, T., Chen, M., Hawks, C.L., Hornsby, P.J., 2003. Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. J. Endocrinol. 178, 149–158.
Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Chen, W.D., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., Toyota, M., Tokino, T., Hinoda, Y., Imai, K., Herman, J.G., Baylin, S.B., 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. Nat. Genet. 36, 417–422.
Suzuki, K., Yamaguchi, Y., Villacorte, M., Mihara, K., Akiyama, M., Shimizu, H., Taketo, M.M., Nakagata, N., Tsukiyama, T., Yamaguchi, T.P., Birchmeier, W., Kato, S., Yamada, G., 2009. Embryonic hair follicle fate change by augmented beta-catenin through Shh and Bmp signaling. Development 136, 367–372.
Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., Bourdeau, I., 2008a. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. Clin. Endocrinol. 68, 264–270.
Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., Horvath, A., Stratakis, C.A., Bourdeau, I., 2008b. Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. Clin. Endocrinol. (Oxf.). 69, 367–373.
Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., Dulin, N.O., 2006. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. J. Biol. Chem. 281, 9971–9976.
Taurin, S., Hogarth, K., Sandbo, N., Yau, D.M., Dulin, N.O., 2007. Gbetagamma-mediated prostacyclin production and cAMP-dependent protein kinase activation by endothelin-1 promotes vascular smooth muscle cell hypertrophy through inhibition of glycogen synthase kinase-3. J. Biol. Chem. 282, 19518–19525.
Taurin, S., Sandbo, N., Yau, D.M., Sethakorn, N., Dulin, N.O., 2008. Phosphorylation of beta-catenin by PKA promotes ATP-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 294, C1169–C1174.
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., 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, 7622–7627.
Toyama, T., Lee, H.C., Koga, H., Wands, J.R., Kim, M., 2010. Noncanonical Wnt11 inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. Mol. Cancer Res. 8, 254–265.
Trevant, B., Gaur, T., Hussain, S., Symons, J., Komm, B.S., Bodine, P.V., Stein, G.S., Lian, J.B., 2008. Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. J. Cell Physiol. 217, 113–126.
Ugolini, F., Adelaide, J., Charafe-Jauffret, E., Nguyen, C., Jacquemier, J., Jordan, B., Birnbaum, D., Pebusque, M.J., 1999. Differential expression assay of chromosome arm 8p genes identifies Frizzled-related (FRP1/FRZB) and Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) as candidate breast cancer genes. Oncogene 18, 1903–1910.
Uysal-Onganer, P., Kawano, Y., Caro, M., Walker, M.M., Diez, S., Darrington, R.S., Waxman, J., Kypta, R.M., 2010. Wnt-11 promotes neuroendocrine-like differentiation, survival and migration of prostate cancer cells. Mol. Cancer 9, 55.
Verras, M., Sun, Z., 2005. Beta-catenin is involved in insulin-like growth factor 1-mediated transactivation of the androgen receptor. Mol. Endocrinol. 19, 391–398.
Wajchenberg, B.L., Albergaria Pereira, M.A., Medonca, B.B., Latronico, A.C., Campos Carneiro, P., Alves, V.A., Zerbini, M.C., Liberman, B., Carlos Gomes, G., Kirschner, M.A., 2000. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. Cancer 88, 711–736.
Wakatsuki, S., Sasano, H., Matsui, T., Nagashima, K., Toyota, T., Horii, A., 1998. Adrenocortical tumor in a patient with familial adenomatous polyposis: a case associated with a complete inactivating mutation of the APC gene and unusual histological features. Hum. Pathol. 29, 302–306.
Yamakita, N., Murai, T., Ito, Y., Miura, K., Ikeda, T., Miyamoto, K., Onami, S., Yoshida, T., 1997. Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia associated with multiple colon adenomas/carcinomas which showed a point mutation in the APC gene. Intern. Med. 36, 536–542.
Yang, S.H., Andl, T., Grachtchouk, V., Wang, A., Liu, J., Syu, L.J., Ferris, J., Wang, T.S., Glick, A.B., Millar, S.E., Dlugosz, A.A., 2008. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling. Nat. Genet. 40, 1130–1135.
Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J., Moon, R.T., 1996. A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. Curr. Biol. CB. 6, 1302–1306.
You, A., Fokas, E., Wang, L.F., He, H., Kleb, B., Niederacher, D., Engenhart-Cabillic, R., An, H.X., 2011. Expression of the Wnt antagonist DKK3 is frequently suppressed in sporadic epithelial ovarian cancer. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137, 621–627.
Zhu, H., Mazor, M., Kawano, Y., Walker, M.M., Leung, H.Y., Armstrong, K., Waxman, J., Kypta, R.M., 2004. Analysis of Wnt gene expression in prostate cancer: mutual inhibition by WNT11 and the androgen receptor. Cancer Res. 64, 7918–7926.
Zi, X., Guo, Y., Simoneau, A.R., Hope, C., Xie, J., Holcombe, R.F., Hoang, B.H., 2005. Expression of Frzb/secreted Frizzled-related protein 3, a secreted Wnt antagonist, in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells suppresses tumor growth and cellular invasiveness. Cancer Res. 65, 9762–9770.
Zwermann, O., Beuschlein, F., Mora, P., Weber, G., Allolio, B., Reincke, M., 2000. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene expression is normal in sporadic adrenocortical tumors. Eur. J. Endocr./Eur. Fed. Endocr. Soc. 142, 689–695.

Article 5 :

Adrenocortical cancer and IGF2: is the game over or our experimental models limited?

Drelon C., Berthon A., Val P.

JCEM. Sous presse

Adrenocortical cancer and IGF2:

is the game over or our experimental models limited?

Coralie Drelon[1,2,3], Annabel Berthon[1,2,3] and Pierre VAL[1,2,3*]

[1]Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, F-63012 Clermont-Ferrand Cedex 1, [2]CNRS, UMR 6293, GReD, F-63171 Aubière Cedex, [3]Inserm, U1103, GReD, F-63171 Aubière Cedex

Abbreviated title: IGF2 in adrenocortical cancer

Key terms: adrenocortical carcinoma, IGF2, WNT/beta-catenin

Word count: 1426

***Corresponding author:** pierre.val@univ-bpclermont.fr; Dr Pierre VAL UMR 6293 GReD, 24 avenue des Landais, 63171 Aubière CEDEX FRANCE; Tel: +33 4 7340 7412; Fax: +33 4 7340 7042.

Reprint requests should be sent to: Dr Pierre VAL UMR 6293 GReD, 24 avenue des Landais, 63171 Aubière CEDEX FRANCE

Financial Support: Our research is supported by Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de La Santé et de la Recherche Médicale, Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, grant #SFI 20101201397) and La Ligue Régionale Contre le Cancer, Allier Committee.

Disclosure Statement

The authors have nothing to disclose

Adrenocortical cancer (ACC) is a rare (0.5-2 cases per million per year) but aggressive disease with low survival rates of 16 to 47% depending on the clinical series (Gicquel et al., 1997; Mannelli, 2012). Although mitotane alone or in combination with chemotherapy can improve patients' survival, there is no efficient treatment of metastatic ACC, which is found in almost half of the patients at diagnosis. Identification of the molecular underpinnings of ACC may open the way to targeted therapy of this aggressive cancer. Over the last 20 years, considerable concerted effort has led to the identification of molecular alterations in patients' samples that may drive the tumorigenic process. One of the breakthroughs in this long process was the discovery by Gicquel and collaborators in 1994 that the growth factor IGF2 was markedly overexpressed in about 80-90% of adrenocortical carcinomas compared with adenomas or healthy adrenals (1). This seminal report was followed by a number of larger-scale studies that confirmed that IGF2 was the most up-regulated gene in ACC. These studies also showed overexpression of the IGF2 and IGF1 receptor IGF1R and of one IGF binding protein, IGFBP2 in adrenal carcinomas (reviewed in (2)).

IGF2 is a growth factor that signals through the MAPK and PI3K pathways, which stimulate proliferation and inhibit

apoptosis in a number of cell types. IGF2 is expressed from the paternal allele at the maternally imprinted 11p15 locus. A possible involvement of IGF2 in adrenal tumorigenesis was initially postulated because of the presence of adrenocortical adenomas and carcinomas in patients with Beckwith-Wiedmann syndrome (BWS), a disease resulting from structural alterations at 11p15 that cause overexpression of IGF2 and deregulation of other genes in the locus (reviewed in (3)). In sporadic adrenocortical carcinomas, overexpression of IGF2 is frequently associated with loss of the maternal allele and duplication of the paternal allele, resulting in biallelic expression of the gene (1). Overexpression of IGF2 is a strong independent predictor of shorter disease free survival (4) and immunohistochemistry for IGF2 has been proposed as an efficient diagnostic tool. Consistent with a potential role of IGF2 in adrenal tumorigenesis, inhibition of IGF1R signalling by a tyrosine kinase inhibitor (NVP-AEW541) or a specific blocking antibody (IMC-A12) reduced adrenocortical cancer cell proliferation and tumour formation in nude mice (reviewed in (2)). This suggested that IGF signalling could be an interesting therapeutic target in the context of ACC. However, phase I trials aiming at evaluating the feasibility of IGF1R (Figitumumab and OSI-906) and Insulin Receptor (OSI-906) inhibition in ACC have only shown one partial response by RECIST criteria (OSI-906 protocol) out of a total of 25 patients (5, 6). The observation that some patients displayed stable disease after three months on the two protocols could be considered encouraging. This will have to be further evaluated in light of the ongoing advanced clinical trials.

Although the robust expression of IGF2 in ACC suggests a possible involvement in tumour initiation and / or progression, this is generally accompanied by deregulation of the whole 11p15 locus, which encompasses potential tumour suppressors such as H19 and P57KIP2 and potential oncogenes such as the recently described micro-RNA hsa-miR483. In order to elucidate the specific role of IGF2 in adrenocortical tumorigenesis, our team (7) and Dr Hammer's group (8) have used distinct genetic strategies to induce Igf2 overexpression alone or in combination with constitutive Wnt pathway activation in transgenic mice. We achieved overexpression of Igf2 in the adrenal cortex through the regulatory regions of *Akr1b7* or *CYP11A1*. Both promoters allow expression of transgenes in all steroidogenic cells of the adrenal cortex. Dr Hammer's group used a mouse model in which the endogenous *Igf2/H19* imprinting control region was specifically deleted in some Sf-1 positive cells in the adrenal cortex, which resulted in stochastic biallelic expression of Igf2. These three different genetic models allowed levels of *Igf2* expression ranging from 2 to 87 fold of that found in control mice, which was in the range of *IGF2* overexpression in patients (7-582 fold, (8, 9)). However, there was no adrenal tumour development or even hyperplasia in any of the transgenic models over a time course of 14 months, even though IGF signalling pathway was activated (7, 8). These observations are in line with previous reports in mouse models of BWS and confirm analyses relying on incidental PEPCK-driven overexpression of IGF2 in the adrenal cortex of transgenic mice (10). Interestingly, we showed increased proliferation in the adrenal cortices of IGF2 overexpressing mice, which was in line with the effect of IGF signalling inhibition in human adrenocortical tumour cell lines. However this was not associated with tumour development. Although one can never rule out that interspecies differences might complicate interpretation of the phenotypes, it seems sensible to conclude that IGF2 overexpression can accelerate cell proliferation both in human and mouse adrenocortical cells. However, in contrast with b-catenin (11), it is not sufficient as a single alteration to further

promote adrenocortical cell transformation through acquisition of secondary alterations.

Constitutive Wnt/ßcatenin pathway activation is the second most frequent molecular alteration in adrenal cortex tumours (reviewed in (12)). However, unlike overexpression of IGF2, this alteration is found at similar frequencies in benign (51%, (13)) and malignant (39.2%, (14)) tumours in patients. We have shown that stabilisation of b-catenin by Cre-mediated excision of the third exon of *Ctnnb1* in all steroidogenic cells of the cortex, resulted in adrenal hyperplasia and dysplasia, which progressed towards malignancy in a small subset of animals (11). Using a different genetic scheme relying on Sf-1-mediated deletion of *APC*, a key component of b-catenin destruction complex, Dr Hammer's team confirmed our observations, although tumour progression seemed slower in their model (8). These data showed that in contrast with IGF2, constitutive active b-catenin had the potential to trigger tumour formation in the adrenal cortex, but that secondary events were required to trigger malignant transformation. Our two groups therefore tested the possible cooperation of WNT pathway activation and IGF2 overexpression that are found associated in the most aggressive ACC (reviewed in (15)), by mating the different genetic models. In both studies, the combination of active b-catenin and elevated levels of Igf2 accelerated tumour progression. However, to our surprise the acceleration was mild, even with an almost 30 fold increase in Igf2 expression and over a 14 months time course. Indeed, we showed a significant switch of most 14 month-old tumours from a Weiss score of 0 with activation of b-catenin to 1 and 2 when the two alterations were combined. It was also associated with a mild but significant increase in the proliferation marker *Cyclin D1* and an overall increase in the number of adrenals with a Ki67 labelling index over the 5% malignancy threshold (7). Heaton's analysis essentially yielded the same observations, although their classification did not rely on Weiss scoring of the tumours (8). Strikingly only one overt carcinoma *in situ* with a Weiss score of 3 was diagnosed in each of the two series (7, 8).

Taken together, these *in vivo* experiments demonstrate that isolated overexpression of IGF2 has no oncogenic potential and strongly suggest that it is not a contributor to malignant tumour progression in the adrenal cortex, even when associated with b-catenin activation. This is in agreement with the observation that carcinomas with overexpression of IGF2 are not transcriptionally distinct from carcinomas with low IGF2 expression in whole-genome analyses (15). This strongly suggests that IGF2, as opposed to aberrant b-catenin activation, is not a driving force for the tumorigenic process in the adrenal cortex, in both mouse and human.

Interestingly, a recent report showed that hypomethylation of KCNQ1OT1 in the absence of other epigenetic alterations at the 11p15 locus was associated with sporadic pediatric adrenocortical tumours (Wijnen et al., 2012). This suggests that genes at the 11p15 locus other than IGF2 could play a role in adrenal tumourigenesis. Clearly, future mouse models of adrenocortical tumourigenesis will have to take these alterations into account. This will help determining if IGF2 overexpression in ACC is a passenger hit, resulting from broad epigenetic alterations at 11p15 that target other potential tumour suppressors or oncogenes at the locus.

Eighteen years after its identification as an almost ubiquitous adrenocortical carcinoma marker, IGF2 has not held all of its promises. On the basis of the two recently published reports and bearing in mind the inherent limitations of mouse models, we think that IGF2 is not likely to represent a good therapeutic target in the context of ACC. However, in light of the

tremendous challenges that clinical management of ACC still represent, we hope that the outcome of the ongoing clinical trials will prove us wrong.

Acknowledgements

We thank Dr Antoine Martinez (CNRS UMR 6293 GReD, France) for critically reading this manuscript.

References

1. **Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y** 1994 Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab. 78:1444–1453
2. **Ribeiro TC, Latronico AC** 2012 Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. Mol Cell Endocrinol 351:96–100
3. **Else T** 2012 Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. Mol Cell Endocrinol 351:66–70
4. **Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos J M., Schlumberger M, Plouin P F, Luton J P, Le Bouc Y** 2001 Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. Cancer Res 61:6762–7
5. **Haluska P, Worden F, Olmos D, Yin D, Schteingart D, Batzel G N, Paccagnella M L, de Bono J S, Gualberto A, Hammer GD** 2010 Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. Cancer Chemother Pharmacol 65:765–773
6. **Carden C P, Kim E S, Jones R L, Alam SM, Johnson FM, Stephens AW, Poondru S, Gedrich R, Lippman SM, Kaye SB** 2010 Phase I study of intermittent dosing of OSI-906, a dual tyrosine kinase inhibitor of insulin-like growth factor-1 recptor (IGF-1R) and insulin receptor (IR) in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol 28:suppl; abstr 2530
7. **Drelon C, Berthon A, Ragazzon B, Tissier F, Bandiera R, Sahut-Barnola I, De Joussineau C, Batisse-Lignier M, Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P** 2012 Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. PLoS One **7**, e44171
8. **Heaton J H, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, Fragoso MCBV, Kuick R, Lerario AM, Simon DP, Soares IC, Starnes E, Thomas DG, Latronico AC, Giordano TJ, Hammer GD** 2012Progression to Adrenocortical Tumorigenesis in Mice and Humans through Insulin-Like Growth Factor 2 and β-Catenin. Am J Pathol 181:1017–1033
9. **Gicquel C, Raffin-Sanson M, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP, Le Bouc Y** 1997Structural 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 82:2559–2565
10. **Weber MM, Fottner C, Schmidt P, Brodowski KM, Gittner K, Lahm H, Engelhardt D, Wolf E** 1999 Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. Endocrinology 140: 1537–43
11. **Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A, Val P** 2010 Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Hum Mol Genet 19:1561–1576
12. **Berthon A, Martinez A, Bertherat J, Val P** 2011Wnt/β-catenin signalling

in adrenal physiology and tumour development. Mol Cell Endocrinol 351:87–95

13. **Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, Libe R, Rene-Corail F, Audebourg A, Vacher-Lavenu MC, Groussin L, Bertagna X, Dousset B, Bertherat J, Tissier F** 2011 Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. J Clin Endocrinol Metab 96: E419–26
14. **Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libe R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F.** 2011 beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. Clin Cancer Res 17:328–36
15. **Assie G, Giordano TJ, Bertherat J** 2012 Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. Mol Cell Endocrinol 351:111–117

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. The EMBO Journal *16*, 3797–3804.

Abma, E.M., Kluin, P.M., and Dullaart, R.P.F. (2008). Malignant aldosterone-producing adrenal tumour: reoccurrence with glucocorticoid excess without hyperaldosteronism. The Netherlands Journal of Medicine *66*, 252–255.

Aguilera, G. (2011). HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. Exp. Gerontol. *46*, 90–95.

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*, 19422–19428.

Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrançois-Martinez, A.M., Veyssière, 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*, 147–154.

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. Molecular Endocrinology *15*, 93–111.

Alexander, G.L., Thompson, G.B., and Schwartz, D.A. (2000). Primary aldosteronism in a patient with familial adenomatous polyposis. Mayo Clin. Proc. *75*, 636–637.

Allen, B.L., Song, J.Y., Izzi, L., Althaus, I.W., Kang, J.-S., Charron, F., Krauss, R.S., and McMahon, A.P. (2011). Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. Dev. Cell *20*, 775–787.

Almeida, M.Q., and Stratakis, C.A. (2010). Carney complex and other conditions associated with micronodular adrenal hyperplasias. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *24*, 907–914.

Amar, L., Azizi, M., Menard, J., Peyrard, S., Watson, C., and Plouin, P.-F. (2010). Aldosterone synthase inhibition with LCI699: a proof-of-concept study in patients with primary aldosteronism. Hypertension *56*, 831–838.

Ambroziak, U., Bednarczuk, T., Ginalska-Malinowska, M., Małunowicz, E.M., Grzechocińska, B., Kamiński, P., Bablok, L., Przedlacki, J., and Bar-Andziak, E. (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency - management in adults. Endokrynol Pol *61*, 142–155.

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*, 5415–5426.

Amri, H., Ogwuegbu, S.O., Boujrad, N., Drieu, K., and Papadopoulos, V. (1996). In vivo regulation of peripheral-type benzodiazepine receptor and glucocorticoid synthesis by Ginkgo biloba extract EGb 761 and isolated ginkgolides. Endocrinology *137*, 5707–5718.

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*, 32656–32662.

Assie, G., Giordano, T.J., and Bertherat, J. (2012). Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. Mol. Cell. Endocrinol. *351*, 111–117.

Assie, G., Louiset, E., Sturm, N., René-Corail, F., Groussin, L., Bertherat, J., Thomas, M., Lefebvre, H., Feige, J.-J., Clauser, E., et al. (2010). Systematic analysis of G protein-coupled receptor gene expression in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia identifies novel targets for pharmacological control of adrenal Cushing's syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. *95*, E253–262.

Azizan, E.A.B., Lam, B.Y.H., Newhouse, S.J., Zhou, J., Kuc, R.E., Clarke, J., Happerfield, L., Marker, A., Hoffman, G.J., and Brown, M.J. (2012a). Microarray, qPCR, and KCNJ5 Sequencing of Aldosterone-Producing Adenomas Reveal Differences in Genotype and Phenotype between Zona Glomerulosa- and Zona Fasciculata-Like Tumors. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.

Azizan, E.A.B., Murthy, M., Stowasser, M., Gordon, R., Kowalski, B., Xu, S., Brown, M.J., and O'Shaughnessy, K.M. (2012b). Somatic mutations affecting the selectivity filter of KCNJ5 are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas. Hypertension *59*, 587–591.

Balla, T., Baukal, A.J., Eng, S., and Catt, K.J. (1991). Angiotensin II receptor subtypes and biological responses in the adrenal cortex and medulla. Mol. Pharmacol. *40*, 401–406.

Barlaskar, F.M., Spalding, A.C., Heaton, J.H., Kuick, R., Kim, A.C., Thomas, D.G., Giordano, T.J., Ben-Josef, E., and Hammer, G.D. (2008). Preclinical Targeting of the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor in Adrenocortical Carcinoma. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *94*, 204–212.

Barrett, P.Q., Bollag, W.B., Isales, C.M., McCarthy, R.T., and Rasmussen, H. (1989). Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. Endocr. Rev. *10*, 496–518.

Barzon, L., Masi, G., Fincati, K., Pacenti, M., Pezzi, V., Altavilla, G., Fallo, F., and Palù, G. (2005). Shift from Conn's syndrome to Cushing's syndrome in a recurrent adrenocortical carcinoma. Eur. J. Endocrinol. *153*, 629–636.

Bassett, M.H., Mayhew, B., Rehman, K., White, P.C., Mantero, F., Arnaldi, G., Stewart, P.M., Bujalska, I., and Rainey, W.E. (2005). Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. *90*, 5446–5455.

Bassett, M.H., Suzuki, T., Sasano, H., De Vries, C.J.M., Jimenez, P.T., Carr, B.R., and Rainey, W.E. (2004a). The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. implications for the control of adrenal functional zonation. J. Biol. Chem. *279*, 37622–37630.

Bassett, M.H., White, P.C., and Rainey, W.E. (2004b). A role for the NGFI-B family in adrenal zonation and adrenocortical disease. Endocr. Res. *30*, 567–574.

Bassett, M.H., White, P.C., and Rainey, W.E. (2004c). The regulation of aldosterone synthase expression. Mol. Cell. Endocrinol. *217*, 67–74.

Bassett, M.H., Zhang, Y., White, P.C., and Rainey, W.E. (2000). Regulation of human CYP11B2 and CYP11B1: comparing the role of the common CRE/Ad1 element. Endocr. Res. *26*, 941–951.

Batarseh, A., Giatzakis, C., and Papadopoulos, V. (2008). Phorbol-12-myristate 13-acetate acting through protein kinase Cepsilon induces translocator protein (18-kDa) TSPO gene expression. Biochemistry *47*, 12886–12899.

Begeot, M., Langlois, D., Penhoat, A., and Saez, J.M. (1988). Variations in guanine-binding proteins (Gs, Gi) in cultured bovine adrenal cells. Consequences on the effects of phorbol ester and angiotensin II on adrenocorticotropin-induced and cholera-toxin-induced cAMP production. Eur. J. Biochem. *174*, 317–321.

Ben Charfeddine, I., Riepe, F.G., Kahloul, N., Kulle, A.E., Adala, L., Mamaï, O., Amara, A., Mili, A., Amri, F., Saad, A., et al. (2012). Two novel CYP11B1 mutations in congenital adrenal hyperplasia due to steroid 11β hydroxylase deficiency in a Tunisian family. Gen. Comp. Endocrinol. *175*, 514–518.

Beom, S.H., Lee, K.-W., Yang, Y., Choi, Y., Song, K.-H., Kim, Y.J., Kim, J.H., Bang, S.-M., Chung, J.-H., and Lee, J.S. (2011). Metastatic adrenocortical carcinoma presenting simultaneously with Cushing's and Conn's syndromes: a case report. Jpn. J. Clin. Oncol. *41*, 1287–1291.

Bergsma, D.J., Ellis, C., Kumar, C., Nuthulaganti, P., Kersten, H., Elshourbagy, N., Griffin, E., Stadel, J.M., and Aiyar, N. (1992). Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *183*, 989–995.

Bernichtein, S., Petretto, E., Jamieson, S., Goel, A., Aitman, T.J., Mangion, J.M., and Huhtaniemi, I.T. (2008). Adrenal Gland Tumorigenesis after Gonadectomy in Mice Is a Complex Genetic Trait Driven by Epistatic Loci. Endocrinology *149*, 651–661.

Bertagna, X., Groussin, L., Luton, J.-P., and Bertherat, J. (2003). Aberrant receptor-mediated Cushing's syndrome. Horm. Res. *59 Suppl 1*, 99–103.

Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J., and Val, P. (2012). Wnt/β-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. Mol. Cell. Endocrinol. *351*, 87–95.

BERTHON, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefran\c cois-Martinez, A.-M., et al. (2010). Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Human Molecular Genetics *19*, 1561–1576.

Betancourt-Calle, S., Calle, R.A., Isales, C.M., White, S., Rasmussen, H., and Bollag, W.B. (2001a). Differential effects of agonists of aldosterone secretion on steroidogenic acute regulatory phosphorylation. Mol. Cell. Endocrinol. *173*, 87–94.

Betancourt-Calle, S., Jung, E.M., White, S., Ray, S., Zheng, X., Calle, R.A., and Bollag, W.B. (2001b). Elevated K(+) induces myristoylated alanine-rich C-kinase substrate phosphorylation and phospholipase D activation in glomerulosa cells. Mol. Cell. Endocrinol. *184*, 65–76.

Beuschlein, F., Looyenga, B.D., Bleasdale, S.E., Mutch, C., Bavers, D.L., Parlow, A.F., Nilson, J.H., and Hammer, G.D. (2003). Activin Induces x-Zone Apoptosis That Inhibits Luteinizing Hormone-Dependent Adrenocortical Tumor Formation in Inhibin-Deficient Mice. Molecular and Cellular Biology *23*, 3951–3964.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. Nature *382*, 225–230.

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*, 1555–1561.

Bird, I.M., Pasquarette, M.M., Rainey, W.E., and Mason, J.I. (1996). Differential control of 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human adrenocortical H295R cells. J. Clin. Endocrinol. Metab. *81*, 2171–2178.

Blair-West, J.R., Coghlan, J.P., Denton, D.A., Fei, D.T., Hardy, K.J., Scoggins, B.A., and Wright, R.D. (1980). A dose-response comparison of the actions of angiotensin II and angiotensin III in sheep. J. Endocrinol. *87*, 409–417.

Blalock, A., and Levy, S.E. (1937). STUDIES ON THE ETIOLOGY OF RENAL HYPERTENSION. Ann. Surg. *106*, 826–847.

Bocian-Sobkowska, J. (2000). Morphometric study of the human suprarenal gland in the first postnatal year. Folia Morphol. (Warsz) *58*, 275–284.

Boland, G.W.L., Blake, M.A., Hahn, P.F., and Mayo-Smith, W.W. (2008). Incidental adrenal lesions: principles, techniques, and algorithms for imaging characterization. Radiology *249*, 756–775.

Bollag, W.B., Barrett, P.Q., Isales, C.M., Liscovitch, M., and Rasmussen, H. (1990). A potential role for phospholipase-D in the angiotensin-II-induced stimulation of aldosterone secretion from bovine adrenal glomerulosa cells. Endocrinology *127*, 1436–1443.

Bollag, W.B., Barrett, P.Q., Isales, C.M., and Rasmussen, H. (1991). Angiotensin-II-induced changes in diacylglycerol levels and their potential role in modulating the steroidogenic response. Endocrinology *128*, 231–241.

Bollag, W.B., Kent, P., White, S., Wilson, M.V., Isales, C.M., and Calle, R.A. (2008). Phorbol ester increases mitochondrial cholesterol content in NCI H295R cells. Mol. Cell. Endocrinol. *296*, 53–57.

Bomback, A.S., and Klemmer, P.J. (2007). The incidence and implications of aldosterone breakthrough. Nature Clinical Practice Nephrology *3*, 486–492.

Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libe, R., Rene-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.-C., et al. (2011). Wnt/ -Catenin Pathway Activation in Adrenocortical Adenomas Is Frequently due to Somatic CTNNB1-Activating Mutations, Which Are Associated with Larger and Nonsecreting Tumors: A Study in Cortisol-Secreting and -Nonsecreting Tumors. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *96*, E419–E426.

Bose, H.S., Lingappa, V.R., and Miller, W.L. (2002a). Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import. Nature *417*, 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*, 295–308.

Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, and Miller, W.L. (1996). The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. N. Engl. J. Med. *335*, 1870–1878.

Boulkroun, S., Beuschlein, F., Rossi, G.-P., Golib-Dzib, J.-F., Fischer, E., Amar, L., Mulatero, P., Samson-Couterie, B., Hahner, S., Quinkler, M., et al. (2012). Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. Hypertension *59*, 592–598.

Boulkroun, S., Samson-Couterie, B., Dzib, J.-F.G., Lefebvre, H., Louiset, E., Amar, L., Plouin, P.-F., Lalli, E., Jeunemaitre, X., Benecke, A., et al. (2010). Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism. Hypertension *56*, 885–892.

Boulkroun, S., Samson-Couterie, B., Golib-Dzib, J.-F., Amar, L., Plouin, P.-F., Sibony, M., Lefebvre, H., Louiset, E., Jeunemaitre, X., Meatchi, T., et al. (2011). Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. Endocrinology *152*, 4753–4763.

Brabletz, S., Schmalhofer, O., and Brabletz, T. (2009). Gastrointestinal stem cells in development and cancer. The Journal of Pathology *217*, 307–317.

Braley, L.M., Menachery, A.I., Brown, E.M., and Williams, G.H. (1986). Comparative effect of angiotensin II, potassium, adrenocorticotropin, and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on

cytosolic calcium in rat adrenal cells. Endocrinology *119*, 1010–1019.

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*, 1–9.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science *232*, 34–47.

Brown, M.S., Kovanen, P.T., and Goldstein, J.L. (1979). Receptor-mediated uptake of lipoprotein-cholesterol and its utilization for steroid synthesis in the adrenal cortex. Recent Prog. Horm. Res. *35*, 215–257.

Bryja, V., Gradl, D., Schambony, A., Arenas, E., and Schulte, G. (2007). Beta-arrestin is a necessary component of Wnt/beta-catenin signaling in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *104*, 6690–6695.

Buchert, M., Athineos, D., Abud, H.E., Burke, Z.D., Faux, M.C., Samuel, M.S., Jarnicki, A.G., Winbanks, C.E., Newton, I.P., Meniel, V.S., et al. (2010). Genetic dissection of differential signaling threshold requirements for the Wnt/beta-catenin pathway in vivo. PLoS Genet. *6*, e1000816.

Buda, A., and Pignatelli, M. (2011). E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis. Cell Commun. Adhes. *18*, 133–143.

Calhoun, D.A., White, W.B., Krum, H., Guo, W., Bermann, G., Trapani, A., Lefkowitz, M.P., and Ménard, J. (2011). Effects of a novel aldosterone synthase inhibitor for treatment of primary hypertension: results of a randomized, double-blind, placebo- and active-controlled phase 2 trial. Circulation *124*, 1945–1955.

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

Capponi, A.M. (2002). Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. Trends Endocrinol. Metab. *13*, 118–121.

Capponi, A.M., Lew, P.D., Jornot, L., and Vallotton, M.B. (1984). Correlation between cytosolic free Ca2+ and aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. Evidence for a difference in the mode of action of angiotensin II and potassium. J. Biol. Chem. *259*, 8863–8869.

Carney, J.A., Young, W.F., and Stratakis, C.A. (2011). Primary bimorphic adrenocortical disease: cause of hypercortisolism in McCune-Albright syndrome. Am. J. Surg. Pathol. *35*, 1311–1326.

Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., and Parker, K.L. (1997). Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *94*, 11540–11545.

Carss, K.J., Stowasser, M., Gordon, R.D., and O'Shaughnessy, K.M. (2011). Further study of chromosome 7p22 to identify the molecular basis of familial hyperaldosteronism type II. J Hum Hypertens *25*, 560–564.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. Nature *395*, 604–608.

Cazabat, L., Ragazzon, B., Groussin, L., and Bertherat, J. (2006). PRKAR1A mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. Pituitary *9*, 211–219.

Cerquetti, L., Bucci, B., Marchese, R., Misiti, S., De Paula, U., Miceli, R., Muleti, A., Amendola, D., Piergrossi, P., Brunetti, E., et al. (2008). Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. Endocrine Related Cancer *15*, 623–634.

Cerquetti, L., Sampaoli, C., Amendola, D., Bucci, B., Misiti, S., Raza, G., De Paula, U., Marchese, R., Brunetti, E., Toscano, V., et al. (2010). Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. Int. J. Oncol. *37*, 493–501.

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*, 8928–8934.

Chang, C.-J., and Hung, M.-C. (2012). The role of EZH2 in tumour progression. Br. J. Cancer *106*, 243–247.

Charmandari, E., Sertedaki, A., Kino, T., Merakou, C., Hoffman, D.A., Hatch, M.M., Hurt, D.E., Lin, L., Xekouki, P., Stratakis, C.A., et al. (2012). A Novel Point Mutation in the KCNJ5 Gene Causing Primary Hyperaldosteronism and Early-Onset Autosomal Dominant Hypertension. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.

Chase, A., and Cross, N.C.P. (2011). Aberrations of EZH2 in cancer. Clin. Cancer Res. *17*, 2613–2618.

Chen, M., and Hornsby, P.J. (2006). Adenovirus-delivered DKK3/WNT4 and steroidogenesis in primary cultures of adrenocortical cells. Horm. Metab. Res. *38*, 549–555.

Cheng, A.S.L., Lau, S.S., Chen, Y., Kondo, Y., Li, M.S., Feng, H., Ching, A.K., Cheung, K.F., Wong, H.K., Tong, J.H., et al. (2011). EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes β-catenin-dependent hepatocarcinogenesis. Cancer Res. *71*, 4028–4039.

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*, 4540–4549.

Cherradi, N., Brandenburger, Y., and Capponi, A.M. (1998). Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. Eur. J. Endocrinol. *139*, 249–256.

Cho, E.-C., Mitton, B., and Sakamoto, K.M. (2011). CREB and leukemogenesis. Crit Rev Oncog *16*, 37–46.

Choi, M., Scholl, U.I., Yue, P., Björklund, P., Zhao, B., Nelson-Williams, C., Ji, W., Cho, Y., Patel, A., Men, C.J., et al. (2011). K+ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. Science *331*, 768–772.

Christov, M., Koren, S., Yuan, Q., Baron, R., and Lanske, B. (2011). Genetic ablation of sfrp4 in mice does not affect serum phosphate homeostasis. Endocrinology *152*, 2031–2036.

Cicala, M.-V., and Mantero, F. (2010). Primary aldosteronism: what consensus for the diagnosis. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *24*, 915–921.

Clark, B.J., Pezzi, V., Stocco, D.M., and Rainey, W.E. (1995). The steroidogenic acute regulatory protein is induced by angiotensin II and K+ in H295R adrenocortical cells. Mol. Cell. Endocrinol. *115*, 215–219.

Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., and Stocco, D.M. (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*, 28314–28322.

Clem, B.F., Hudson, E.A., and Clark, B.J. (2005). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) enhances cAMP-responsive element binding (CREB) protein phosphorylation and phospho-CREB interaction with the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. Endocrinology *146*, 1348–1356.

Clevers, H., and Nusse, R. (2012). Wnt/β-Catenin Signaling and Disease. Cell *149*, 1192–1205.

Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., Romagnolo, B., Berrebi, D., Giovannini, M., and Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. Laboratory Investigation *84*, 1619–1630.

Condon, J.C., Pezzi, V., Drummond, B.M., Yin, S., and Rainey, W.E. (2002). Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. Endocrinology *143*, 3651–3657.

Connelly, M.A., and Williams, D.L. (2003). SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. Trends Endocrinol. Metab. *14*, 467–472.

Connor, J.A., Cornwall, M.C., and Williams, G.H. (1987). Spatially resolved cytosolic calcium response to angiotensin II and potassium in rat glomerulosa cells measured by digital imaging techniques. J. Biol. Chem. *262*, 2919–2927.

Costa, M.H.S., and Lacroix, A. (2007). Cushing's syndrome secondary to ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Arquivos Brasileiros De Endocrinologia e Metabologia *51*, 1226–1237.

Crawford, P.A., Sadovsky, Y., Woodson, K., Lee, S.L., and Milbrandt, J. (1995). Adrenocortical function and regulation of the steroid 21-hydroxylase gene in NGFI-B-deficient mice. Mol. Cell. Biol. *15*, 4331–4316.

Curtin, J.C., and Lorenzi, M.V. (2010). Drug discovery approaches to target Wnt signaling in cancer stem cells. Oncotarget *1*, 563–577.

Davies, L.A., Hu, C., Guagliardo, N.A., Sen, N., Chen, X., Talley, E.M., Carey, R.M., Bayliss, D.A., and Barrett, P.Q. (2008). TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *105*, 2203–2208.

Demura, M., Wang, F., Yoneda, T., Karashima, S., Mori, S., Oe, M., Kometani, M., Sawamura, T., Cheng, Y., Maeda, Y., et al. (2011). Multiple noncoding exons 1 of nuclear receptors NR4A family (nerve growth factor-induced clone B, Nur-related factor 1 and neuron-derived orphan receptor 1) and NR5A1 (steroidogenic factor 1) in human cardiovascular and adrenal tissues. J. Hypertens. *29*, 1185–1195.

Dierks, A., Lichtenauer, U.D., Sackmann, S., Spyroglou, A., Shapiro, I., Geyer, M., Manonopoulou, J., Reincke, M., Hantel, C., and Beuschlein, F. (2010). Identification of adrenal genes regulated in a potassium-dependent manner. J. Mol. Endocrinol. *45*, 193–206.

Dietz, J.D., Du, S., Bolten, C.W., Payne, M.A., Xia, C., Blinn, J.R., Funder, J.W., and Hu, X. (2008). A number of marketed dihydropyridine calcium channel blockers have mineralocorticoid receptor antagonist activity. Hypertension *51*, 742–748.

Dluhy, R.G., Axelrod, L., Underwood, R.H., and Williams, G.H. (1972). Studies of the control of plasma aldosterone concentration in normal man. Journal of Clinical Investigation *51*, 1950–1957.

Doghman, M., Cazareth, J., and Lalli, E. (2008). The T cell factor/ -Catenin Antagonist PKF115-584 Inhibits Proliferation of Adrenocortical Carcinoma Cells. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *93*, 3222–3225.

Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., et al. (2010). Salt-sensitive hypertension in circadian clock–deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. Nature Medicine *16*, 67–74.

Doppman, J.L., Nieman, L.K., Travis, W.D., Miller, D.L., Cutler, G.B., Jr, Chrousos, G.P., and Norton, J.A. (1991). CT and MR imaging of massive macronodular adrenocortical disease: a rare cause of autonomous primary adrenal hypercortisolism. J Comput Assist Tomogr *15*, 773–779.

Dostert, A., and Heinzel, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. Curr. Pharm. Des. *10*, 2807–2816.

Eastman, Q., and Grosschedl, R. (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. Curr. Opin. Cell Biol. *11*, 233–240.

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*, 3128–3142.

Ehrlund, A., Jonsson, P., Vedin, L.-L., Williams, C., Gustafsson, J.-Å., and Treuter, E. (2012). Knockdown of SF-1 and RNF31 affects components of steroidogenesis, TGFβ, and Wnt/β-catenin signaling in adrenocortical carcinoma cells. PLoS ONE *7*, e32080.

El Wakil, A., Bandulik, S., Guy, N., Bendahhou, S., Zennaro, M.-C., Niehrs, C., Mari, B., Warth, R., Barhanin, J., and Lalli, E. (2012). Dkk3 is a component of the genetic circuitry regulating aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex. Hum. Mol. Genet.

El Wakil, A., and Lalli, E. (2011). The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. Mol. Cell. Endocrinol. *332*, 32–37.

Fagugli, R.M., and Taglioni, C. (2011). Changes in the perceived epidemiology of primary hyperaldosteronism. Int J Hypertens *2011*, 162804.

Farese, R.V., Larson, R.E., Sabir, M.A., and Gomez-Sanchez, C. (1981). Effects of angiotensin-II and potassium on phospholipid metabolism in the adrenal zona glomerulosa. J. Biol. Chem. *256*, 11093–11097.

Farquharson, C.A.J., and Struthers, A.D. (2002). Increasing plasma potassium with amiloride shortens the QT interval and reduces ventricular extrasystoles but does not change endothelial function or heart rate variability in chronic heart failure. Heart *88*, 475–480.

Fassnacht, M., and Allolio, B. (2009). Clinical management of adrenocortical carcinoma. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *23*, 273–289.

Fernandez, P.M., Brunel, F., Jimenez, M.A., Saez, J.M., Cereghini, S., and Zakin, M.M. (2000). Nuclear receptors Nor1 and NGFI-B/Nur77 play similar, albeit distinct, roles in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Endocrinology *141*, 2392–2400.

Fleury, A., Mathieu, A.P., Ducharme, L., Hales, D.B., and LeHoux, J.-G. (2004). Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). J. Steroid

Biochem. Mol. Biol. *91*, 259–271.

de Fraipont, F., El Atifi, M., Cherradi, N., Le Moigne, G., Defaye, G., Houlgatte, R., Bertherat, J., Bertagna, X., Plouin, P.-F., Baudin, E., et al. (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*, 1819–1829.

Fuchs, M., Hafer, A., Münch, C., Kannenberg, F., Teichmann, S., Scheibner, J., Stange, E.F., and Seedorf, U. (2001). Disruption of the sterol carrier protein 2 gene in mice impairs biliary lipid and hepatic cholesterol metabolism. J. Biol. Chem. *276*, 48058–48065.

Fuchs-Hammoser, R., Schweiger, M., and Oelkers, W. (1980). The effect of chronic low-dose infusion of ACTH (1-24) on renin, renin-substrate, aldosterone and other corticosteroids in sodium replete and deplete man. Acta Endocrinol. *95*, 198–206.

Fujii, M., Katase, N., Lefeuvre, M., Gunduz, M., Buery, R.R., Tamamura, R., Tsujigiwa, H., and Nagatsuka, H. (2011). Dickkopf (Dkk)-3 and β-catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma. J. Mol. Histol. *42*, 499–504.

Funder, J.W., Carey, R.M., Fardella, C., Gomez-Sanchez, C.E., Mantero, F., Stowasser, M., Young, W.F., Jr, and Montori, V.M. (2008). Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. J. Clin. Endocrinol. Metab. *93*, 3266–3281.

Furlan, R., Barbic, F., Piazza, S., Tinelli, M., Seghizzi, P., and Malliani, A. (2000). Modifications of cardiac autonomic profile associated with a shift schedule of work. Circulation *102*, 1912–1916.

Gallegos, A.M., Atshaves, B.P., Storey, S.M., Starodub, O., Petrescu, A.D., Huang, H., McIntosh, A.L., Martin, G.G., Chao, H., Kier, A.B., et al. (2001). Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. Prog. Lipid Res. *40*, 498–563.

Gallo-Payet, N., Grazzini, E., Côté, M., Chouinard, L., Chorvátová, A., Bilodeau, L., Payet, M.D., and Guillon, G. (1996). Role of Ca2+ in the action of adrenocorticotropin in cultured human adrenal glomerulosa cells. J. Clin. Invest. *98*, 460–466.

Gambaryan, S., Butt, E., Tas, P., Smolenski, A., Allolio, B., and Walter, U. (2006). Regulation of aldosterone production from zona glomerulosa cells by ANG II and cAMP: evidence for PKA-independent activation of CaMK by cAMP. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. *290*, E423–433.

Garber, K. (2009). Drugging the Wnt Pathway: Problems And Progress. JNCI J Natl Cancer Inst *101*, 548–550.

de Gasparo, M., Joss, U., Ramjoué, H.P., Whitebread, S.E., Haenni, H., Schenkel, L., Kraehenbuehl, C., Biollaz, M., Grob, J., and Schmidlin, J. (1987). Three new epoxy-spirolactone derivatives: characterization in vivo and in vitro. J. Pharmacol. Exp. Ther. *240*, 650–656.

Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libe, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiera, S., et al. (2011). -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. Clinical Cancer Research *17*, 328–336.

Gaujoux, S., Pinson, S., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Amar, L., Ragazzon, B., Launay, P., Meatchi, T., Libe, R., Bertagna, X., Audebourg, A., et al. (2010). Inactivation of the APC Gene Is Constant in Adrenocortical Tumors from Patients with Familial Adenomatous Polyposis but Not Frequent in Sporadic Adrenocortical Cancers. Clinical Cancer Research *16*, 5133–5141.

Gaujoux, S., Tissier, F., Groussin, L., Libe, R., Ragazzon, B., Launay, P., Audebourg, A., Dousset, B.,

Bertagna, X., and Bertherat, J. (2008). Wnt/ -Catenin and 3',5'-Cyclic Adenosine 5'-Monophosphate/Protein Kinase A Signaling Pathways Alterations and Somatic -Catenin Gene Mutations in the Progression of Adrenocortical Tumors. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *93*, 4135–4140.

Gavish, M., Bachman, I., Shoukrun, R., Katz, Y., Veenman, L., Weisinger, G., and Weizman, A. (1999). Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. Pharmacol. Rev. *51*, 629–650.

Geller, D.S., Zhang, J., Wisgerhof, M.V., Shackleton, C., Kashgarian, M., and Lifton, R.P. (2008). A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. J. Clin. Endocrinol. Metab. *93*, 3117–3123.

Ghayee, H.K., Rege, J., Watumull, L.M., Nwariaku, F.E., Carrick, K.S., Rainey, W.E., Miller, W.L., and Auchus, R.J. (2011). Clinical, biochemical, and molecular characterization of macronodular adrenocortical hyperplasia of the zona reticularis: a new syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, E243–250.

Gibbons, G.H., Dzau, V.J., Farhi, E.R., and Barger, A.C. (1984). Interaction of signals influencing renin release. Annu. Rev. Physiol. *46*, 291–308.

Gicquel, C., Baudin, E., Lebouc, Y., and Schlumberger, M. (1997a). Adrenocortical carcinoma. Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *8*, 423–427.

Gicquel, C., Bertagna, X., Gaston, V., Coste, J., Louvel, A., Baudin, E., Bertherat, J., Chapuis, Y., Duclos, J.M., Schlumberger, M., et al. (2001). Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. Cancer Research *61*, 6762–6767.

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*, 2559–2565.

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., et al. (2003). Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. The American Journal of Pathology *162*, 521–531.

Gomez, M.T., Magiakou, M.A., Mastorakos, G., and Chrousos, G.P. (1993). The pituitary corticotroph is not the rate limiting step in the postoperative recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with Cushing syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. *77*, 173–177.

Goodfriend, T.L., and Peach, M.J. (1975). Angiotensin III: (DES-Aspartic Acid-1)-Angiotensin II. Evidence and speculation for its role as an important agonist in the renin - angiotensin system. Circ. Res. *36*, 38–48.

Groussin, L., Jullian, E., Perlemoine, K., Louvel, A., Leheup, B., Luton, J.P., Bertagna, X., and Bertherat, J. (2002). Mutations of the PRKAR1A gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease. J. Clin. Endocrinol. Metab. *87*, 4324–4329.

Grumbach, M.M., Biller, B.M.K., Braunstein, G.D., Campbell, K.K., Carney, J.A., Godley, P.A., Harris, E.L., Lee, J.K.T., Oertel, Y.C., Posner, M.C., et al. (2003). Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). Annals of Internal Medicine *138*, 424–429.

Gu, Y.-M., Ma, Y.-H., Zhao, W.-G., and Chen, J. (2011). Dickkopf3 overexpression inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro. World J. Gastroenterol. *17*, 3810–3817.

Guagliardo, N.A., Yao, J., Hu, C., Schertz, E.M., Tyson, D.A., Carey, R.M., Bayliss, D.A., and Barrett, P.Q. (2012). TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension. Hypertension *59*, 999–1005.

Guaraldi, F., and Salvatori, R. (2012). Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease. J Am Board Fam Med *25*, 199–208.

Gupta, S., Takebe, N., and Lorusso, P. (2010). Targeting the Hedgehog pathway in cancer. Ther Adv Med Oncol *2*, 237–250.

Gwynne, J.T., and Hess, B. (1980). The role of high density lipoproteins in rat adrenal cholesterol metabolism and steroidogenesis. J. Biol. Chem. *255*, 10875–10883.

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*, 411–430.

Hajnóczky, G., Várnai, P., Buday, L., Faragó, A., and Spät, A. (1992). The role of protein kinase-C in control of aldosterone production by rat adrenal glomerulosa cells: activation of protein kinase-C by stimulation with potassium. Endocrinology *130*, 2230–2236.

Hasegawa, T., Zhao, L., Caron, K.M., Majdic, G., Suzuki, T., Shizawa, S., Sasano, H., and Parker, K.L. (2000). Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. Mol. Endocrinol. *14*, 1462–1471.

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*, 663–671.

Hattangady, N.G., Olala, L.O., Bollag, W.B., and Rainey, W.E. (2012). Acute and chronic regulation of aldosterone production. Mol. Cell. Endocrinol. *350*, 151–162.

Hauet, T., Yao, Z.-X., Bose, H.S., Wall, C.T., Han, Z., Li, W., Hales, D.B., Miller, W.L., Culty, M., and Papadopoulos, V. (2005). Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. Mol. Endocrinol. *19*, 540–554.

He, J., Sheng, T., Stelter, A.A., Li, C., Zhang, X., Sinha, M., Luxon, B.A., and Xie, J. (2006). Suppressing Wnt signaling by the hedgehog pathway through sFRP-1. J. Biol. Chem. *281*, 35598–35602.

Heikkila, M. (2002). Wnt-4 Deficiency Alters Mouse Adrenal Cortex Function, Reducing Aldosterone Production. Endocrinology *143*, 4358–4365.

Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., Wakil, A.E., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R., et al. (2008). Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. The EMBO Journal *27*, 179–187.

Helber, A., Wambach, G., Hummerich, W., Bönner, G., Meurer, K.A., and Kaufmann, W. (1980). Evidence for a subgroup of essential hypertensives with non-suppressible excretion of aldosterone during sodium loading. Klin. Wochenschr. *58*, 439–447.

Hendriksen, J., Fagotto, F., van der Velde, H., van Schie, M., Noordermeer, J., and Fornerod, M. (2005). RanBP3 enhances nuclear export of active (beta)-catenin independently of CRM1. J. Cell Biol. *171*, 785–797.

Hermsen, I.G., Fassnacht, M., Terzolo, M., Houterman, S., den Hartigh, J., Leboulleux, S., Daffara, F., Berruti, A., Chadarevian, R., Schlumberger, M., et al. (2011). Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96*, 1844–1851.

Hershkovitz, L., Beuschlein, F., Klammer, S., Krup, M., and Weinstein, Y. (2007). Adrenal 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the mouse catabolizes progesterone and 11-deoxycorticosterone and is restricted to the X-zone. Endocrinology *148*, 976–988.

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*, 635–645.

Himathongkam, T., Dluhy, R. G., Williams, G. H. (1975). Potassium-aldosterone-renin interrelationships. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 153–159.

Hisada, M., Garber, J.E., Fung, C.Y., Fraumeni, J.F., and Li, F.P. (1998). Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. Journal of the National Cancer Institute *90*, 606–611.

Hoekstra, M., Van Berkel, T.-J., and Van Eck, M. (2010). Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. World J. Gastroenterol. *16*, 5916–5924.

Von Hoff, D.D., LoRusso, P.M., Rudin, C.M., Reddy, J.C., Yauch, R.L., Tibes, R., Weiss, G.J., Borad, M.J., Hann, C.L., Brahmer, J.R., et al. (2009). Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. N. Engl. J. Med. *361*, 1164–1172.

Holland, O.B., and Carr, B. (1993). Modulation of aldosterone synthase messenger ribonucleic acid levels by dietary sodium and potassium and by adrenocorticotropin. Endocrinology *132*, 2666–2673.

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

Huang, C.-C.J., Liu, C., and Yao, H.H.-C. (2012). Investigating the role of adrenal cortex in organization and differentiation of the adrenal medulla in mice. Molecular and Cellular Endocrinology.

Huang, J., Zhang, Y.-L., Teng, X.-M., Lin, Y., Zheng, D.-L., Yang, P.-Y., and Han, Z.-G. (2007). Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. BMC Cancer *7*, 126.

Hunyady, L., Baukal, A.J., Bor, M., Ely, J.A., and Catt, K.J. (1990). Regulation of 1,2-diacylglycerol production by angiotensin-II in bovine adrenal glomerulosa cells. Endocrinology *126*, 1001–1008.

Ikegawa, M., Han, H., Okamoto, A., Matsui, R., Tanaka, M., Omi, N., Miyamae, M., Toguchida, J., and Tashiro, K. (2008). Syndactyly and preaxial synpolydactyly in the single Sfrp2 deleted mutant mice. Dev. Dyn. *237*, 2506–2517.

Illingworth, D.R., Kenny, T.A., and Orwoll, E.S. (1982). Adrenal function in heterozygous and homozygous hypobetalipoproteinemia. J. Clin. Endocrinol. Metab. *54*, 27–33.

Iyer, A.K., Khaled, G., Fang, J., and Maeda, H. (2006). Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. Drug Discov. Today *11*, 812–818.

Jamieson, C., Sharma, M., and Henderson, B.R. (2012). Wnt signaling from membrane to nucleus: β-catenin caught in a loop. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 847–850.

Jeunemaitre, X., Chatellier, G., Kreft-Jais, C., Charru, A., DeVries, C., Plouin, P.F., Corvol, P., and Menard, J. (1987). Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension. Am. J. Cardiol. *60*, 820–825.

Just, A. (2009). Going with the Wnt? Focus on "Hyperaldosteronism, hypervolemia, and increased blood pressure in mice expressing defective APC."Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *297*, R568–570.

Juven-Gershon, T., Hsu, J.-Y., Theisen, J.W., and Kadonaga, J.T. (2008). The RNA polymerase II core promoter - the gateway to transcription. Curr. Opin. Cell Biol. *20*, 253–259.

Kapinas, K., Kessler, C., Ricks, T., Gronowicz, G., and Delany, A.M. (2010). miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. J. Biol. Chem. *285*, 25221–25231.

Karagiannis, A., Tziomalos, K., Papageorgiou, A., Kakafika, A.I., Pagourelias, E.D., Anagnostis, P., Athyros, V.G., and Mikhailidis, D.P. (2008). Spironolactone versus eplerenone for the treatment of idiopathic hyperaldosteronism. Expert Opin Pharmacother *9*, 509–515.

Kater, C.E., Biglieri, E.G., Schambelan, M., and Arteaga, E. (1983). Studies of impaired aldosterone response to spironolactone-induced renin and potassium elevations in adenomatous but not hyperplastic primary aldosteronism. Hypertension *5*, V115–121.

Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J. Cell. Sci. *116*, 2627–2634.

Kelly-Hershkovitz, E., Weizman, R., Spanier, I., Leschiner, S., Lahav, M., Weisinger, G., and Gavish, M. (1998). Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor antisense knockout on MA-10 Leydig cell proliferation and steroidogenesis. J. Biol. Chem. *273*, 5478–5483.

Kennell, J.A., O'Leary, E.E., Gummow, B.M., Hammer, G.D., and MacDougald, O.A. (2003). T-cell factor 4N (TCF-4N), a novel isoform of mouse TCF-4, synergizes with beta-catenin to coactivate C/EBPalpha and steroidogenic factor 1 transcription factors. Mol. Cell. Biol. *23*, 5366–5375.

Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., and Hammer, G.D. (2008). Targeted disruption of -catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. Development *135*, 2593–2602.

Kim, S., and Iwao, H. (2000). Molecular and Cellular Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Cardiovascular and Renal Diseases. Pharmacol Rev *52*, 11–34.

King, P., Paul, A., and Laufer, E. (2009). Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 21185–21190.

King, P.J., Guasti, L., and Laufer, E. (2008). Hedgehog signalling in endocrine development and disease. The Journal of Endocrinology *198*, 439–450.

Kirpotin, D.B., Drummond, D.C., Shao, Y., Shalaby, M.R., Hong, K., Nielsen, U.B., Marks, J.D., Benz, C.C., and Park, J.W. (2006). Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. Cancer Res. *66*, 6732–6740.

Kirschner, L.S. (2012). The next generation of therapies for adrenocortical cancers. Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM.

Knutson, S.K., Wigle, T.J., Warholic, N.M., Sneeringer, C.J., Allain, C.J., Klaus, C.R., Sacks, J.D., Raimondi, A., Majer, C.R., Song, J., et al. (2012). A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. Nat. Chem. Biol. *8*, 890–896.

Ko, J., Ryu, K.S., Lee, Y.H., Na, D.S., Kim, Y.S., Oh, Y.M., Kim, I.S., and Kim, J.W. (2002). Human

secreted frizzled-related protein is down-regulated and induces apoptosis in human cervical cancer. Exp. Cell Res. *280*, 280–287.

Kojima, I., Kawamura, N., and Shibata, H. (1994). Rate of calcium entry determines the rapid changes in protein kinase C activity in angiotensin II-stimulated adrenal glomerulosa cells. Biochem. J. *297 (Pt 3)*, 523–528.

Kojima, I., Kojima, K., Kreutter, D., and Rasmussen, H. (1984a). The temporal integration of the aldosterone secretory response to angiotensin occurs via two intracellular pathways. J. Biol. Chem. *259*, 14448–14457.

Kojima, I., Kojima, K., and Rasmussen, H. (1985). Role of calcium fluxes in the sustained phase of angiotensin II-mediated aldosterone secretion from adrenal glomerulosa cells. J. Biol. Chem. *260*, 9177–9184.

Kojima, K., Kojima, I., and Rasmussen, H. (1984b). Dihydropyridine calcium agonist and antagonist effects on aldosterone secretion. Am. J. Physiol. *247*, E645–650.

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*, 5591–5598.

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*, 601–637.

Kurtulmus, N., Yarman, S., Azizlerli, H., and Kapran, Y. (2004). Co-secretion of aldosterone and cortisol by an adrenocortical carcinoma. Horm. Res. *62*, 67–70.

Kuulasmaa, T., Jääskeläinen, J., Suppola, S., Pietiläinen, T., Heikkilä, P., Aaltomaa, S., Kosma, V.-M., and Voutilainen, R. (2008). WNT-4 mRNA expression in human adrenocortical tumors and cultured adrenal cells. Horm. Metab. Res. *40*, 668–673.

Lacapère, J.J., Delavoie, F., Li, H., Péranzi, G., Maccario, J., Papadopoulos, V., and Vidic, B. (2001). Structural and functional study of reconstituted peripheral benzodiazepine receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. *284*, 536–541.

Lacroix, A. (2009). ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *23*, 245–259.

Lacroix, A., Ndiaye, N., Tremblay, J., and Hamet, P. (2001). Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. Endocr. Rev. *22*, 75–110.

Lafferty, A.R., Torpy, D.J., Stowasser, M., Taymans, S.E., Lin, J.P., Huggard, P., Gordon, R.D., and Stratakis, C.A. (2000). A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). J. Med. Genet. *37*, 831–835.

Lambert-Langlais, S., Pointud, J.-C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Volat, F., Manin, M., Coudoré, F., Val, P., Sahut-Barnola, I., Ragazzon, B., Louiset, E., et al. (2009). Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions. PLoS ONE *4*, e7309.

Lang, U., and Vallotton, M.B. (1987). Angiotensin II but not potassium induces subcellular redistribution of protein kinase C in bovine adrenal glomerulosa cells. J. Biol. Chem. *262*, 8047–8050.

Latronico, A.C., and Chrousos, G.P. (1997). Extensive personal experience: adrenocortical tumors. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism *82*, 1317–1324.

Laufer, E., Kesper, D., Vortkamp, A., and King, P. (2012). Sonic hedgehog signaling during adrenal development. Mol. Cell. Endocrinol. *351*, 19–27.

Lee, E.-J., Jo, M., Rho, S.B., Park, K., Yoo, Y.-N., Park, J., Chae, M., Zhang, W., and Lee, J.-H. (2009). Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin. Int. J. Cancer *124*, 287–297.

Lee, S.-O., Abdelrahim, M., Yoon, K., Chintharlapalli, S., Papineni, S., Kim, K., Wang, H., and Safe, S. (2010). Inactivation of the orphan nuclear receptor TR3/Nur77 inhibits pancreatic cancer cell and tumor growth. Cancer Res. *70*, 6824–6836.

Lee, S.-O., Li, X., Khan, S., and Safe, S. (2011). Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors. Expert Opin. Ther. Targets *15*, 195–206.

Lefrançois-Martinez, A.-M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallo-Payet, N., Hyndman, D., Veyssière, 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*, 3010–3019.

Lefrançois-Martinez, A.M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssière, 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*, 32875–32880.

Lehoux, J.-G., and Lefebvre, A. (2007). Angiotensin II activates p44/42 MAP kinase partly through PKCepsilon in H295R cells. Mol. Cell. Endocrinol. *265-266*, 121–125.

LeHoux, J.G., Dupuis, G., and Lefebvre, A. (2001). Control of CYP11B2 gene expression through differential regulation of its promoter by atypical and conventional protein kinase C isoforms. J. Biol. Chem. *276*, 8021–8028.

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*, 223–230.

Lenzini, L., Seccia, T.M., Aldighieri, E., Belloni, A.S., Bernante, P., Giuliani, L., Nussdorfer, G.G., Pessina, A.C., and Rossi, G.P. (2007). Heterogeneity of aldosterone-producing adenomas revealed by a whole transcriptome analysis. Hypertension *50*, 1106–1113.

Lepourcelet, M., Chen, Y.-N.P., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A.W., and Shivdasani, R.A. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/beta-catenin protein complex. Cancer Cell *5*, 91–102.

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell *88*, 323–331.

Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G., and Papadopoulos, V. (2001). Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *98*, 1267–1272.

Li, X., Gonzalez, M.E., Toy, K., Filzen, T., Merajver, S.D., and Kleer, C.G. (2009). Targeted overexpression of EZH2 in the mammary gland disrupts ductal morphogenesis and causes epithelial hyperplasia. Am. J. Pathol. *175*, 1246–1254.

Libé, R., and Bertherat, J. (2005). Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. Eur. J. Endocrinol. *153*, 477–487.

Lim, P.O., Jung, R.T., and MacDonald, T.M. (1999). Raised aldosterone to renin ratio predicts

antihypertensive efficacy of spironolactone: a prospective cohort follow-up study. Br J Clin Pharmacol *48*, 756–760.

Lin, C.-W., Chang, Y.-H., and Pu, H.-F. (2012). Mitotane exhibits dual effects on steroidogenic enzymes gene transcription under basal and cAMP-stimulating microenvironments in NCI-H295 cells. Toxicology.

Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., 3rd, Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., and Miller, W.L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. Science *267*, 1828–1831.

Linhart, H.G., Lin, H., Yamada, Y., Moran, E., Steine, E.J., Gokhale, S., Lo, G., Cantu, E., Ehrich, M., He, T., et al. (2007). Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. Genes & Development *21*, 3110–3122.

Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., and He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell *108*, 837–847.

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*, 677–682.

Liu, J., Kahri, A.I., Heikkilä, P., and Voutilainen, R. (1997a). Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism *82*, 1766–1771.

Liu, J., Rone, M.B., and Papadopoulos, V. (2006). Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. J. Biol. Chem. *281*, 38879–38893.

Liu, J., Voutilainen, R., Kahri, A.I., and Heikkilä, P. (1997b). Expression patterns of the c-myc gene in adrenocortical tumors and pheochromocytomas. J. Endocrinol. *152*, 175–181.

LoRusso, P.M., Rudin, C.M., Reddy, J.C., Tibes, R., Weiss, G.J., Borad, M.J., Hann, C.L., Brahmer, J.R., Chang, I., Darbonne, W.C., et al. (2011). Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. Clin. Cancer Res. *17*, 2502–2511.

Louiset, E., Contesse, V., Groussin, L., Cartier, D., Duparc, C., Perraudin, V., Bertherat, J., and Lefebvre, H. (2008). Expression of vasopressin receptors in ACTH-independent macronodular bilateral adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: molecular, immunohistochemical and pharmacological correlates. J. Endocrinol. *196*, 1–9.

Lu, L., Suzuki, T., Yoshikawa, Y., Murakami, O., Miki, Y., Moriya, T., Bassett, M.H., Rainey, W.E., Hayashi, Y., and Sasano, H. (2004). Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. J. Clin. Endocrinol. Metab. *89*, 4113–4118.

Luconi, M., and Mannelli, M. (2012). Xenograft models for preclinical drug testing: Implications for adrenocortical cancer. Molecular and Cellular Endocrinology *351*, 71–77.

Lymperopoulos, A., Rengo, G., Zincarelli, C., Kim, J., Soltys, S., and Koch, W.J. (2009). An adrenal beta-arrestin 1-mediated signaling pathway underlies angiotensin II-induced aldosterone production in vitro and in vivo. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *106*, 5825–5830.

Manna, P.R., Dyson, M.T., Eubank, D.W., Clark, B.J., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Zeleznik, A.J., and Stocco, D.M. (2002). Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. Mol. Endocrinol. *16*,

184–199.

Manna, P.R., Dyson, M.T., and Stocco, D.M. (2009). Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. Molecular Human Reproduction *15*, 321–333.

Marchesa, P., Fazio, V.W., Church, J.M., and McGannon, E. (1997). Adrenal masses in patients with familial adenomatous polyposis. Dis. Colon Rectum *40*, 1023–1028.

Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Vallé, 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*, 481–491.

Mason, J.I., and Rainey, W.E. (1987). Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized de novo. J. Clin. Endocrinol. Metab. *64*, 140–147.

Massotti, M., Slobodyansky, E., Konkel, D., Costa, E., and Guidotti, A. (1991). Regulation of diazepam binding inhibitor in rat adrenal gland by adrenocorticotropin. Endocrinology *129*, 591–596.

Matsunaga, H., Yamashita, N., Maruyama, Y., Kojima, I., and Kurokawa, K. (1987). Evidence for two distinct voltage-gated calcium channel currents in bovine adrenal glomerulosa cells. Biochemical and Biophysical Research Communications *149*, 1049–1054.

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*, 265–271.

Mauras, N., and Blizzard, R.M. (1986). The McCune-Albright syndrome. Acta Endocrinol Suppl (Copenh) *279*, 207–217.

McCabe, M.T., Ott, H.M., Ganji, G., Korenchuk, S., Thompson, C., Van Aller, G.S., Liu, Y., Graves, A.P., Iii, A.D.P., Diaz, E., et al. (2012). EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature.

MCCART, A., VICKARYOUS, N., and SILVER, A. (2008). Apc mice: Models, modifiers and mutants. Pathology - Research and Practice *204*, 479–490.

McEwan, P.E., Vinson, G.P., and Kenyon, C.J. (1999). Control of adrenal cell proliferation by AT1 receptors in response to angiotensin II and low-sodium diet. Am. J. Physiol. *276*, E303–309.

Merke, D.P., Chrousos, G.P., Eisenhofer, G., Weise, M., Keil, M.F., Rogol, A.D., Van Wyk, J.J., and Bornstein, S.R. (2000). Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. N. Engl. J. Med. *343*, 1362–1368.

Messer, C.K., Kirschenbaum, A., New, M.I., Unger, P., Gabrilove, J.L., and Levine, A.C. (2007). Concomitant secretion of glucocorticoid, androgens, and mineralocorticoid by an adrenocortical carcinoma: case report and review of literature. Endocr Pract *13*, 408–412.

Midzak, A., Akula, N., Lecanu, L., and Papadopoulos, V. (2011). Novel androstenetriol interacts with the mitochondrial translocator protein and controls steroidogenesis. J. Biol. Chem. *286*, 9875–9887.

Milla, L.A., Cortés, C.R., Hodar, C., Oñate, M.G., Cambiazo, V., Burgess, S.M., and Palma, V. (2012). Yeast-based assay identifies novel Shh/Gli target genes in vertebrate development. BMC Genomics *13*, 2.

Miller, W.L., and Bose, H.S. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. J. Lipid Res. *52*, 2111–2135.

Milliez, P., Girerd, X., Plouin, P.-F., Blacher, J., Safar, M.E., and Mourad, J.-J. (2005). Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. J. Am. Coll. Cardiol. *45*, 1243–1248.

Mitani, F., Mukai, K., Miyamoto, H., Suematsu, M., and Ishimura, Y. (1999). Development of functional zonation in the rat adrenal cortex. Endocrinology *140*, 3342–3353.

Mohan, H.M., Aherne, C.M., Rogers, A.C., Baird, A.W., Winter, D.C., and Murphy, E.P. (2012). Molecular Pathways: The Role of NR4A Orphan Nuclear Receptors in Cancer. Clin Cancer Res *18*, 3223–3228.

Monticone, S., Hattangady, N.G., Nishimoto, K., Mantero, F., Rubin, B., Cicala, M.V., Pezzani, R., Auchus, R.J., Ghayee, H.K., Shibata, H., et al. (2012). Effect of KCNJ5 Mutations on Gene Expression in Aldosterone-Producing Adenomas and Adrenocortical Cells. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.

Moraitis, A., and Stratakis, C. (2011). Adrenocortical causes of hypertension. Int J Hypertens *2011*, 624691.

Morello, R., Bertin, T.K., Schlaubitz, S., Shaw, C.A., Kakuru, S., Munivez, E., Hermanns, P., Chen, Y., Zabel, B., and Lee, B. (2008). Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. Journal of Cellular Physiology *217*, 127–137.

Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Suzuki, T., Abe, T., Tanemoto, M., Abe, M., Uruno, A., Ishidoya, S., Arai, Y., et al. (2008). Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. Endocr. J. *55*, 49–55.

Morohashi, K., and Zubair, M. (2011). The fetal and adult adrenal cortex. Mol. Cell. Endocrinol. *336*, 193–197.

Mulatero, P., Tauber, P., Zennaro, M.-C., Monticone, S., Lang, K., Beuschlein, F., Fischer, E., Tizzani, D., Pallauf, A., Viola, A., et al. (2012). KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. Hypertension *59*, 235–240.

Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *92*, 3046–3050.

Murthy, M., Azizan, E.A.B., Brown, M.J., and O'shaughnessy, K.M. (2012). Characterization of a novel somatic KCNJ5 mutation delI157 in an aldosterone-producing adenoma. Journal of Hypertension.

Müssig, K., Wehrmann, M., Horger, M., Teichmann, R., Maser-Gluth, C., Häring, H.-U., and Overkamp, D. (2005). Steroid profile in an adrenocortical carcinoma producing aldosterone. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes *113*, 236–240.

Nakamura, R.E.I., and Hackam, A.S. (2010). Analysis of Dickkopf3 interactions with Wnt signaling receptors. Growth Factors *28*, 232–242.

Nakamura, R.E.I., Hunter, D.D., Yi, H., Brunken, W.J., and Hackam, A.S. (2007). Identification of two novel activities of the Wnt signaling regulator Dickkopf 3 and characterization of its expression in the mouse retina. BMC Cell Biol. *8*, 52.

Niehrs, C. (2006). Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. Oncogene *25*, 7469–7481.

Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Shibata, H., Itoh, H., Mitani, F., Yamazaki, T., et al. (2010). Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. J. Clin. Endocrinol. Metab. *95*, 2296–2305.

Nogueira, E.F., Bollag, W.B., and Rainey, W.E. (2009a). Angiotensin II regulation of adrenocortical gene transcription. Molecular and Cellular Endocrinology *302*, 230–236.

Nogueira, E.F., Gerry, D., Mantero, F., Mariniello, B., and Rainey, W.E. (2010). The role of TASK1 in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. Clin. Endocrinol. (Oxf) *73*, 22–29.

Nogueira, E.F., and Rainey, W.E. (2010). Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. Endocrinology *151*, 1060–1070.

Nogueira, E.F., Vargas, C.A., Otis, M., Gallo-Payet, N., Bollag, W.B., and Rainey, W.E. (2007). Angiotensin-II acute regulation of rapid response genes in human, bovine, and rat adrenocortical cells. J. Mol. Endocrinol. *39*, 365–374.

Nogueira, E.F., Xing, Y., Morris, C.A.V., and Rainey, W.E. (2009b). Role of angiotensin II-induced rapid response genes in the regulation of enzymes needed for aldosterone synthesis. J. Mol. Endocrinol. *42*, 319–330.

Orth, D.N. and Kovacs, N.J. (1998). The adrenal cortex. In Williams Text Book of Endocrinology, 9th Edition, pp. pp. 517–664.

Panda, S., Antoch, M.P., Miller, B.H., Su, A.I., Schook, A.B., Straume, M., Schultz, P.G., Kay, S.A., Takahashi, J.S., and Hogenesch, J.B. (2002). Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. Cell *109*, 307–320.

Papadopoulos, V. (1993). Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. Endocr. Rev. *14*, 222–240.

Papadopoulos, V., Amri, H., Boujrad, N., Cascio, C., Culty, M., Garnier, M., Hardwick, M., Li, H., Vidic, B., Brown, A.S., et al. (1997a). Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. Steroids *62*, 21–28.

Papadopoulos, V., Amri, H., Li, H., Boujrad, N., Vidic, B., and Garnier, M. (1997b). Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. J. Biol. Chem. *272*, 32129–32135.

Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T.R., Knudsen, T.B., Lacapère, J.-J., Lindemann, P., Norenberg, M.D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M.-R., et al. (2006). Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. Trends Pharmacol. Sci. *27*, 402–409.

Penton, D., Bandulik, S., Schweda, F., Haubs, S., Tauber, P., Reichold, M., Cong, L.D., El Wakil, A., Budde, T., Lesage, F., et al. (2012). Task3 potassium channel gene invalidation causes low renin and salt-sensitive arterial hypertension. Endocrinology *153*, 4740–4748.

Peppa, M., Pikounis, V., Papaxoinis, G., Macheras, A., Economopoulos, T., Raptis, S.A., and Hadjidakis, D. (2009). Adrenocortical carcinoma secreting cortisol, androgens and aldosterone: a case report. Cases J *2*, 8951.

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*, 417–424.

Pezzi, V., Clyne, C.D., Ando, S., Mathis, J.M., and Rainey, W.E. (1997). Ca(2+)-regulated expression of aldosterone synthase is mediated by calmodulin and calmodulin-dependent protein kinases. Endocrinology *138*, 835–838.

Pilon, A., Martin, G., Bultel-Brienne, S., Junquero, D., Delhon, A., Fruchart, J.-C., Staels, B., and Clavey, V. (2003). Regulation of the scavenger receptor BI and the LDL receptor by activators of aldosterone production, angiotensin II and PMA, in the human NCI-H295R adrenocortical cell line. Biochim. Biophys. Acta *1631*, 218–228.

Pinés Corrales, P.J., González-Albarrán, O., Peralta, M., Roa, C., and Antón, T. (2006). Clinically inapparent adrenal mass in a patient with familial adenomatous polyposis. Horm. Res. *66*, 207–210.

Polakis, P. (1997). The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochimica Et Biophysica Acta *1332*, F127–47.

Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. Genes Dev. *14*, 1837–1851.

Polakis, P. (2012). Wnt Signaling in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol *4*,.

Porter, F.D., and Herman, G.E. (2011). Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. J. Lipid Res. *52*, 6–34.

Qi, L., Sun, B., Liu, Z., Li, H., Gao, J., and Leng, X. (2012). Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression. Cancer Sci. *103*, 828–835.

Quinkler, M., and Stewart, P.M. (2010). Treatment of primary aldosteronism. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism *24*, 923–932.

Ragazzon, B., Assié, G., and Bertherat, J. (2011). Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. Endocrine Related Cancer *18*, R15–27.

Ragazzon, B., Libe, R., Gaujoux, S., Assie, G., Fratticci, A., Launay, P., Clauser, E., Bertagna, X., Tissier, F., De Reynies, A., et al. (2010). Transcriptome Analysis Reveals that p53 and -Catenin Alterations Occur in a Group of Aggressive Adrenocortical Cancers. Cancer Research *70*, 8276–8281.

Rainey, W.E. (1999). Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. Molecular and Cellular Endocrinology *151*, 151–160.

Rainey, W.E., Shay, J.W., and Mason, J.I. (1986). ACTH induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, cholesterol biosynthesis, and steroidogenesis in primary cultures of bovine adrenocortical cells. J. Biol. Chem. *261*, 7322–7326.

Raju, G.P., and Pham, D. (2012). Hedgehog inhibition as an anti-cancer strategy. Vitam. Horm. *88*, 507–522.

Rechache, N.S., Wang, Y., Stevenson, H.S., Killian, J.K., Edelman, D.C., Merino, M., Zhang, L., Nilubol, N., Stratakis, C.A., Meltzer, P.S., et al. (2012). DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. *97*, E1004–1013.

Reibetanz, J., Jurowich, C., Erdogan, I., Nies, C., Rayes, N., Dralle, H., Behrend, M., Allolio, B., and Fassnacht, M. (2012). Impact of lymphadenectomy on the oncologic outcome of patients with adrenocortical carcinoma. Ann. Surg. *255*, 363–369.

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*, 33545–33549.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 402–412.

Rodríguez-Paredes, M., and Esteller, M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. Nat. Med. *17*, 330–339.

Rossi, G.P., Bernini, G., Caliumi, C., Desideri, G., Fabris, B., Ferri, C., Ganzaroli, C., Giacchetti, G., Letizia, C., Maccario, M., et al. (2006). A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. J. Am. Coll. Cardiol. *48*, 2293–2300.

Rossier, M.F., Ertel, E.A., Vallotton, M.B., and Capponi, A.M. (1998). Inhibitory action of mibefradil on calcium signaling and aldosterone synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. J. Pharmacol. Exp. Ther. *287*, 824–831.

Rudin, C.M., Hann, C.L., Laterra, J., Yauch, R.L., Callahan, C.A., Fu, L., Holcomb, T., Stinson, J., Gould, S.E., Coleman, B., et al. (2009). Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. N. Engl. J. Med. *361*, 1173–1178.

Sackmann, S., Lichtenauer, U., Shapiro, I., Reincke, M., and Beuschlein, F. (2011). Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. Horm. Metab. Res. *43*, 106–111.

Safe, S., Kim, K., Li, X., and Lee, S.-O. (2011). NR4A orphan receptors and cancer. Nucl. Recept. Signaling *9*, e002.

Sahut-Barnola, I., de Joussineau, C., Val, P., Lambert-Langlais, S., Damon, C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Pointud, J.-C., Marceau, G., Sapin, V., Tissier, F., et al. (2010). Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. PLoS Genet. *6*, e1000980.

Sander, S., Bullinger, L., Klapproth, K., Fiedler, K., Kestler, H.A., Barth, T.F.E., Möller, P., Stilgenbauer, S., Pollack, J.R., and Wirth, T. (2008). MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. Blood *112*, 4202–4212.

Sauvageau, M., and Sauvageau, G. (2010). Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. Cell Stem Cell *7*, 299–313.

Scheer, F.A.J.L., Hilton, M.F., Mantzoros, C.S., and Shea, S.A. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 4453–4458.

Schinner, S., Willenberg, H.S., Krause, D., Schott, M., Lamounier-Zepter, V., Krug, A.W., Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S.R., and Scherbaum, W.A. (2007). Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. Int J Obes (Lond) *31*, 864–870.

Schmitt, A., Saremaslani, P., Schmid, S., Rousson, V., Montani, M., Schmid, D.M., Heitz, P.U., Komminoth, P., and Perren, A. (2006). IGFII and MIB1 immunohistochemistry is helpful for the differentiation of benign from malignant adrenocortical tumours. Histopathology *49*, 298–307.

Scholl, U.I., Nelson-Williams, C., Yue, P., Grekin, R., Wyatt, R.J., Dillon, M.J., Couch, R., Hammer, L.K., Harley, F.L., Farhi, A., et al. (2012). Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 2533–2538.

Schteingart, D.E., Sinsheimer, J.E., Counsell, R.E., Abrams, G.D., McClellan, N., Djanegara, T., Hines, J., Ruangwises, N., Benitez, R., and Wotring, L.L. (1993). Comparison of the adrenalytic activity of mitotane and a methylated homolog on normal adrenal cortex and adrenal cortical carcinoma. Cancer Chemother. Pharmacol. *31*, 459–466.

Sculptoreanu, A., Scheuer, T., and Catterall, W.A. (1993). Voltage-dependent potentiation of L-type Ca2+ channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. Nature *364*, 240–243.

Seccia, T.M. (2005). Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. Endocrine Related Cancer *12*, 149–159.

Seedorf, U., Ellinghaus, P., and Roch Nofer, J. (2000). Sterol carrier protein-2. Biochim. Biophys. Acta *1486*, 45–54.

Seedorf, U., Raabe, M., Ellinghaus, P., Kannenberg, F., Fobker, M., Engel, T., Denis, S., Wouters, F., Wirtz, K.W., Wanders, R.J., et al. (1998). Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. Genes Dev. *12*, 1189–1201.

Sharma, M., Jamieson, C., Johnson, M., Molloy, M.P., and Henderson, B.R. (2012). Specific armadillo repeat sequences facilitate β-catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. J. Biol. Chem. *287*, 819–831.

Sheng, M., Thompson, M.A., and Greenberg, M.E. (1991). CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. Science *252*, 1427–1430.

Shukla, A.K., Xiao, K., and Lefkowitz, R.J. (2011). Emerging paradigms of β-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. Trends in Biochemical Sciences *36*, 457–469.

Simard, J., Rhéaume, E., Sanchez, R., Laflamme, N., de Launoit, Y., Luu-The, V., van Seters, A.P., Gordon, R.D., Bettendorf, M., and Heinrich, U. (1993). Molecular basis of congenital adrenal hyperplasia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. Mol. Endocrinol. *7*, 716–728.

Simon, J.A., and Lange, C.A. (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. Mutat. Res. *647*, 21–29.

SKELTON, F.R. (1959). Adrenal regeneration and adrenal-regeneration hypertension. Physiol. Rev. *39*, 162–182.

Smith, T.G., Clark, S.K., Katz, D.E., Reznek, R.H., and Phillips, R.K. (2000). Adrenal masses are associated with familial adenomatous polyposis. Dis. Colon Rectum *43*, 1739–1742.

De Souza, E.B., Anholt, R.R., Murphy, K.M., Snyder, S.H., and Kuhar, M.J. (1985). Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. Endocrinology *116*, 567–573.

Spät, A., and Hunyady, L. (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol. Rev. *84*, 489–539.

Stanton, B.Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M.,

Lee, S.W., Koehler, A.N., et al. (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. Nat. Chem. Biol. *5*, 154–156.

Strate, L.L., and Syngal, S. (2005). Hereditary colorectal cancer syndromes. Cancer Causes & Control *16*, 201–213.

Sucheston, M.E., and Cannon, M.S. (1968). Development of zonular patterns in the human adrenal gland. J. Morphol. *126*, 477–491.

Sugawara, T., Kiriakidou, M., McAllister, J.M., Holt, J.A., Arakane, F., and Strauss, J.F. (1997). Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1. Steroids *62*, 5–9.

Sugioka, K., Mizumoto, K., and Sawa, H. (2011). Wnt regulates spindle asymmetry to generate asymmetric nuclear β-catenin in C. elegans. Cell *146*, 942–954.

Sukhdeo, K., Mani, M., Zhang, Y., Dutta, J., Yasui, H., Rooney, M.D., Carrasco, D.E., Zheng, M., He, H., Tai, Y.-T., et al. (2007). Targeting the beta-catenin/TCF transcriptional complex in the treatment of multiple myeloma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 7516–7521.

Sukor, N., Gordon, R.D., Ku, Y.K., Jones, M., and Stowasser, M. (2009). Role of unilateral adrenalectomy in bilateral primary aldosteronism: a 22-year single center experience. J. Clin. Endocrinol. Metab. *94*, 2437–2445.

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*, 809–815.

Suwa, T., Chen, M., Hawks, C.L., and Hornsby, P.J. (2003). Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. J. Endocrinol. *178*, 149–158.

Suzuki, H., Watkins, D.N., Jair, K.-W., Schuebel, K.E., Markowitz, S.D., Dong Chen, W., Pretlow, T.P., Yang, B., Akiyama, Y., Van Engeland, M., et al. (2004). Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. Nature Genetics *36*, 417–422.

Swords, F.M., Noon, L.A., King, P.J., and Clark, A.J.L. (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*, 149–154.

Tagawa, H., Gutmann, F.D., Haber, E., Miller, E.D., Jr, Samuels, A.I., and Barger, A.C. (1974). Reversible renovascular hypertension and renal arterial pressure. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *146*, 975–982.

Tait, J.F., and Tait, S.A. (1999). Role of cAMP in the effects of K+ on the steroidogenesis of zona glomerulosa cells. Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. *26*, 947–955.

Tan, J., Yang, X., Zhuang, L., Jiang, X., Chen, W., Lee, P.L., Karuturi, R.K.M., Tan, P.B.O., Liu, E.T., and Yu, Q. (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. Genes Dev. *21*, 1050–1063.

Tang, X., Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., Goldfinger, N., and Rotter, V. (2004). Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. Oncogene *23*, 5759–5769.

Terzolo, M., Angeli, A., Fassnacht, M., Daffara, F., Tauchmanova, L., Conton, P.A., Rossetto, R., Buci, L., Sperone, P., Grossrubatscher, E., et al. (2007). Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. N. Engl. J. Med. *356*, 2372–2380.

Therrien, M., and Drouin, J. (1993). Molecular determinants for cell specificity and glucocorticoid repression of the proopiomelanocortin gene. Ann. N. Y. Acad. Sci. *680*, 663–671.

Tissier, F. (2010). Classification of adrenal cortical tumors: what limits for the pathological approach? Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *24*, 877–885.

Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagneré, A.-M., René-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., et al. (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 Research *65*, 7622–7627.

Trevant, B., Gaur, T., Hussain, S., Symons, J., Komm, B.S., Bodine, P.V.N., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2008). Expression of secreted frizzled related protein 1, a Wnt antagonist, in brain, kidney, and skeleton is dispensable for normal embryonic development. J. Cell. Physiol. *217*, 113–126.

Trzeciak, W.H., Simpson, E.R., Scallen, T.J., Vahouny, G.V., and Waterman, M.R. (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.

Tsuchida, S., Matsusaka, T., Chen, X., Okubo, S., Niimura, F., Nishimura, H., Fogo, A., Utsunomiya, H., Inagami, T., and Ichikawa, I. (1998). Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. J. Clin. Invest. *101*, 755–760.

Turner, J.G., and Sullivan, D.M. (2008). CRM1-mediated nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. Curr. Med. Chem. *15*, 2648–2655.

Vahouny, G.V., Chanderbhan, R., Noland, B.J., Irwin, D., Dennis, P., Lambeth, J.D., and Scallen, T.J. (1983). Sterol carrier protein2. Identification of adrenal sterol carrier protein2 and site of action for mitochondrial cholesterol utilization. J. Biol. Chem. *258*, 11731–11737.

Val, P., Lefrançois-Martinez, A.-M., Veyssière, G., and Martinez, A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. Nucl. Recept. *1*, 8.

Val, P., and Swain, A. (2010). Gene dosage effects and transcriptional regulation of early mammalian adrenal cortex development. Mol. Cell. Endocrinol. *323*, 105–114.

Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β-catenin. The EMBO Journal *31*, 2714–2736.

Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G.A.B., Otte, A.P., et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature *419*, 624–629.

Veeck, J., Bektas, N., Hartmann, A., Kristiansen, G., Heindrichs, U., Knüchel, R., and Dahl, E. (2008). Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. Breast Cancer Res. *10*, R82.

Vergeer, M., Korporaal, S.J.A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G.K., Hoekstra, M., Sierts, J.A., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., et al. (2011). Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. N. Engl. J. Med. *364*, 136–145.

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*, 7666–7671.

Veytsman, I., Nieman, L., and Fojo, T. (2009). Management of endocrine manifestations and the

use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. J. Clin. Oncol. *27*, 4619–4629.

Vousden, K.H., and Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. Nature Reviews Cancer *2*, 594–604.

Wajchenberg, B.L., Albergaria Pereira, M.A., Medonca, B.B., Latronico, A.C., Campos Carneiro, P., Alves, V.A., Zerbini, M.C., Liberman, B., Carlos Gomes, G., and Kirschner, M.A. (2000). Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. Cancer *88*, 711–736.

Wasserman, J.D., Zambetti, G.P., and Malkin, D. (2012). Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. Mol. Cell. Endocrinol. *351*, 101–110.

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*, 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*, 1537–1543.

Wei, W., Chua, M.-S., Grepper, S., and So, S. (2010). Small molecule antagonists of Tcf4/beta-catenin complex inhibit the growth of HCC cells in vitro and in vivo. Int. J. Cancer *126*, 2426–2436.

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*, 217–228.

Whitebread, S., Mele, M., Kamber, B., and de Gasparo, M. (1989). Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *163*, 284–291.

Wilson, J.D., Foster, D.W., Kronenberg, H.M., and Larsen, P.R. (1998). Williams textbook of endocrinology.

Wilson, T.E., Mouw, A.R., Weaver, C.A., Milbrandt, J., and Parker, K.L. (1993). The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase. Molecular and Cellular Biology *13*, 861–868.

Wu, H., Lin, Y., Li, W., Sun, Z., Gao, W., Zhang, H., Xie, L., Jiang, F., Qin, B., Yan, T., et al. (2011). Regulation of Nur77 expression by -catenin and its mitogenic effect in colon cancer cells. The FASEB Journal *25*, 192–205.

Xekouki, P., Hatch, M.M., Lin, L., Rodrigo, D.A., Azevedo, M., de la Luz Sierra, M., Levy, I., Saloustros, E., Moraitis, A., Horvath, A., et al. (2012). KCNJ5 mutations in the National Institutes of Health cohort of patients with primary hyperaldosteronism: an infrequent genetic cause of Conn's syndrome. Endocrine-related Cancer *19*, 255–260.

Yang-Snyder, J., Miller, J.R., Brown, J.D., Lai, C.J., and Moon, R.T. (1996). A frizzled homolog functions in a vertebrate Wnt signaling pathway. Curr. Biol. *6*, 1302–1306.

Yauch, R.L., Dijkgraaf, G.J.P., Alicke, B., Januario, T., Ahn, C.P., Holcomb, T., Pujara, K., Stinson, J., Callahan, C.A., Tang, T., et al. (2009). Smoothened mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. Science *326*, 572–574.

Ye, P., Nakamura, Y., Lalli, E., and Rainey, W.E. (2009). Differential effects of high and low steroidogenic factor-1 expression on CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenocortical cells. Endocrinology *150*, 1303–1309.

Zilz, A., Li, H., Castello, R., Papadopoulos, V., and Widmaier, E.P. (1999). Developmental expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the advent of steroidogenesis in rat adrenal glands. Endocrinology *140*, 859–864.

Zubair, M., Ishihara, S., Oka, S., Okumura, K., and Morohashi, K. (2006). Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. Mol. Cell. Biol. *26*, 4111–4121.

Les tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes et malignes sont associées à une morbidité élevée résultant de l'hypersécrétion des hormones cortico-surrénaliennes, retrouvée chez près de 60% des patients. Au delà des perturbations endocrines, les carcinomes cortico-surrénaliens (CCS) sont des tumeurs de mauvais pronostic avec 16 à 38% de survie à 5 ans. Cette agressivité résulte à la fois de la présence de métastases chez de nombreux patients, au moment du diagnostic (30 à 40% des cas) et de l'absence d'approches thérapeutiques, au delà de la résection chirurgicale de la tumeur primaire. Au début de ma thèse, les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des tumeurs bénignes et malignes de la cortico-surrénale, étaient largement méconnus. L'activation anormale de la voie de signalisation Wnt/ßcaténine dans 48% des tumeurs bénignes et 37% des tumeurs malignes, suggérait que cette voie pouvait, comme dans d'autres tissus, participer au développement tumoral dans la cortico-surrénale.

Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons développé et caractérisé un modèle de souris transgéniques dans lesquelles la ßcaténine est constitutivement activée, spécifiquement dans le cortex surrénalien (souris ΔCat).

Grâce à ces souris, nous avons démontré pour la première fois que la ßcaténine agit comme un oncogène dans la cortico-surrénale, mais que son activation constitutive ne suffit pas à déclencher systématiquement le développement de tumeurs malignes. Chez plus de 90% des patients, la formation des CCS est associée à la surexpression du facteur de croissance *IGF2*. Grâce à des modèles de souris transgéniques qui surexpriment *Igf2*, nous avons pu montrer que cette surexpression n'a que peu d'effet sur l'initiation ou la progression tumorale, suggérant que d'autres altérations sont requises pour favoriser la transition maligne. Des résultats préliminaires encourageants suggèrent que la surexpression de l'histone méthyl-transférase *EZH2* et les altérations épigénétiques résultantes, pourraient être la clé du développement des CCS.

Parallèlement, nous avons montré que l'activation constitutive de la ßcaténine conduit au développement d'un hyperaldostéronisme primaire chez les souris ΔCat, suggérant que l'activation de la voie Wnt/ßcaténine pourrait participer à la formation d'adénomes surrénaliens producteurs d'aldostérone (APA) chez les patients. Effectivement, nous avons mis en évidence que l'activation constitutive de la ßcaténine est l'altération moléculaire la plus fréquente dans les APA, avec une prévalence de 68%. Des analyses *in vitro* m'ont permis de montrer que la ßcaténine stimule la production d'aldostérone en contrôlant directement et indirectement l'expression de deux enzymes clés de la synthèse d'aldostérone – *CYP21* et *CYP11B2* – et du récepteur à l'angiotensine II (le sécrétagogue naturel de l'aldostérone), *AT1R*. Nous avons par ailleurs montré que la production excessive d'aldostérone chez les souris ΔCat, pouvait être maîtrisée par un régime enrichi en quercétine, un inhibiteur naturel de l'activité transcriptionnelle de la ßcaténine.

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance de la voie Wnt/ßcaténine dans la tumorigenèse surrénalienne et dans l'hypersécrétion d'aldostérone ce qui fait d'elle une nouvelle cible thérapeutique potentielle.