HAL
open science

Rôle des voies de signalisation AMPc/PKA et Wnt/bêta-caténine dans la formation des systèmes de régulation aberrants au sein de la corticosurrénale

Julie Le Mestre

To cite this version:

Julie Le Mestre. Rôle des voies de signalisation AMPc/PKA et Wnt/bêta-caténine dans la formation des systèmes de régulation aberrants au sein de la corticosurrénale. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR055 . tel-02293792

HAL Id: tel-02293792

https://theses.hal.science/tel-02293792v1

Submitted on 22 Sep 2019

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.

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Rôle des voies de signalisation AMPc/PKA et Wnt/β-caténine dans la formation des systèmes de régulation aberrants au sein de la corticosurrénale

Présentée et soutenue par

Julie LE MESTRE

Thèse soutenue publiquement le vendredi 21 Septembre 2018 devant le jury composé de		
Mr Olivier CHABRE	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU de Grenoble	Rapporteur
Mr Bruno RAGAZZON	Directeur de Recherche INSERM, Institut Cochin, Paris	Rapporteur
Mme Nathalie RIVES	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU de Rouen Normandie	Examinatrice
Mme Sylvie CLAEYSEN	Chargée de Recherche INSERM, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier	Examinatrice
Mme Estelle LOUISET	Chargée de Recherche INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Co-encadrante de thèse
Mr Hervé LEFEBVRE	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr Hervé LEFEBVRE et co-encadrée par le Dr Estelle LOUISET, Unité INSERM U1239, Laboratoire de Différenciation & Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Mont-Saint-Aignan.

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

DC2N

Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Role of cAMP/PKA and Wnt/β-catenin signaling pathways in the occurrence of aberrant regulatory systems within the adrenal cortex

Présentée et soutenue par

Julie LE MESTRE

Thèse soutenue publiquement le vendredi 21 Septembre 2018 devant le jury composé de		
Mr Olivier CHABRE	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU de Grenoble	Rapporteur
Mr Bruno RAGAZZON	Directeur de Recherche INSERM, Institut Cochin, Paris	Rapporteur
Mme Nathalie RIVES	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, CHU de Rouen Normandie	Examinatrice
Mme Sylvie CLAEYSEN	Chargée de Recherche INSERM, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier	Examinatrice
Mme Estelle LOUISET	Chargée de Recherche INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Co-encadrante de thèse
Mr Hervé LEFEBVRE	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, INSERM U1239, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Pr Hervé LEFEBVRE et co-encadrée par le Dr Estelle LOUISET, Unité INSERM U1239, Laboratoire de Différenciation & Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Mont-Saint-Aignan.

UNIVERSITÉ DE ROUEN NORMANDIE

ED 497 NBISE Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

DC2N

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Unité INSERM U1239, dirigée par le Docteur Youssef Anouar que je remercie pour son accueil et pour avoir mis à ma disposition les moyens indispensables à la réalisation de ce travail.

Je remercie chaleureusement ***Monsieur le Professeur Olivier Chabre****, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier au CHU de Grenoble, pour me faire l'honneur de juger mon travail en qualité de rapporteur externe. Je le remercie également pour notre collaboration qui m'a permis de réaliser une partie de mon travail.*

Je souhaiterais exprimer toute ma gratitude à ***Monsieur le Docteur Bruno Ragazzon****, Directeur de Recherche INSERM à l'Institut Cochin, pour me faire l'honneur de juger mon travail en qualité de rapporteur externe.*

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à ***Madame le Professeur Nathalie Rives****, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier au CHU de Rouen, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.*

J'adresse mes vifs remerciements à ***Madame le Docteur Sylvie Claeysen****, Chargée de Recherche INSERM à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Montpellier, qui a accepté de juger mon travail. Son expertise dans le domaine de la sérotonine et de ses récepteurs est particulièrement appréciée.*

Je tiens à remercier ***Monsieur le Professeur Hervé Lefebvre*** *et* ***Madame le Docteur Estelle Louiset*** *pour avoir encadré mon travail durant ces trois années de thèse. Je leur suis reconnaissante pour leurs précieux conseils, les méthodes de travail et le savoir qu'ils m'ont transmis. Je souhaite leur témoigner tout mon respect et ma gratitude.*

Résumé de la thèse

Dans la majorité des cas, l'hypersécrétion de cortisol résulte d'un adénome hypophysaire sécrétant de l'ACTH (maladie de Cushing). Plus rarement, le syndrome de Cushing est la conséquence d'un adénome corticosurrénalien unilatéral ou d'une hyperplasie bilatérale des surrénales (HMBS) sécrétant du cortisol. Ces deux pathologies appartiennent à la catégorie des hypercortisolismes dits ACTH-indépendants en raison des taux plasmatiques effondrés d'adrénocorticotrophine (ACTH). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la sécrétion accrue de cortisol par ces lésions sont longtemps restés méconnus. Au cours des dernières années, des avancées considérables ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie du syndrome de Cushing. Deux grands types d'anomalies paraissent impliqués dans la pathogénie de l'hypercortisolisme : des mutations germinales et somatiques activant des voies de signalisation intracellulaires et l'expression illégitime de récepteurs membranaires. Dans la surrénale humaine normale, la sérotonine (5-HT), synthétisée et libérée par les mastocytes sous-capsulaires, stimule la sécrétion des corticostéroïdes *via* son récepteur 5-HT_4. Ce dernier est principalement localisé à la surface des cellules de la zone glomérulée mais faiblement exprimé au niveau des cellules de la zone fasciculée, expliquant l'action stimulante prédominante de la 5-HT sur la sécrétion d'aldostérone. Dans la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales, l'activation de la voie AMPc/PKA par une mutation du gène *PRKAR1A* est responsable d'une surexpression de la tryptophane hydroxylase (TPH) de type 2, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT, et des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7 couplés positivement à la voie AMPc/PKA dans les cellules cortisolosécrétrices. Chez l'Homme, la sécrétion de cortisol est physiologiquement stimulée par l'ACTH également *via* la voie AMPc/PKA. Les patients souffrant de maladie de Cushing, d'un syndrome de Cushing paranéoplasique (paraCS), d'un déficit en 21-hydroxylase ou d'HMBS présentent des taux d'ACTH plasmatique ou intrasurrénalienne élevés. Chez ces patients, nous montrons que la stimulation chronique de la voie AMPc/PKA par l'ACTH provoque une surexpression de la TPH de type 1, du récepteur eutopique 5-HT_4 et des récepteurs ectopiques 5-HT_6 et 5-HT_7 dans les cellules stéroïdogènes. Pour l'un des patients avec paraCS, nous avons pu montrer que les cellules corticosurrénaliennes en culture sécrètent du cortisol en réponse à la 5-HT ou à des agonistes des récepteurs 5-HT_4 ou 5-HT_7. Par ailleurs, le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans l'apparition des récepteurs illégitimes reste controversé. Nous avons donc évalué l'expression des récepteurs 5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7, du LH-R et du GIP-R dans une tumeur corticosurrénalienne avec mutation germinale du gène *APC* et deux modèles d'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien, incluant des souris génétiquement modifiées et des cellules corticosurrénaliennes humaines en culture primaire. Nos résultats indiquent que l'activation de la voie Wnt/β-caténine favorise une surexpression significative du LH-R dans les 3 modèles étudiés. Globalement, les données issues de notre travail montrent que l'activation de voies de signalisation intracellulaire, comme la voie AMPc/PKA par l'ACTH ou la voie Wnt/β-caténine par des mutations génétiques, favorise l'émergence de systèmes de régulation surrénaliens aberrants. Ils indiquent en outre que la 5-HT intrasurrénalienne est impliquée dans l'hypersécrétion de corticostéroïdes associée à différentes pathologies incluant la maladie de Cushing et le syndrome de Cushing paranéoplasique, le bloc en 21-hydroxylase et l'HMBS. Le recours à des inhibiteurs sélectifs de la tryptophane hydroxylase pourrait donc permettre de réduire l'excès de stéroïdes chez les patients atteints de ces affections.

Mots clés : surrénale, cortisol, ACTH, sérotonine, Wnt/β-caténine, AMPc/PKA, RCPG.

Abstract

In most cases, cortisol hypersecretion (Cushing's syndrome; CS) results from ACTH-producing pituitary adenoma (Cushing's disease). Occasionally, CS is the consequence of a unilateral adrenal adenoma or a bilateral macronodular adrenal hyperplasia (BMAH) producing cortisol. In these conditions, hypercortisolism is referred to as "ACTH-independent" owing to suppressed plasma ACTH levels. The molecular mechanisms underlying the maintenance of cortisol hypersecretion by adrenocortical adenomas and BMAHs in the absence of circulating ACTH has long remained unknown. However, major advances have been made during the past recent years in the comprehension of the pathophysiology of primary adrenal CS. Two main types of molecular defects have been shown to favor cortisol hypersecretion by adrenocortical neoplasms: somatic mutations responsible for activation of intracellular signaling pathways and abnormally expressed (or illegitimate) membrane receptors by tumor cells. In the human adrenal gland, serotonin (5-HT), released by subcapsular mast cells stimulates corticosteroid secretion through activation of its type 4 receptor (5-HT_4R). The 5-HT_4R is principally expressed in zona glomerulosa cells but weakly expressed in zona fasciculata cells explaining why 5-HT strongly stimulates aldosterone production. Interestingly, in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) cells, activation of the cAMP/PKA pathway by *PRKAR1A* mutations triggers upregulation of the 5-HT synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase (TPH) type 2 together with the 5-HT_4, 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors, positively coupled to cAMP/PKA signaling pathway. 5-HT strongly stimulates cortisol production and inhibition of TPH reduced corticosteroidogenesis in cultured PPNAD cells. In human, cortisol secretion is normally stimulated by ACTH also through activation of the cAMP/PKA signaling pathway. Patients suffering from Cushing's disease, paraneoplastic Cushing's syndrome (paraCS), 21-hydroxylase deficiency or BMAH display high plasma or intraadrenal ACTH levels. In these patients, we show that chronic stimulation of cAMP/PKA pathway by ACTH induces TPH type 1 and 5-$HT_{4/6/7}$ receptors overexpression in steroidogenic cells. In primary cultured adrenocortical cells originating from a patient with paraCS, 5-HT and 5-$HT_{4/7}$ receptors agonists were able to activate cortisol secretion. On the other hand, the role of Wnt/β-catenin signaling pathway in the emergence of illegitimate receptors is still debated. We therefore evaluated 5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7, LH/hCG and GIP receptors expression in an adrenocortical tumor with *APC* germline mutation and two experimental models of constitutive activation of β-catenin in adrenocortical cells, namely genetically modified mice and human transfected adrenocortical cells. Our results indicate that Wnt/β-catenin pathway activation promotes significant overexpression of LH/hCG receptor in the 3 models investigated.

Globally, our data show that activation of intracellular signaling pathways such as the cAMP/PKA pathway by ACTH or Wnt/β-catenin by genetic mutations favors the emergence of abnormal regulatory systems in the adrenal cortex. Our results also demonstrate that intraadrenal 5-HT is involved in corticosteroids hypersecretion related to different diseases including Cushing's disease, paraneoplastic Cushing's syndrome, 21-hydroxylase deficiency and BMAH. TPH inhibitors may thus represent a new therapeutic approach of corticosteroid excess in patients suffering from these disorders.

Key words : adrenal, cortisol, ACTH, serotonin, Wnt/β-catenin, cAMP/PKA, GPCR.

Sommaire

RESUME DE LA THESE **9**

ABSTRACT **11**

SOMMAIRE **13**

TABLE DES ILLUSTRATIONS **17**

LISTE DES ABREVIATIONS **19**

INTRODUCTION **25**

I. La glande surrénale 25

A. Histoire de la glande surrénale 25

B. Situation anatomique et présentation de la glande surrénale 25

C. Origine embryologique de la glande surrénale 25

D. Histologie de la glande surrénale 27

1. Mise en place des zones corticales 29

2. Etude de la zonation et du renouvellement cellulaire chez les rongeurs 30

3. Mise en place et renouvellement du cortex surrénalien chez l'Homme 38

E. Vascularisation et innervation des glandes surrénales 41

F. Stéroïdogenèse surrénalienne 43

1. Entrée et stockage du cholestérol 43

2. Mobilisation du cholestérol 45

3. Synthèse des hormones stéroïdiennes 45

G. Les sécrétions surrénaliennes 47

1. Fonction minéralocorticoïde 47

2. Fonction glucocorticoïde 50

3. Régulation paracrine de la sécrétion des corticostéroïdes 54

4. Anomalies de la sécrétion des hormones corticosurrénaliennes 59

II. La sérotonine 75

A. Mise en évidence de la sérotonine 75
B. Biosynthèse 76
C. Stockage, libération et transport 77
D. Recapture et catabolisme de la 5-HT 78
E. Récepteurs sérotoninergiques 79
1. Identification et classification des récepteurs de la sérotonine 80
2. Distribution et fonction des récepteurs sérotoninergiques 81
F. Principales fonctions de la sérotonine 82
1. La sérotonine comme neurotransmetteur 82
2. Rôle périphérique de la sérotonine 83
G. Sérotonine et thérapeutique 87
1. Traitement de la migraine 87
2. Traitement des nausées 87
3. Traitement des désordres comportementaux 88
H. Anomalies de la synthèse de 5-HT 89
1. Toxicité de la sérotonine 89
2. L'adénome de Conn 89
3. Lésions surrénaliennes à l'origine d'un syndrome de Cushing 90
4. Le PPNAD 91
OBJECTIFS DE L'ETUDE 95
MATERIEL ET METHODES 99
RESULTATS 111
Article 1 : Uprégulation illicite de la signalisation sérotoninergique dans les surrénales de patients exposées à des taux élevés d'ACTH plasmatique ou intrasurrénalienne 111
Article 2 : L'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes favorise l'expression du récepteur à l'hormone lutéinisante 163
Article 3 : Désorganisation anatomique et fonctionnelle du cortex surrénalien au cours de la maladie de Cushing et du déficit en 21-OH. 199

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **221**

I. Effets de la stimulation chronique par l'ACTH 221

A. Voie de signalisation sérotoninergique 221

B. Modifications histologiques et fonctionnelles 226

II. Impact de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression de récepteurs illégitimes 228

A. Récepteurs illégitimes dans un cas d'adénome surrénalien muté pour le gène *APC* 228

B. Étude de l'effet de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des récepteurs illégitimes corticosurrénaliens 230

1. Expression des récepteurs illégitimes dans la lignée de cellules corticosurrénaliennes humaines H295R : impact de l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine 230

2. Activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes humaines et dans le cortex surrénalien dans le modèle murin génétiquement modifié ΔCat : impact sur l'expression des récepteurs illégitimes surrénaliens 232

C. Synthèse 232

III. Conclusion et perspectives 234

A. Perspectives expérimentales 234

B. Perspectives cliniques et thérapeutiques 235

RÉFÉRENCES **239**

Table des illustrations

Figure 1 : Origine embryologique de la glande surrénale humaine 27
Figure 2 : Organisation histologique de la glande surrénale humaine chez l'adulte..... 28
Figure 3 : Organisation histologique de la glande surrénale humaine chez le fœtus d'environ 5 mois 29
Figure 4 : Fonctionnement de la voie Sonic HedgeHog (SHH)..... 31
Figure 5 : Présentation de la voie Wnt/β-caténine 34
Figure 6 : Couplage du récepteur des mélanocortines de type 2 (MC2-R) à la voie AMPc/PKA 37
Figure 7 : Modèle de l'antagonisme des voies de signalisation Wnt/β-caténine et AMPc/PKA dans les cellules corticosurrénaliennes murines..... 38
Figure 8 : Vascularisation de la glande surrénale humaine..... 42
Figure 9 : Schéma illustrant les mécanismes d'importation du cholestérol dans la cellule stéroïdogène corticosurrénalienne..... 44
Figure 10 : Schéma de la stéroïdogenèse surrénalienne chez l'Homme 46
Figure 11 : Régulation de la sécrétion des minéralocorticoïdes chez l'Homme 49
Figure 12 : Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes par l'axe hypothalamo-hypophysaire chez l'Homme..... 52
Figure 13 : Régulation paracrine des sécrétions d'aldostérone et de cortisol dans la surrénale humaine 55
Figure 14 : Schéma illustrant la physiopathologie du bloc en 21-hydroxylase 60
Figure 15 : Régulation de la synthèse d'aldostérone en conditions physio- et pathologiques. 62
Figure 16 : Illustration des principaux signes cliniques observables au cours du syndrome de Cushing..... 65
Figure 17 : Schéma illustrant la physiopathologie de la maladie de Cushing..... 66
Figure 18 : Schéma illustrant la physiopathologie du syndrome de Cushing paranéoplasique67
Figure 19 : Mécanismes physiopathologiques des hypercortisolismes primaires..... 68
Figure 20 : Schéma illustrant l'implication supposée d'ARMC5 dans le syndrome de Cushing 75
Figure 21 : Biosynthèse et dégradation de la sérotonine..... 77
Figure 22 : Schéma illustrant le fonctionnement d'une synapse sérotoninergique..... 79
Figure 23 : Les récepteurs de la sérotonine..... 80

Figure 24 : Mécanismes potentiels de la régulation de la dégranulation des mastocytes surrénaliens et contrôle de la sécrétion d'aldostérone 86
Figure 25 : Physiopathologie de l'adénome de Conn. 90
Figure 26 : Physiopathologie de la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (PPNAD). 92
Figure 27 : Schéma montrant le couplage du récepteur 5-HT_7 dans la lignée cellulaire de cancer mammaire MDA-MB-231 223
Figure 28 : Effets de l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des ARNm codant LEF1, AXIN2 et les récepteurs 5-HT_4, 5-HT_7, GIP-R et LH-R dans les cellules H295R. 230
Figure 29 : Effets de l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des ARNm codant LEF1, AXIN2 et les récepteurs 5-HT_4, 5-HT_7, GIP-R et LH-R dans les cellules transfectées H295R 231
Figure 30 : Expression du facteur de transcription GATA4 dans les cellules corticosurrénaliennes humaines transfectées 233

Liste des abréviations

A
AA : antibiotique-antimycotique
ACTH : adrénocorticotrophine ou hormone corticotrope
ADH : anti-diuretic hormone
ADN : acide désoxyribonucléique
AngII : angiotensine II
AMP(c) : adénosine monophosphate (cyclique)
APA : adénome producteur d'aldostérone
APC : adenomatous polyposis coli
ARMC5 : armadillo repeat containing 5
ARN : acide ribonucléique
AT-1/AT-2 : angiotensine receptor type 1/2
ATP : adenosine triphosphate
AVP : arginine-vasopressine
AXIN1/AXIN2 : axis inhibition protein 1/2

B
BHE : barrière hémato-encéphalique

C
CamKII : Ca 2+ /calmodulin-dependent protein kinase
CBG : corticosteroid binding globulin
CREB : cAMP-responsive element binding protein
CREM : cAMP responsive element modulator
CRH : corticotropin releasing hormone ou corticolibérine
CTRP-1 : complement-C1q/tumor necrosis factor-α related protein 1

D
DAB2 : disabled homolog 2
DHEA : déhydroépiandrostérone
DHEA-S : déhydroépiandrostérone sulfatée
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

E
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine I
EGF : epidermal growth factor
ENaC : epithelial sodium channel
ERK : extracellular-signal-regulated kinase
ET-1 : endothéline
ET_A/ET_B : récepteur de l'endothéline de type A/B

F
FAdE : fetal adrenal enhancer
FAP : familial adenomatous polyposis coli
FGF : fibroblast growth factor
FH : fumarate hydratase
Fzd : Frizzled

G
GIP : gastric inhibitory polypeptide
GIP-R : gastric inhibitory polypeptide receptor
GLI1/2/3 : glioma-associated oncogene 1/2/3
GnRH : gonadotropin-releasing hormone ou gonadolibérine
GR : glucocorticoids receptor
GSK3β : glycogene synthase kinase 3β

H
HCS : hyperplasie congénitale des surrénales
HDL : high-density lipoproteins
HMBS : hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales
HMG CoA : hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase
HSL : hormone-sensitive lipase

I
IL-1: interleukine de type 1
IL-6 : interleukine de type 6
IMAO : inhibiteur de la monoamine oxydase
INSL3 : insulin-like 3
IP3 : inositol triphosphate
IRS : inhibiteur de recapture de la sérotonine

L
LDL : low-density lipoproteins
LDL-R : low-density lipoproteins receptor
LEF1 : lymphoid enhancer-binding factor 1
LH : luteinizing hormone
LH-R : luteinizing hormone receptor
LRP5/6 : LDL-related protein 5/6

M
MAO : monoamine oxydase
MC2-R : melanocortin-2 receptor
MR : mineralocorticoids receptor
MRAP : melanocortin-2 receptor associated protein
mTOR : mammalian target of rapamycin

N
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nGRE : negative glucocorticoid response element
NPY : neuropeptide Y

P
PACAP : pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PDE : phosphodiestérase
PKA : protéine kinase A
PLC : phospholipase C
POMC : proopiomélanocortine

PPNAD : primary pigmented nodular adrenal disease
PTCH1 : patched 1

R
RCPG : récepteurs couplés à une protéine G
RT-PCR : real-time polymerase chain reaction

S
SA : semaine d'aménorrhée
SCP-2 : sterol carrier protein 2
SERT : serotonine transporter
SF1 : steroidogenic factor 1
SHH : sonic hedgehog
SMO : smoothened
SNC : système nerveux central
SRA : système rénine-angiotensine
SR-B1 : scavenger receptor class B1
StAR : steroidogenic acute regulatory (protein)
SVF : sérum de veau fœtal

T
TCF : T-cell factor
TNFα : tumor necrosis factor α
TPH1/TPH2: tryptophane hydroxylase de type 1/type 2
TSPO : translocator protein

V
VIP : vasoactive inhibitory peptide
VLDL : very low-density lipoproteins

W
WT1 : wilms tumor 1

Z
ZF : zone fasciculée
ZG : zone glomérulée
ZR : zone réticulée

1,2,3…
3β-HSD2 : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
5-HIA : 5-hydroxy-indole-acétaldéhyde
5-HIAA : 5-hydroxy-indole-acétique
5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HT_X : récepteur sérotoninergique de type X
11β-HSD2 : 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2
11β-OH : 11β-hydroxylase
17α-OH : 17α-hydroxylase
17-OHP : 17-hydroxyprogestérone
21-OH : 21-hydroxylase

Introduction

Introduction

I. La glande surrénale

A. Histoire de la glande surrénale

La glande surrénale a été décrite pour la première fois dans la littérature en 1563 par l'anatomiste italien Bartolomeo Eustachi qui travaillait alors sur le rein. Bien plus tard, en 1805, Georges Cuvier remarque que la surrénale est composée de deux parties ; le cortex et la médulla. Pendant des décennies, les fonctions de cette glande sont restées un mystère. C'est en 1856 que le physiologiste et neurologue français Charles-Édouard Brown-Séquard montre que l'ablation bilatérale des glandes surrénales entraîne la mort de l'animal en moins de 12h (Brown-Séquard, 1893). Il met alors en évidence l'importance physiologique de ces glandes qui contraste avec leur petite taille. En 1893, Oliver et Schäfer décrivent le potentiel hypertensif d'extraits surrénaliens chez le chien (Schäfer, 1908). Quelques années plus tard en 1901, Jokichi Takamine et Thomas B. Aldrich, isoleront l'adrénaline indépendamment l'un de l'autre, (Aldrich, 1901). L'isolement et la synthèse chimique partielle des hormones corticosurrénaliennes sont réalisés en 1946, permettant ainsi à Philip S. Hench, Tadeusz Reichstein et Edward C. Kendall d'utiliser les hormones surrénaliennes pour la première fois en thérapeutique et de recevoir le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1950 (Hench and Kendall, 1949).

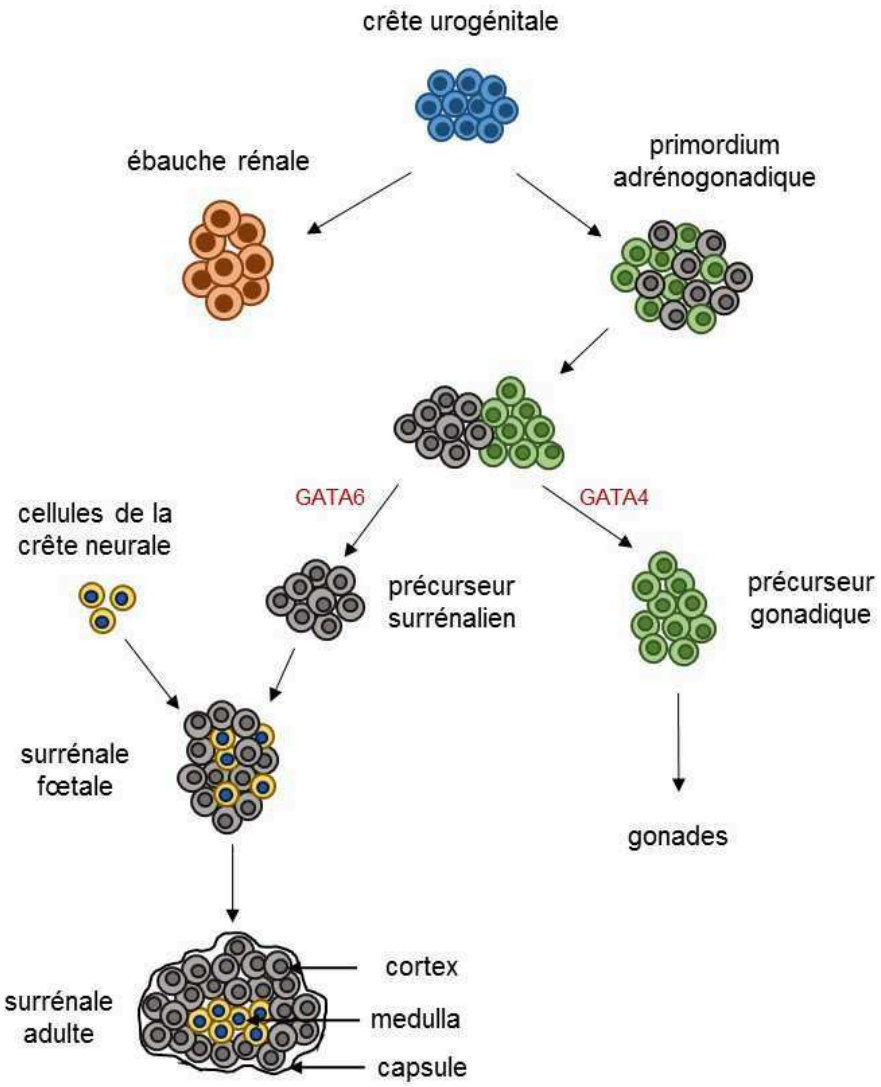
B. Situation anatomique et présentation de la glande surrénale

Chez l'Homme, la glande surrénale est un organe pair situé dans l'espace rétro-péritonéal, au pôle apical des reins. De part et d'autre de la colonne vertébrale, elles sont localisées entre la douzième vertèbre thoracique et la première vertèbre lombaire. Les deux glandes surrénales humaines ont globalement une forme pyramidale à base inférieure. La glande surrénale gauche est légèrement plus petite et plus allongée que la droite, pesant toutes deux environ 5 à 8 g. Cette glande est composée d'une capsule de tissu conjonctif renfermant deux parties ; le cortex et la médulla d'origines embryologiques distinctes et ayant chacune des sécrétions propres.

C. Origine embryologique de la glande surrénale

Durant le développement embryonnaire, le mésoderme intermédiaire donne naissance au cortex tandis que la médulla est issue de l'ectoderme (**Figure 1**). L'organogenèse du cortex surrénalien est dirigée par l'expression successive de différents facteurs de transcription. Le

cortex est primitivement issu de la crête urogénitale, tout comme son voisin anatomique, le rein. Vers 6 semaines d'aménorrhée (SA), les cellules de l'épithélium cœlomique et les cellules mésenchymateuses migrent en arrière des ébauches génitales pour former le primordium adrénogonadique (Keene and Hewer, 1927). Cette agrégation de cellules est permise par l'expression du facteur de transcription SF1 (*steroidogenic factor* 1, initialement appelé Ad4BP) dont l'expression est également essentielle pour la formation de la glande surrénale et la stéroïdogenèse (Lala *et al.*, 1992; Luo *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1996). Les mutations inactivatrices de SF1 sont d'ailleurs une cause d'hypoplasie surrénalienne. À ce stade du développement, l'expression de SF1 est contrôlée par WT1 (*wilms tumor* 1) qui se fixe sur le promoteur de SF1. Une fois l'expression de SF1 induite, WT1 devient indétectable dans la surrénale excepté dans les cellules mésenchymateuses qui formeront la capsule (Bandiera *et al.*, 2013). SF1 continue cependant d'être exprimé dans les cellules stéroïdogènes car, une fois son expression stimulée, il est capable de se fixer au niveau de la séquence FAdE (*fetal adrenal enhancer*) sur son promoteur et de stimuler sa propre synthèse (Zubair *et al.*, 2006). Les cellules prolifèrent entre 8 et 10 SA et à l'issue de cette 10e semaine, le primordium surrénalien se sépare de celui des gonades sous l'influence des facteurs de transcription GATA6, qui oriente vers un phénotype surrénalien, et GATA4, qui permet la différenciation gonadique (Busada and Cidlowski, 2017). La formation de la médullosurrénale, partie centrale de la glande surrénale, débute vers 8 SA lorsque les phéochromoblastes dérivés des crêtes neurales migrent à travers l'ébauche surrénalienne pour former la future médulla. Il ne s'agit pas d'une médulla distincte à ce stade mais de petits groupes de cellules chromaffines dispersés dans le futur cortex surrénalien (Obinu *et al.*, 2016). Enfin, le primordium surrénalien s'entoure d'une capsule conjonctive vers 10 SA. Le cortex surrénalien est fonctionnel autour de 9 SA chez l'Homme, puisqu'il est déjà capable de produire des androgènes (Kaludjerovic and Ward, 2012).



<u>Figure 1</u> : Origine embryologique de la glande surrénale humaine. Le primordium adrénogonadique donnera naissance aux précurseurs surrénalien et gonadique sous l'influence des facteurs de transcription GATA6 et GATA4, respectivement.

D. Histologie de la glande surrénale

La médulla, ou médullosurrénale, est la partie la plus centrale de la glande. Chez l'Homme, la médulla n'adopte son histologie définitive qu'après la naissance, entre 12 et 18 mois, lorsque les cellules se regroupent au cœur de la glande (Crowder, 1957). Les cellules chromaffines matures produiront l'adrénaline (80%) et la noradrénaline (20%) synthétisées à partir de la tyrosine. Ces médiateurs sont stockés dans des vésicules de sécrétion et libérés par exocytose.

Le cortex surrénalien, également appelé « corticosurrénale », est la partie externe de la glande surrénale et représente environ 90% de la glande surrénale saine chez l'Homme adulte.

Il est composé de trois couches concentriques distinctes, décrites pour la première fois en 1866 par le pathologiste allemand Julius Arnold (Arnold, 1866). Ces trois zones diffèrent par leur morphologie et leur fonction dont voici une brève présentation de la périphérie vers le centre (**Figure 2**) :

- La zone glomérulée (ZG), située sous la capsule, est la zone la plus externe et la plus fine. Les cellules stéroïdogènes y sont organisées en glomérules, depuis peu également appelés « rosettes » (Harding *et al.*, 2014). C'est le lieu de synthèse des hormones minéralocorticoïdes et plus particulièrement de l'aldostérone.
- La zone fasciculée (ZF) représente environ 80% de la corticosurrénale. Elle est organisée en faisceaux de cellules perpendiculaires à la capsule. C'est le lieu de production des glucocorticoïdes dont le chef de file est le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez le rongeur.
- La zone réticulée (ZR) est formée de petites cellules qui sécrètent les androgènes : la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté (DHEA-S) ainsi qu'une faible quantité d'androstènedione. Leur activité biologique, faible en conditions physiologiques, provient surtout de leur conversion en testostérone et di-hydroxy-testostérone dans les tissus périphériques. Les androgènes sont principalement impliqués dans le développement des caractères sexuels secondaires. Nous ne développerons pas en détail le rôle des androgènes surrénaliens.

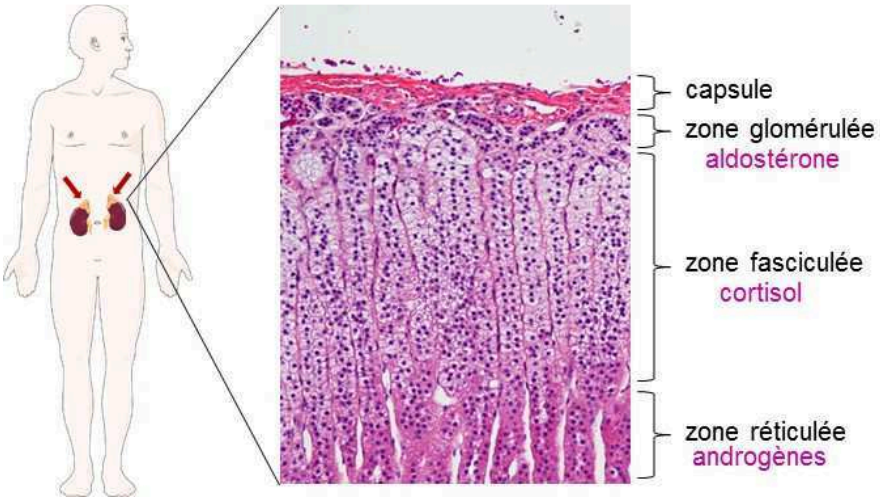


Figure 2 : Organisation histologique de la glande surrénale humaine chez l'adulte. La zone glomérulée est le lieu de production de l'aldostérone, la zone fasciculée est le lieu de synthèse du cortisol tandis que les cellules de la zone réticulée produisent les androgènes.

Chaque zone ne produit pas la même quantité de corticostéroïdes par jour ; la production d'aldostérone nécessaire au contrôle de l'équilibre hydrosodé est 100 à 1000 moins importante

que la quantité de cortisol nécessaire au contrôle du métabolisme des glucides (aldostérone 100-150 µg/jour, cortisol 10-20 mg/jour), tandis que la production de DHEA-S varie entre 7 et 15 mg/jour (Arlt and Stewart, 2005).

1. Mise en place des zones corticales

D'un point de vue embryologique, la maturation histologique du cortex surrénalien nécessite une succession d'étapes qui s'étend de la vie embryonnaire à la fin de l'adolescence. *In utero*, la mise en place du cortex primitif est marquée par l'apparition des zones définitive et fœtale entre les 10e et 12e SA. La zone définitive forme une fine bande de cellules compactes sous la capsule tandis que la zone fœtale, localisée juste en dessous, occupe 80 à 90% du cortex primitif (**Figure 3**). Un troisième feuillet, appelé zone de transition et possédant des caractéristiques intermédiaires, fait son apparition dans le cortex vers 24 SA, il se place entre les deux feuillets préexistants (Mesiano and Jaffe, 1997). Les zones définitive et de transition donneront respectivement naissance à la ZG et à la ZF (Mesiano *et al.*, 1993).

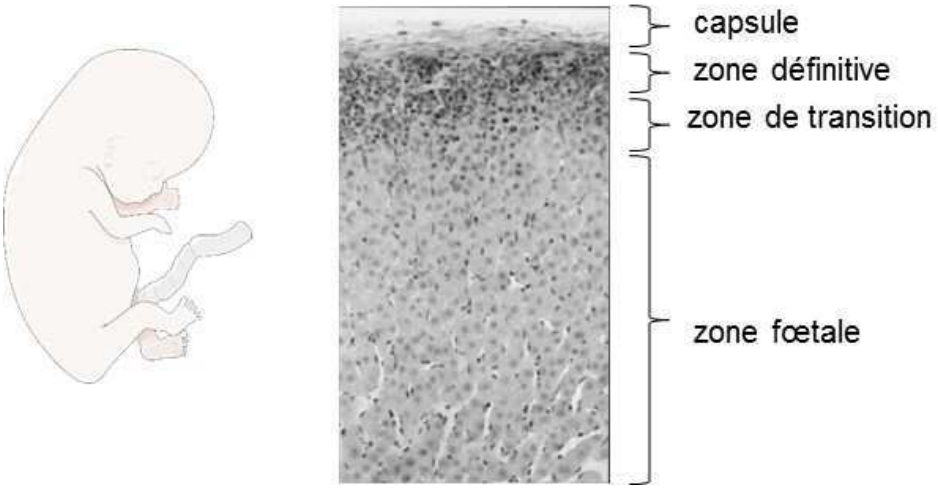


Figure 3 : Organisation histologique de la glande surrénale humaine chez le fœtus d'environ 5 mois. Les zones définitive et de transition donneront respectivement naissance à la zone glomérulée et à la zone fasciculée. La zone fœtale régresse et n'est pas présente à l'âge adulte. Adapté d'après (Mesiano and Jaffe, 1997).

Durant la vie intra-utérine, l'activité de la glande surrénale fœtale est cruciale puisque la zone fœtale produit la DHEA-S nécessaires à la synthèse d'estrogènes par le placenta (Belgorosky *et al.*, 2009). Ces sécrétions d'androgènes participent au développement du fœtus et sont également impliquées dans la préparation à l'accouchement (Pepe and Albrecht, 1995). En fin de gestation, la future ZG exprime toutes les enzymes nécessaires à la synthèse de minéralocorticoïdes (Ishimoto and Jaffe, 2011). La zone fœtale commence à régresser dès la première semaine de vie post-natale et aura entièrement disparu à la fin du 3e mois de vie. Il

semblerait que cette involution de la zone fœtale soit déclenchée par la parturition elle-même (Ben-David *et al.*, 2007). La zone de transition commence à produire des glucocorticoïdes dès 27 SA, indispensables à la maturation des organes du fœtus (poumons, intestin, pancréas, foie) et au développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Brooks *et al.*, 1996; Bolt *et al.*, 2001; Challis *et al.*, 2001). La formation de la ZR, entre la ZF et la médulla, débute tardivement chez l'Homme lors d'un processus appelé « adrénarche » (fille 6-8 ans, garçon 7-9 ans) (Xing *et al.*, 2015). La surrénale adoptera son histologie adulte entre 10 et 20 ans chez l'Homme (Mesiano and Jaffe, 1997).

Les mécanismes permettant la différenciation des cellules stéroïdogènes et la mise en place des différents feuillets composant le cortex surrénalien chez l'Homme restent à élucider. La taille relative de chaque zone est proportionnelle à son activité stéroïdogène. En effet, le cortex est capable de s'adapter en fonction des besoins physiologiques. Cette formidable capacité d'adaptation a largement été étudiée chez les rongeurs (Brennan 2008, Pignatelli 2000). La plasticité des différentes zones et le renouvellement cellulaire permanent observé dans le cortex des souris ont conduit les chercheurs à s'intéresser aux cellules progénitrices permettant d'alimenter ces mécanismes.

2. Etude de la zonation et du renouvellement cellulaire chez les rongeurs

2.1. Les progéniteurs capsulaires

En 1883, Gottschau est le premier à suggérer que les cellules progénitrices sont issues de la capsule et migrent de façon centripète pour donner naissance aux différentes zones décrites au début de ce chapitre (Gottschau, 1883). Une soixantaine d'années plus tard, les expériences d'énucléation de la glande surrénale (ablation partielle de la surrénale par extraction de l'intérieur de la glande) chez le rat ont mis en évidence une régénération complète de la glande surrénale à partir de la capsule et des cellules sous-capsulaires résiduelles restées en place, soutenant l'hypothèse émise par Gottschau concernant la localisation des cellules progénitrices en périphérie du cortex (Greep and Deane, 1949). Un demi-siècle supplémentaire sera nécessaire pour que des preuves moléculaires de ces observations soient apportées. La dernière décennie a vu naître un nombre considérable d'études concernant les progéniteurs capsulaires chez la souris. Dès 2007, l'équipe de Gary Hammer émet l'hypothèse que la capsule pourrait être un réservoir de cellules pluripotentes indifférenciées capables de régénérer le cortex chez la souris (Kim and Hammer, 2007). Cette hypothèse a été renforcée peu de temps après par la

mise en évidence de progéniteurs situés dans la capsule ou juste en dessous de celle-ci (Dunn *et al.*, 2009; King *et al.*, 2009). Les progéniteurs sont caractérisés par l'absence de stockage de cholestérol (négatif pour le *Nile Red*) et d'expression des enzymes de la stéroïdogenèse (King *et al.*, 2009). Les études se sont intéressées aux voies de signalisation mises en jeu dans le renouvellement cellulaire, notamment la voie de signalisation HedgeHog connue pour jouer un rôle dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire. Sonic HedgeHog (SHH chez l'Homme, Shh chez la souris) appartient à une famille de ligands extracellulaires capables d'activer la voie HedgeHog. En l'absence de SHH, le récepteur à 12 domaines transmembranaires Patched 1 (PTCH1) inhibe l'activité du récepteur à 7 domaines transmembranaires Smoothened (SMO) (Watson *et al.*, 2010). Suite à la fixation de SHH sur PTCH1, la levée d'inhibition de SMO entraîne la libération des facteurs de transcription de la famille GLI (*glioma-associated oncogene* ; GLI1, GLI2, GLI3). Le facteur de transcription GLI1 est considéré comme activateur uniquement, GLI2 et GLI3 ayant quant à eux des activités d'activation et de répression (Laufer *et al.*, 2012). En l'absence de ligand, GLI2 et GLI3 sont la cible du protéasome qui leur permet d'adopter la forme répressive. En présence de SHH, la libération des membres de la famille GLI a pour conséquence la transcription des gènes cibles de la voie SHH (**Figure 4**).

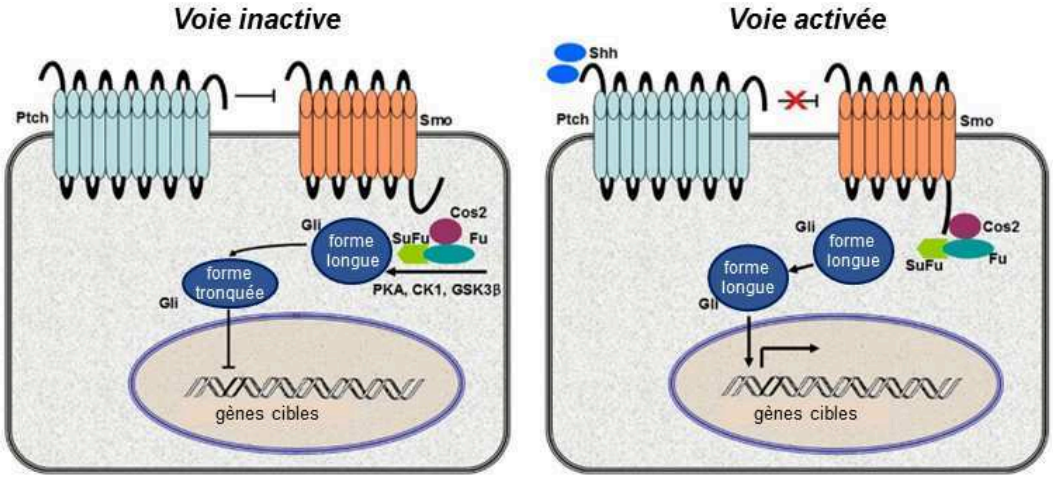


Figure 4 : Fonctionnement de la voie Sonic HedgeHog (SHH). En l'absence de ligand de la famille HedgeHog, le récepteur Ptch inhibe Smo permettant au complexe Cos2-Fu-SuFu de se lier à la forme longue de Gli. Gli est alors phosphorylé par la GSK3β, la PKA et la CK1. Ceci induit le clivage de la forme longue de Gli en forme tronquée qui est transloquée dans le noyau pour inhiber la transcription (voie inactive). En présence de ligand HH, Ptch ne peut pas inhiber Smo, permettant à Smo d'interagir avec Cos2. Le complexe Cos2-Fu-SuFu ne peut plus interagir avec Gli. Gli peut alors entrer dans le noyau et induire la transcription des gènes cibles (voie activée). **Ptch** : Patched, **Smo** : Smoothened, **GSK3β** : glycogène synthase kinase 3β, **CK1** : caséine kinase 1. Adapté d'après (Hu *et al.*, 2015).

Il existe, dans la surrénale murine adulte, 2 populations distinctes de progéniteurs ; les cellules stéroïdogènes Sf1 positives (Sf1+) situées dans la région sous-capsulaire et capables de sécréter la protéine Shh, et les cellules Gli1+ recevant le signal Shh (King *et al.*, 2008). Ces dernières sont localisées dans la capsule et représentent la population majoritaire (King *et al.*, 2009). Chez le rat, des cellules produisant Shh sont également retrouvées au niveau de la capsule (Guasti *et al.*, 2011). L'utilisation de souris invalidées pour le gène codant Shh spécifiquement dans le cortex surrénalien a mis en évidence l'importance de cette voie dans le développement du cortex. Ces souris mutantes présentaient en effet une hypoplasie du cortex et une atrophie de la capsule (Ching and Vilain, 2009; King *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010). Notons que l'absence de Shh n'impactait pas la différenciation des cellules ni la capacité à produire les corticostéroïdes (Huang *et al.*, 2010).

Une troisième population de cellules exprimant WT1 et résidant plus profondément dans la capsule, pourrait être considérée comme le contingent de cellules « chaperonnes ». Au stade fœtal, le facteur de transcription WT1 a un effet répresseur sur Sf1 (Bandiera *et al.*, 2013). Il en résulte une inhibition de la différenciation en cellule stéroïdogène, permettant le maintien du stock de progéniteurs surrénaliens. De plus, l'équipe de F. Beuschlein a montré que, chez des souris CE/J mâles gonadectomisées, les cellules WT1+ perdent l'expression de WT1 pour acquérir une différenciation gonadique marquée par l'expression de Sf1, Gata4, Cyp17 et du récepteur à l'hormone lutéinisante (*luteinizing hormone* ; Lh-r) (Johnsen *et al.*, 2006). Ces travaux confirment l'hypothèse de R. Bandiera et collaborateurs, à savoir que les cellules WT1+ possèdent une identité proche des cellules composant le primordium adréno-gonadique.

2.2. Le renouvellement du cortex chez le rongeur

Quelle est donc la fonction de ces progéniteurs capsulaires ? Les cellules Gli1+ sont capables de régénérer la population de cellules Shh+, phénomène plus fréquent chez l'embryon murin que chez la souris adulte (Dörner *et al.*, 2017). Grâce à des expériences de lignage cellulaire réalisées chez des souris génétiquement modifiées, l'équipe de D.T. Breault a mis en évidence une migration centripète des progéniteurs de la capsule vers le cortex profond au cours de leur différenciation (Freedman *et al.*, 2013). Enfin, les expériences de suivi du destin des cellules par immunofluorescence ont révélé que ces cellules Shh+ étaient capables de repeupler le cortex en adoptant successivement un phénotype de cellule glomérulée puis de cellule fasciculée au cours de leur migration (King *et al.*, 2009).

L'idée de « zonation fonctionnelle » repose sur l'expression différentielle d'enzymes clés de la stéroïdogenèse menant, chez le rongeur, à la production d'aldostérone par les cellules de la ZG et de corticostérone par celles de la ZF (Rainey, 1999). Quels sont alors les mécanismes qui déterminent le destin de ces progéniteurs ? Quels sont les signaux responsables de cette zonation ? L'implication de deux voies de signalisation ubiquitaires a été étudiée chez la souris.

2.3. Rôle des voies de signalisation Wnt/β-caténine et AMPc/PKA

La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La voie de signalisation Wnt/β-caténine est connue pour être impliquée dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. La β-caténine, codée par le gène *CTNNB1* chez l'Homme (*Ctnnb1* chez la souris), est une protéine ubiquiste. Elle intervient dans la polarité planaire et possède deux principales fonctions dans la cellule. Elle fait partie intégrante des interactions intercellulaires lorsque, en association avec la E-cadhérine, elle forme une jonction adhérente entre les membranes plasmiques. La β-caténine existe aussi sous forme libre dans le cytoplasme où, après le passage dans le noyau, elle exerce un rôle de cofacteur de transcription dans la voie dite canonique (Berthon *et al.*, 2012). En l'absence de ligand extracellulaire appartenant à la famille Wnt (famille de 19 ligands numérotés de 1 à 16 avec différents isoformes), la β-caténine cytoplasmique en excès est phosphorylée au niveau de ses acides aminés sérines et thréonines puis ubiquitinylée afin d'être dégradée par le protéasome (**Figure 5**). Ce complexe de dégradation est notamment composé des suppresseurs de tumeurs AXIN (*axis inhibition protein*) et APC (*adenomatous polyposis coli*), ainsi que de GSK3β (*glycogen synthase kinase-3β*) et CK1α (*casein kinase 1*) (Stamos and Weis, 2013). En présence de Wnt, le récepteur Frizzled (Fzd) à 7 domaines transmembranaires se dimérise avec le corécepteur LRP5/6 (*LDL-related protein* 5/6), puis les membres du complexe de dégradation sont inhibés permettant la libération de la β-caténine. Celle-ci entre ensuite dans le noyau et s'associe à des facteurs de transcription de la famille LEF/TCF (*lymphoide enhancer factor/T cell factor*) pour permettre l'activation transcriptionnelle des gènes cibles (MacDonald *et al.*, 2009).

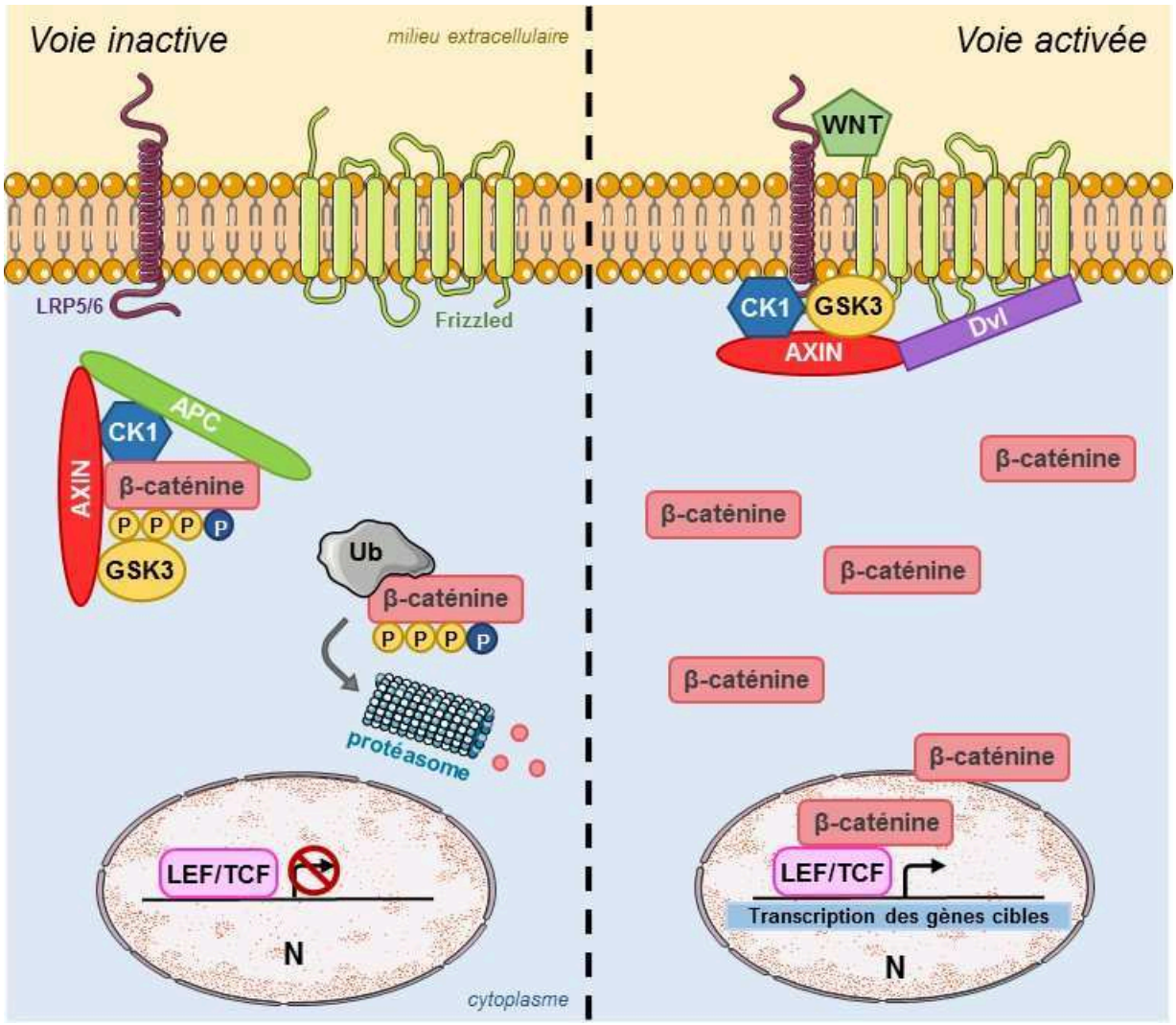


Figure 5 : Présentation de la voie Wnt/β-caténine. En l'absence de ligand Wnt, la β-caténine est séquestrée dans le complexe Axin-GSK3β-APC-CK1 où elle est phosphorylée avant d'être dégradée par le protéasome (voie inactive). En présence de Wnt, le complexe est emprisonné au niveau du co-récepteur LRP5/6, ce qui permet l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme. La translocation de la β-caténine dans le noyau induit la transcription de ses gènes cibles (voie activée). **APC** : adenomatous polyposis coli ; **CK1** : caséine kinase 1 ; **Dvl** : dishevelled ; **GSK3β** : glycogène synthase kinase 3β ; **LRP5/6** : LDL-related protein 5/6 ; **LEF** : lymphoid enhancer factor ; **N** : noyau ; **P** : phosphate ; **TCF** : transcription factor ; **Ub** : ubiquitine ligase.

Dans le cortex murin, la β-caténine est exprimée à la fois dans les cellules progénitrices Shh+ et dans les cellules stéroïdogènes de la ZG (Berthon *et al.*, 2010, 2014; Walczak *et al.*, 2014; Walczak and Hammer, 2015). L'invalidation du gène *Ctnnb1* dans les cellules corticosurrénaliennes murines bloque le développement des surrénales (Kim *et al.*, 2008). La perte partielle de *Ctnnb1* est à l'origine d'un phénotype moins sévère avec toutefois une diminution de la taille des surrénales. Ces observations démontrent le rôle crucial de la β-caténine dans le développement surrénalien. Par ailleurs, l'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien a été permise chez des souris grâce à la délétion de

l'exon 3 du gène *Ctnnb1* comprenant les sites de phosphorylation (souris ΔCat) (Berthon *et al.*, 2010). Dans ce modèle, la β-caténine ne peut donc pas être dégradée, elle s'accumule dans le cytoplasme et le noyau où elle peut alors librement jouer son rôle de co-facteur de transcription. Ce modèle murin présente une prolifération de cellules fuselées originaires de la capsule, dont certaines exprimant Gli1+, et une expansion de la ZG parallèlement à une inhibition de la différenciation fasciculée. Sur le plan fonctionnel, ce modèle présente également une augmentation de la production d'aldostérone associée à une augmentation de l'aldostérone synthase, enzyme clé de la production d'aldostérone et une augmentation de l'expression du récepteur de l'angiotensine II, peptide stimulant la synthèse d'aldostérone (Berthon *et al.*, 2014). L'ensemble des données révèle l'importance de la voie Wnt/β-caténine à la fois dans le recrutement et le maintien du contingent de progéniteurs capsulaires, dans la prolifération et la zonation des cellules stéroïdogènes à l'intérieur du cortex et dans l'acquisition de l'identité glomérulée chez la souris.

La voie de signalisation AMPc/PKA

La voie adénosine monophosphate cyclique/protéine kinase A (AMPc/PKA) est présente de façon ubiquiste dans l'organisme des mammifères. Au sein des tissus endocrines, cette voie de signalisation joue un rôle particulièrement important dans la régulation du métabolisme, de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de l'apoptose (Calebiro *et al.*, 2015). Des altérations de cette voie ont été décrites comme étant à l'origine de diverses pathologies endocriniennes (voir § I.G.4.3.2 Le syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH). Cette voie de signalisation est stimulée lors de l'activation d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé positivement à l'adénylate cyclase *via* une protéine Gs (Yu *et al.*, 2012). En réponse, l'adénylate cyclase transforme l'ATP en l'AMPc, second messager intracellulaire, nécessaire à l'activation de la voie AMPc/PKA *via* la libération des sous-unités catalytiques de la PKA. La PKA est un tétramère composé de deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques. Il existe chez l'Homme quatre sous-unités régulatrices différentes (RIα, RIβ, RIIα et RIIβ) et trois sous-unités catalytiques différentes (Cα, Cβ et Cγ). Leur assemblage varie en fonction des tissus et du type cellulaire. Libérées de l'emprise des sous-unités régulatrices, les sous-unités catalytiques phosphorylent leurs cibles cytosoliques et intranucléaires, notamment CREB (cAMP-*responsive element binding protein*), CREM (cAMP-*responsive element modulator*) et SF1 (Ruggiero and Lalli, 2016). Le facteur de transcription CREB phosphorylé est alors capable de se fixer sur les gènes cibles de la voie

AMPc/PKA et d'activer leur transcription. Dans la cellule, l'AMPc est inactivé en adénosine monophosphate (AMP) sous l'action des phosphodiestérases (PDE). Lorsque la concentration intracellulaire en AMPc diminue, les sous-unités régulatrices se séparent de l'AMPc, permettant une nouvelle association aux sous-unités catalytiques.

Le récepteur de l'ACTH, récepteur aux mélanocortines de type 2 (MC2-R), appartient à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine Gs. Il est situé à la membrane des cellules corticosurrénaliennes, principalement localisé dans la ZF (Chhajlani *et al.*, 1993). Le MC2-R est associé à une protéine accessoire (*melanocortin-2 receptor associated protein* ; MRAP) nécessaire à sa fonctionnalité (Metherell *et al.*, 2005). La fixation de l'ACTH entraîne une activation de la PKA et l'ouverture des canaux calciques membranaires engendrant un influx de calcium (Gallo-Payet, 2016). La fixation de l'ACTH à son récepteur active la voie AMPc/PKA (**Figure 6**). La mise en évidence d'une atrophie de la ZF ainsi qu'un déficit en glucocorticoïdes dans un modèle murin invalidé pour le *Mc2r* démontre le rôle trophique de l'ACTH dans la fonction glucocorticoïde (Chida *et al.*, 2007). Le phénotype similaire observé chez les patients atteints de déficit familial en glucocorticoïdes, maladie à transmission autosomal récessive provoquée par l'absence de MC2R fonctionnel, révèle que l'hormone corticotrope exerce la même action positive relayée par le MC2R sur les cellules de la ZF chez l'Homme (Clark and Weber, 1998). Bien que les cellules de la ZG expriment aussi le MC2R, la morphologie de cette zone n'est pas impactée par la mutation inactivatrice du MC2R chez l'Homme et la souris. Ces données indiquent que contrairement à la ZF dont le développement requiert l'activation du MC2R, couplé positivement à la voie AMPc/PKA, la mise en place de la ZG n'est pas dépendante de cette voie de signalisation. Le rôle positif de la voie AMPc/PKA dans la différenciation des cellules productrices de glucocorticoïdes a été confirmé par l'activation constitutive de la PKA dans les cellules corticales murines. En effet, ces animaux présentaient une augmentation de la corticostéronémie qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes *Mc2r* et *Cyp11b1* ; enzyme indispensable à la synthèse de corticostérone chez la souris (Sahut-Barnola *et al.*, 2010). Ces études reflètent l'influence de la voie AMPc/PKA dans l'acquisition de l'identité des cellules fasciculées ainsi que dans le développement de la glande surrénale.

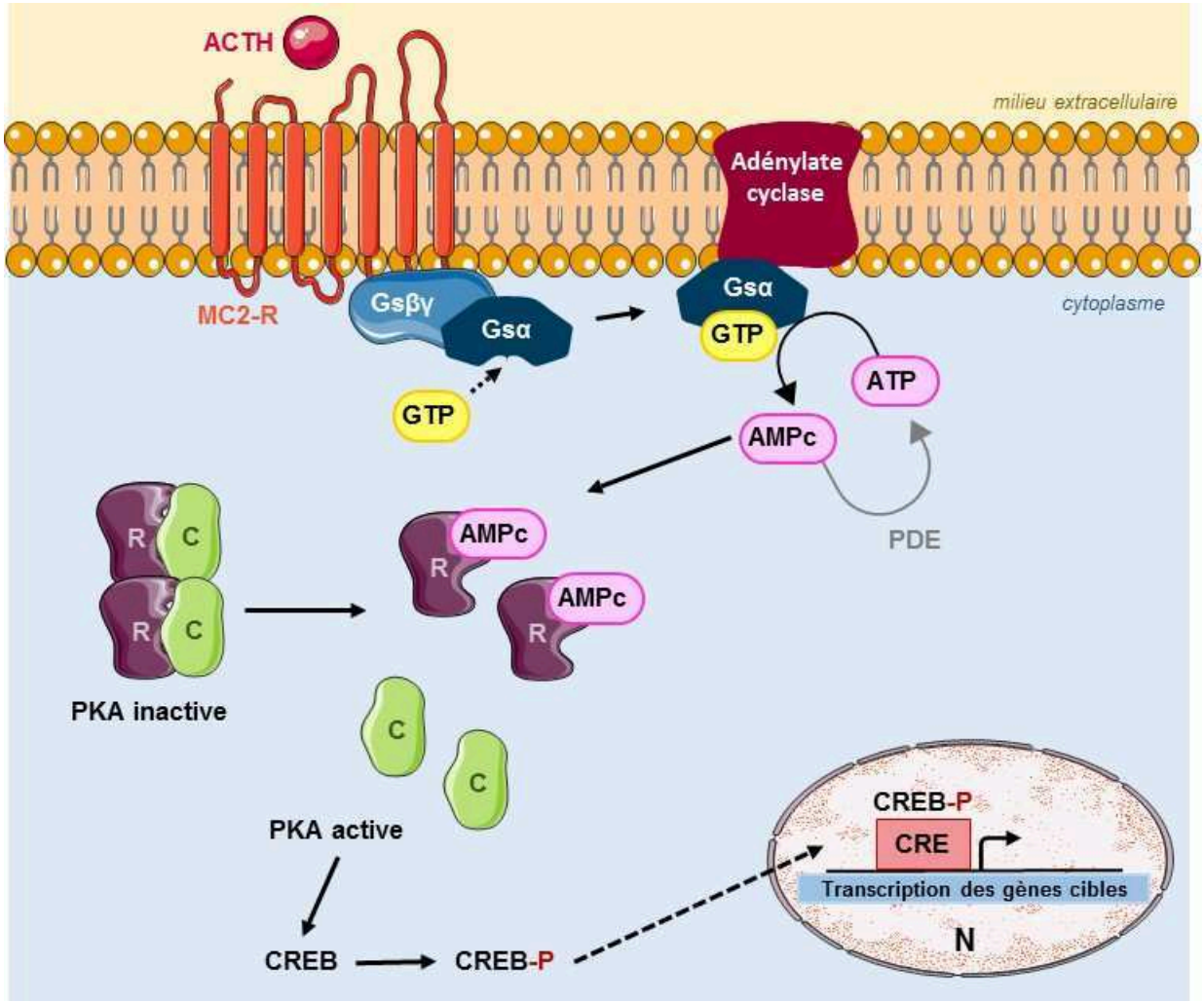


Figure 6 : Couplage du récepteur des mélanocortines de type 2 (MC2-R) à la voie AMPc/PKA. **ACTH** : adrénocorticotrophine, **AMPc** : adénosine monophsophate cyclique, **ATP** : adénosine triphosphate, **CREB** : *cAMP response element binding*, **CREB-P** : CREB phosphorylé, **CRE** : CREB *responsive element*, **GTP** : guanine triphosphate, **N** : noyau ; **PDE** : phosphodiestérase, **PKA** : protéine kinase A.

Antagonisme des voies Wnt/β-caténine et AMPc/PKA

Dans la mesure où l'activation de la voie Wnt/β-caténine oriente vers une différenciation glomérulée alors que l'activation de la voie AMPc/PKA dirige les cellules vers un destin de fasciculée, quel est l'influence réciproque de ces deux voies de signalisation ? Et comment la zonation fonctionnelle des cellules est-elle permise ?

L'activation de la voie AMPc/PKA par traitement à l'ACTH ou induite par la perte d'une sous-unité régulatrice de la PKA est associée à une perturbation de la voie Wnt/β-caténine voire à une restriction de celle-ci chez la souris (Drelon *et al.*, 2016). Ces résultats sont valorisés par le fait que, dans les souris présentant une activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine, la perte de la sous-unité catalytique de la PKA accélère la tumorigenèse. *A contrario*, la perte de la

sous-unité régulatrice atténue le phénotype surrénalien engendré par l'activation de la voie Wnt/β-caténine chez ces mêmes souris (Drelon *et al.*, 2016). La voie AMPc/PKA apparaît comme essentielle pour permettre la conversion de cellule glomérulée en cellule fasciculée et réprimer définitivement la voie Wnt/β-caténine. Ces résultats montrent qu'il existe vraisemblablement un antagonisme des voies Wnt/β-caténine et AMPc/PKA dans les cellules surrénaliennes de souris. Il a été proposé que les cellules de la ZG échappent progressivement à l'influence de la voie Wnt/β-caténine pour passer sous le contrôle de la voie AMPc/PKA ce qui permet la conversion d'identité (Drelon *et al.*, 2016) (**Figure 7**).

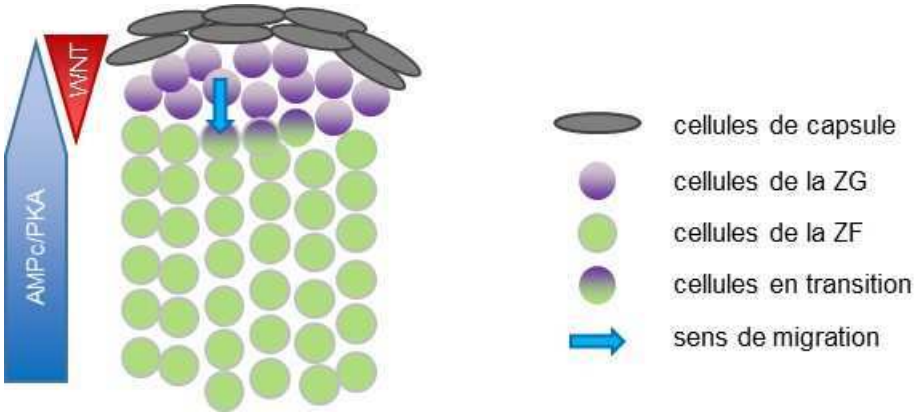


Figure 7 : Modèle de l'antagonisme des voies de signalisation Wnt/β-caténine et AMPc/PKA dans les cellules corticosurrénaliennes murines. Adapté d'après (Drelon *et al.*, 2016).

De tels résultats n'ont pas été confirmés chez l'Homme lors de l'étude de tissus surrénaliens présentant une activation de la voie AMPc/PKA consécutive à une mutation activatrice (Almeida *et al.*, 2012). Au contraire, des expériences de PCR quantitative et d'immunohistochimie ont révélé une augmentation de l'expression des gènes codant des acteurs de la voie Wnt/β-caténine, et notamment *CTNNB1*, *LEF1* et *LRP5*.

3. Mise en place et renouvellement du cortex surrénalien chez l'Homme

Les données concernant l'existence de progéniteurs capsulaires et l'implication des voies de signalisation dans le développement de la surrénale humaine ne sont pas clairement établies chez l'Homme. Des études réalisées sur des tissus humains suggèrent qu'il existe dans la glande surrénale humaine adulte une niche de cellules souches logées dans le cortex périphérique pouvant se multiplier et/ou se différencier en tout type de cellules corticales stéroïdogènes (Pihlajoki *et al.*, 2015).

Implication de la voie Sonic HedgeHog

Différents résultats reposant sur des données cliniques et expérimentales soulignent l'importance de la voie SHH dans le développement de la glande surrénale humaine, comme cela a pu être décrit chez la souris. Les facteurs de transcription GLI1, GLI2 et GLI3 sont tous exprimés dans le cortex surrénalien au cours du développement (Gomes *et al.*, 2014). Le facteur de transcription activateur GLI1 est détecté par immunohistochimie dans tout le cortex surrénalien normal avec un marquage plus prononcé dans la ZG (Werminghaus *et al.*, 2014). Conséquence d'une mutation au niveau du gène *GLI3*, le syndrome de Pallister-Hall est une maladie congénitale à transmission autosomique dominante (Hall *et al.*, 1980; Kang *et al.*, 1997). La version tronquée de la protéine GLI3 qui en résulte inhibe de façon constitutive la voie SHH, ce qui provoque l'apparition d'un ensemble de désordres chez les patients, et notamment un dysfonctionnement hypophysaire et une aplasie de la glande surrénale. Dans le modèle murin, l'inactivation de *Gli3* est responsable de sévères anomalies du développement, touchant entre autres le tube digestif et les reins, associées à une agénésie de la glande surrénale (Böse *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent que le déficit en Gli3 impacte très précocement le développement, avant même la formation de la crête urogénitale. Les conséquences de cette anomalie génétique démontrent l'importance de GLI3 et plus largement de la voie SHH dans le développement de la glande surrénale chez l'Homme.

Paradoxalement, SHH n'est pas visualisé en immunohistochimie dans les cellules corticosurrénaliennes normales bien que son ARNm (acide ribonucléique messager) soit détectable. L'équipe de P. Werminghaus et coll. a également mis en évidence un antagonisme des voies AMPc/PKA et SHH dans la lignée corticosurrénalienne H295R, puisque l'activation de la PKA inhibe l'expression de GLI1 (Werminghaus *et al.*, 2014). Cela pourrait expliquer le moindre marquage GLI dans la zone fasciculée, dont les sécrétions sont régulées par l'ACTH. Enfin, le fait que la voie SHH soit retrouvée suractivée en majeure proportion dans des adénomes non-sécrétants suggère qu'elle joue principalement un rôle dans la prolifération cellulaire et la tumorigenèse surrénalienne (Boulkroun *et al.*, 2011; Werminghaus *et al.*, 2014). A cet égard, des équipes allemandes et brésiliennes ont montré que le traitement des cellules H295R par un inhibiteur de SMO, bloquant la voie SHH, inhibait la prolifération cellulaire et diminuait la viabilité des cellules (Gomes *et al.*, 2014; Werminghaus *et al.*, 2014).

Les données de la littérature témoignent du fait que la voie SHH est active dans le cortex surrénalien humain, notamment grâce à la large distribution des membres composants la voie. Il est maintenant établi que cette voie joue un rôle dans le développement de la glande surrénale

chez l'Homme. Les données récentes semblent en plus lui attribuer la fonction de maintien du cortex surrénalien chez l'adulte.

Rôle de la voie Wnt/β-caténine

Intéressons-nous maintenant au rôle de la voie Wnt/β-caténine dans la mise en place et le renouvellement du cortex surrénalien chez l'Homme. La localisation de la β-caténine dans le cortex est encore débattue à l'heure actuelle. L'immunohistochimie de la β-caténine révèle sa présence cytoplasmique et nucléaire dans la totalité du cortex surrénalien humain (Boulkroun *et al.*, 2011). Certains auteurs cependant, ont montré une localisation préférentielle de la β-caténine sous la capsule, comme cela a pu être observé chez la souris (Shaikh *et al.*, 2015). D'après les observations réalisées chez l'Homme, il est très probable que la voie Wnt/β-caténine joue un rôle crucial dans le développement de la surrénale. En effet, la perte de fonction de WNT4, ligand de la famille Wnt, provoque une hypoplasie surrénalienne chez l'Homme (Mandel *et al.*, 2008). Ces résultats sont concordants avec ceux obtenus chez la souris et montrent l'importance de la voie Wnt/β-caténine dans le développement de la surrénale humaine (Heikkilä *et al.*, 2002). Chez l'Homme, l'activation de la voie Wnt/β-caténine est fréquemment observée avec une prévalence similaire dans les adénomes ou les carcinomes corticosurrénaliens. Le plus souvent, cette activation est détectée dans des tumeurs non sécrétantes, suggérant un rôle prépondérant de la voie Wnt/β-caténine dans le développement des tumeurs plutôt que dans l'activité sécrétrice de celles-ci (Tissier *et al.*, 2005). Les mutations *CTNNB1* sont plus rarement détectées dans des néoplasies sécrétant des glucocorticoïdes ou des androgènes. Étonnamment, une étude immunohistochimique réalisée sur une série de 47 adénomes producteurs d'aldostérone (adénomes de Conn) a révélé un marquage β-caténine nucléaire chez 70% des patients, témoignant de l'activation de la voie Wnt/β-caténine (Berthon *et al.*, 2014). Ces mutations contrastent avec les analyses génomiques indiquant que seuls 5 % des adénomes sécrétant de l'aldostérone présentent une mutation *CTNNB1* (Åkerström *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent par conséquent que l'activation de la voie Wnt/β-caténine observée dans les adénomes de Conn relève d'autres mécanismes. Ces derniers pourraient inclure la survenue d'altérations impactant d'autres gènes de la voie.

Rôle de la voie AMPc/PKA

Concernant l'activité de la PKA, des résultats récents obtenus chez l'Homme montrent que la PKA est exprimée dans tout le cortex surrénalien avec toutefois une expression des sous-unités catalytiques et régulatrices de la PKA qui varie en fonction de la zone concernée (Bourdeau *et al.*, 2006; Weigand *et al.*, 2017). En effet, d'après les travaux de I. Weigand et collaborateurs, les sous-unités RIα et RIIα sont présentes dans tout le cortex tandis que les sous-unités RIIβ et RIβ sont respectivement plus exprimées dans la ZG et la ZR. La sous-unité catalytique Cα est quant à elle préférentiellement localisée dans la ZG. Ces observations montrent que la PKA ne peut être considérée comme un témoin de différenciation des zones du cortex surrénalien humain puisqu'elle est exprimée dans les trois zones. En revanche, l'expression différentielle de ces sous-unités est, elle, spécifique d'une zone donnée. Par ailleurs, il a été montré que l'activation de la voie AMPc/PKA était associée à une altération de la voie Wnt/β-caténine chez l'Homme comme cela a pu être décrit chez la souris. Cependant, il ne s'agit pas de l'antagonisme des voies de signalisation AMPc/PKA et Wnt/β-caténine observé chez la souris puisque l'étude de tissus de patients avec activation de la voie AMPc/PKA a également révélé une surexpression des gènes codant certains acteurs de la voie Wnt/β-caténine (Gaujoux *et al.*, 2008; Almeida and Stratakis, 2010).

Pour conclure sur cette partie, nous pouvons dire que les résultats obtenus chez l'Homme suggèrent l'existence de mécanismes de renouvellement cellulaire similaires à ceux décrits chez les rongeurs. Toutefois, il existe des différences dans les mécanismes mis en jeu dans le renouvellement cellulaire comme l'absence d'antagonisme des voies signalisation AMPc/PKA et Wnt/β-caténine. Ces résultats laissent penser que l'hypothèse d'un changement de phénotype des cellules de ZG en ZF au cours de la migration centripète des cellules stéroïdogènes proposée chez la souris ne serait pas transposable à la surrénale humaine. A cet égard, il faut rappeler que l'Homme et la souris sont 2 espèces qui ont divergé il y a 80 millions d'années, le génome murin ayant évolué 2 fois plus vite que celui de l'Homme. Cependant, il reste pertinent d'utiliser un modèle murin tout d'abord pour des raisons pratiques (faible coût de revient et cycle de reproduction court) et d'autre part en raison de la forte homologie entre les génomes murin et humain (Waterston *et al.*, 2002).

E. Vascularisation et innervation des glandes surrénales

Au cours de l'embryogenèse, les réseaux vasculaire et nerveux se développent de manière plus ou moins synchrone dans la surrénale.

Compte tenu de leurs fonctions endocrines, les glandes surrénales sont des organes très richement vascularisés (**Figure 8**).

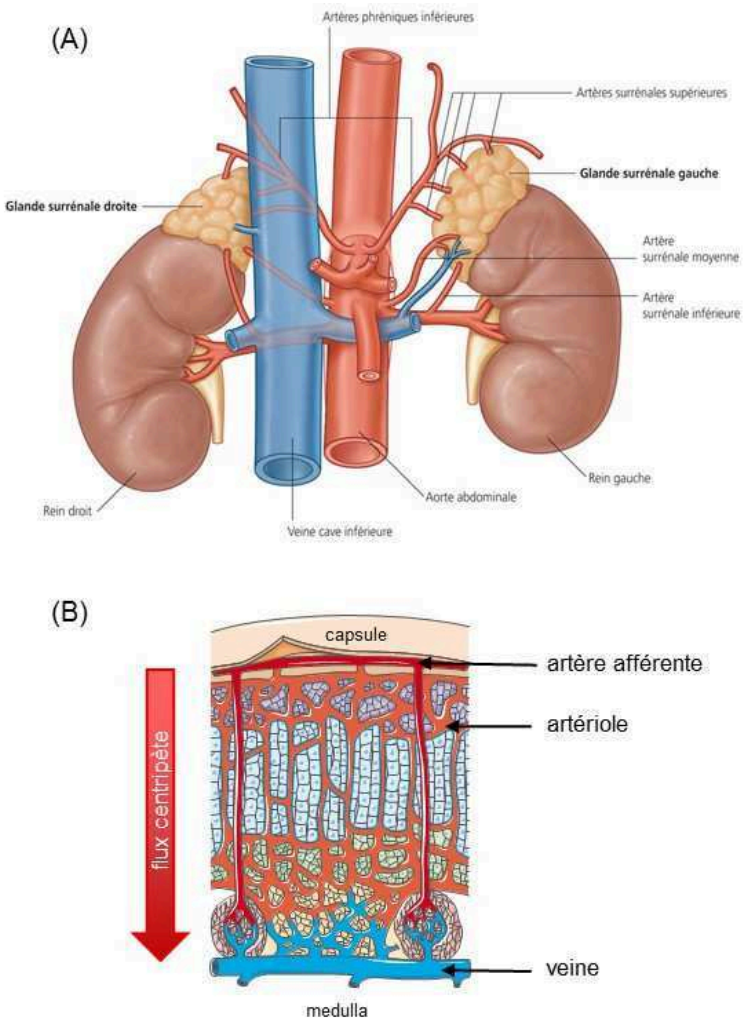


Figure 8 : Vascularisation de la glande surrénale humaine. (A) : L'irrigation de la glande est assurée par l'artère surrénale supérieure issue de l'artère phrénique, l'artère surrénale moyenne issue de l'aorte abdominale et l'artère surrénale inférieure provenant de l'artère rénale (*d'après « L'anatomie et la physiologie pour les infirmier(e)s », Sophie Dupont, Elsevier Masson*). (B) : A l'intérieur de la glande, le flux est centripète. La vascularisation fine est assurée par des artérioles. Le sang est collecté par la veine surrénalienne située au centre de la glande.

Leur irrigation est assurée par l'artère surrénale supérieure issue de l'artère phrénique, l'artère surrénale moyenne issue de l'aorte abdominale et l'artère surrénale inférieure provenant de l'artère rénale (Hureau *et al.*, 1979; Monkhouse and Khalique, 1986). Les artères pénètrent dans la glande surrénale au niveau de la capsule dans laquelle elles forment le réseau capsulaire. Elles se ramifient ensuite pour donner naissance au réseau sous capsulaire (Lever, 1952), cortical puis médullaire et ainsi permettre l'irrigation de toutes les couches du parenchyme. Cette large vascularisation permet à chaque cellule corticosurrénalienne d'être en contact avec au moins un capillaire sanguin (Sasano *et al.*, 1998). Le réseau veineux est différent puisqu'il

converge vers une veine centrale unique qui apparaît dès la 8e SA au cœur de la surrénale, où sera localisée la future médulla. La veine surrénalienne, permettant l'évacuation des produits de sécrétion de la corticosurrénale et de la médullosurrénale, quitte le parenchyme glandulaire par le hile pour rejoindre la veine cave inférieure à droite et la veine rénale à gauche (Monkhouse and Khalique, 1986).

Les glandes surrénales sont dotées d'une riche innervation sympathique provenant du nerf splanchnique et des nerfs abdomino-pelviens associée à une innervation parasympathique autonome assurée par les nerfs phrénique et vague (Li *et al.*, 1999). Les fibres nerveuses afférentes innervant la surrénale suivent fidèlement le réseau vasculaire décrit ci-dessus. Les fibres pénètrent dans la corticosurrénale par la capsule pour s'insinuer profondément dans le cortex. La proximité des cellules stéroïdogènes avec les fibres nerveuses, ainsi que les nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides libérés par ces fibres, semblent indiquer qu'il existe un contrôle nerveux direct des fonctions corticosurrénaliennes (voir § I.G.3. Régulation paracrine de la sécrétion des corticostéroïdes). Enfin, le contrôle nerveux entraîne une augmentation de l'activité sécrétoire en réponse à une augmentation du débit artériel ; cela reflète l'effet indirect de l'innervation sur la stéroïdogenèse *via* le contrôle nerveux de la constriction et la dilatation des vaisseaux sanguins.

F. Stéroïdogenèse surrénalienne

1. Entrée et stockage du cholestérol

Le cholestérol est le précurseur de nombreux composés biologiques et en particulier des hormones stéroïdiennes. L'organisme dispose de trois sources différentes de cholestérol : le cholestérol exogène issu de l'alimentation (principale source), le cholestérol endogène d'origine hépatique et le cholestérol endogène issu de la biosynthèse extra-hépatique. Les cellules surrénaliennes font partie des cellules capables de synthétiser le cholestérol à partir d'acétylcoenzyme A puisque qu'elles expriment l'HMG CoA (Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A) réductase (Burns and Rebeck, 2010). Le cholestérol circulant est transporté à l'intérieur de la cellule stéroïdogène par deux lipoprotéines majoritaires ; les lipoprotéines de faible densité ou LDL (*low-density lipoproteins*) et les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*high-density lipoproteins*). Les HDL et les LDL sont captées au niveau de la membrane plasmique de la cellule stéroïdogène par deux types de récepteurs majoritaires (**Figure 9**). Le récepteur SR-B1 (*scavenger receptor* de type B1) est capable de lier les HDL avec une forte affinité permettant ainsi l'entrée sélective des esters de cholestérol dans les cellules

surrénaliennes (Acton *et al.*, 1996; Murao *et al.*, 1997). L'entrée des LDL passe par le récepteur aux LDL (LDL-R). A la différence des HDL, les complexes LDL/LDL-R sont internalisés. Le cholestérol estérifié est hydrolysé et la lipoprotéine peut ensuite être recyclée (Azhar and Reaven, 2002). Les cellules corticosurrénaliennes expriment également le récepteur aux lipoprotéines de très faible densité (VLDL ; *very low-density lipoproteins*) qui participe à la biosynthèse des hormones corticosurrénaliennes en augmentant la capacité à produire de l'aldostérone et du cortisol *via* l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire et *in fine*, l'augmentation de l'expression de certaines enzymes de la stéroïdogenèse (CYP11B2 et StAR, voir § I.F.3. Synthèse des hormones stéroïdiennes) (Xing *et al.*, 2012). Après son entrée dans la cellule, le cholestérol cytosolique est ensuite stocké sous forme d'esters de cholestérol formant ainsi des gouttelettes lipidiques (Sewer and Li, 2008). En cas de besoin, les esters de cholestérol sont clivés en cholestérol libre par une *cholesterol-ester hydrolase* également appelée HSL (*hormone-sensitive lipase*) (Kraemer, 2007). Le cholestérol est transporté par la protéine SCP-2 (*sterol carrier protein* 2) jusqu'à la membrane mitochondriale externe où la stéroïdogenèse peut alors débuter (Chanderbhan *et al.*, 1982).

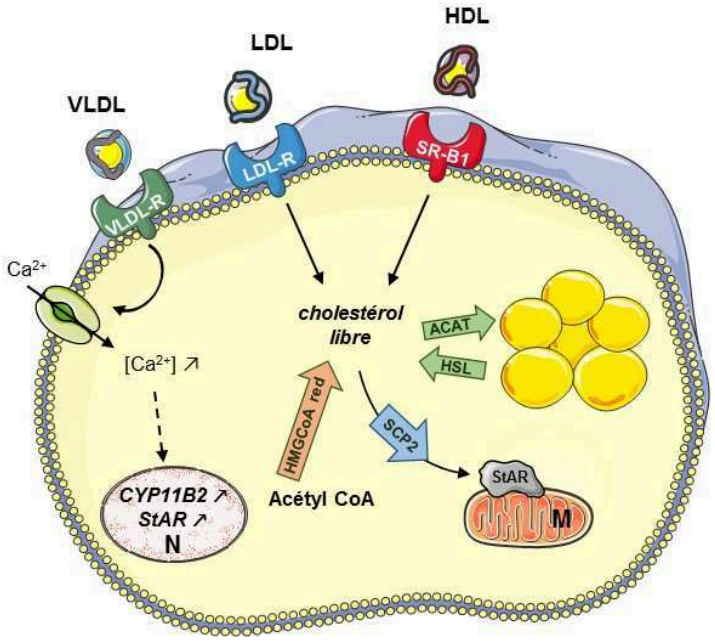


Figure 9 : Schéma illustrant les mécanismes d'importation du cholestérol dans la cellule stéroïdogène corticosurrénalienne. Le cholestérol intracellulaire provient majoritairement des HDL et des LDL importées par les récepteurs SR-B1 et LDL-R respectivement. Les VLDL stimulent également la corticostéroïdogenèse *via* une élévation de la concentration intracellulaire en calcium (Ca^{2+}), responsable d'une augmentation de l'expression de CYP11B2 et StAR. **ACAT** : acétyl-coA acétyl-transférase, **HDL** : *high density lipoproteins*, **HSL** : *hormone sensitive-lipase*, **LDL** : *low density lipoproteins*, **M** : mitchondrie ; **N** : noyau ; **SCP2** : *sterol carrier protein* 2, **SR-B1** : *scavenger receptor* B1, **StAR** : *steroidogenic acute regulatory protein*, **VLDL** : *very low density lipoproteins.*

2. Mobilisation du cholestérol

En plus de son rôle dans la synthèse des composés biologiques, le cholestérol est un composé essentiel des membranes, ce qui lui permet d'ailleurs de diffuser à travers celles-ci. Les membranes mitochondriales étant particulièrement pauvres en cholestérol, la protéine StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) est un élément indispensable au passage du cholestérol du cytosol vers le compartiment mitochondrial (Clark *et al.*, 1994; Stocco, 2001). Cette étape nécessite également l'intervention de la protéine de translocation TSPO (*translocator protein*). La protéine StAR, limitante de la biosynthèse des stéroïdes (Miller, 1998), est rapidement synthétisée puis amenée à la membrane mitochondriale externe en réponse à une stimulation des cellules stéroïdogènes. De plus, la phosphorylation de StAR par une kinase, déclenchée par l'activation du MC2-R après fixation de l'ACTH, augmente son activité biologique (Arakane *et al.*, 1997).

3. Synthèse des hormones stéroïdiennes

La synthèse des hormones stéroïdiennes est réalisée par une série d'enzymes de la famille des cytochromes P450 et des hydroxystéroïdes déshydrogénases localisées dans la mitochondrie ou le réticulum endoplasmique (**Figure 10**). Cette série d'oxydations nécessite l'intervention de flavoprotéines, classe de transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire ; les électrons sont déplacés du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) vers les stéroïdes (Miller and Bose, 2011). La première étape de la stéroïdogenèse fait intervenir l'enzyme P450scc codée par le gène *CYP11A1* qui permet la formation de prégnénolone *via* le clivage de la chaîne latérale du cholestérol, conduisant au transfert de la molécule de l'espace inter-membranaire mitochondrial vers la membrane mitochondriale interne (Elustondo *et al.*, 2017). La prégnénolone sort ensuite de la mitochondrie pour rejoindre le réticulum endoplasmique lisse. Dans la ZG, la prégnénolone est transformée en progestérone par l'enzyme 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 ou 3β-HSD2 (*HSD3B2*), puis en 11-déoxycorticostérone par l'enzyme 21-hydroxylase (*CYP21A1 ;* abrégé 21-OH). Ce stéroïde est alors transféré dans la mitochondrie pour y être métabolisé en corticostérone et enfin en aldostérone par l'aldostérone synthase ou 11β-hydroxylase de type 2 (*CYP11B2 ;* abrégé 11β-OH). Dans la ZF, les cellules expriment spécifiquement la 17α-hydroxylase (*CYP17A1* ; abrégé 17α-OH) qui catalyse la réaction d'hydroxylation de la prégnénolone en 17-hydroxy-prégnénolone. A son tour, l'enzyme 3β-HSD2 convertit ce stéroïde en 17-hydroxy-progestérone (17-OHP), intermédiaire qui sera modifié en 11-déoxycortisol sous l'action de la 21-OH. La dernière réaction enzymatique se déroule également dans la mitochondrie.

L'intervention de l'enzyme 11β-hydroxylase de type 1 (*CYP11B1*) sur le 11-déoxycortisol conduit à la production de cortisol (Payne and Hales, 2004).

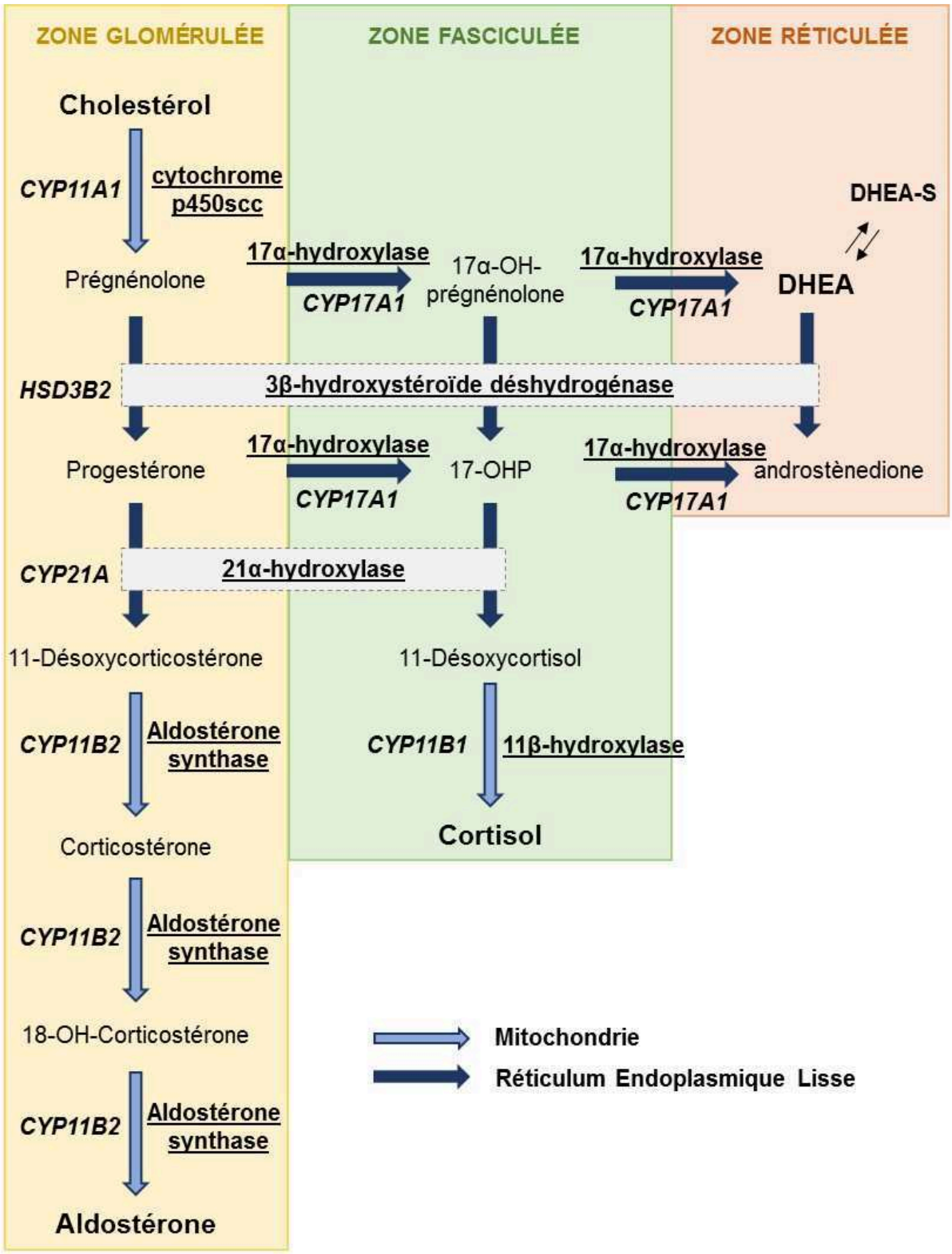


Figure 10 : Schéma de la stéroïdogenèse surrénalienne chez l'Homme. Les noms des gènes sont indiqués en italique et les enzymes correspondantes figurent en caractères soulignés.

Concernant la synthèse des androgènes, l'expression de l'enzyme 17,20 lyase combinée à l'intervention du cytochrome b5 dans la zone réticulée, permet la transformation de la 17-hydroxy-prégnénolone en DHEA majoritairement (Rainey and Nakamura, 2008). La 3β-HSD2 étant peu exprimée, seule une faible quantité de Δ4-androstènedione est produite.

G. Les sécrétions surrénaliennes

1. Fonction minéralocorticoïde

1.1. Rôle et mécanisme d'action des minéralocorticoïdes

Les minéralocorticoïdes, et principalement l'aldostérone chez l'Homme, jouent un rôle très important dans la balance hydrosodée (Wang and Giebisch, 2009). L'aldostérone favorise la rétention du sodium (Na^+) et l'excrétion de potassium (K^+) et d'ions H^+ par le rein, conduisant ainsi à la réabsorption passive de l'eau. De cette façon, l'aldostérone contribue à la régulation directe de la natrémie et de la kaliémie, et à la régulation indirecte de la volémie et de la pression artérielle.

Les effets biologiques de l'aldostérone sont relayés par le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR ; *mineralocorticoid receptors*). Ces récepteurs spécifiques sont situés au niveau du rein, dans la partie terminale du tube contourné distal. Pour mieux comprendre l'action de l'aldostérone, revenons un instant sur la physiologie rénale.

Le sang arrive jusqu'aux néphrons, unités de filtration et de réabsorption des reins, grâce aux artérioles qui pénètrent dans le glomérule situé dans le néphron. Le glomérule possède un filtre très fin qui retient hématies et grosses molécules, mais laisse passer les électrolytes comme le Na^+, le K^+ et le calcium. Ce premier filtrat, appelé urine primitive, entre ensuite dans le tubule et précisément au niveau du tubule contourné proximal et de l'anse de Henlé, où sera réabsorbé le Na^+ grâce à l'action d'un canal sodium-chlore permettant un transport actif du Na^+ vers le compartiment sanguin. Suivant les électrolytes, l'eau est donc réabsorbée passivement à ce niveau. Entre 80 et 90% du volume d'urine filtré sont réabsorbés à ce niveau. Une réabsorption qui pourrait être qualifiée de facultative peut se poursuivre dans le tube contourné distal et le tube collecteur selon les besoins en eau et électrolytes de l'organisme. Au niveau du tube contourné distal, l'aldostérone stimule l'échangeur sodium-hydrogène (Na^+/H^+) favorisant ainsi l'absorption de Na^+ au pôle apical des cellules pariétales du néphron. L'élévation de la concentration intracellulaire de Na^+ active la pompe sodium-potassium ATPase (Na^+/K^+ ATPase) située au pôle baso-latéral des cellules qui échange trois molécules de Na^+ cytosolique contre deux molécules de K^+ plasmatique. Ce mécanisme a pour conséquence une augmentation

de la réabsorption du Na^+ vers le plasma et indirectement, la réabsorption de l'eau. La fixation de l'aldostérone circulante sur le MR entraîne également la transcription des gènes codant la pompe Na^+/K^+ ATPase et le canal épithélial à sodium (*epithelial sodium channel* ; ENaC), et leur adressage respectif à la membrane plasmique baso-latérale et apicale, renforçant ainsi la capacité d'absorption du Na^+ (Salyer *et al.*, 2013). Au niveau du tube collecteur du rein, la réabsorption de l'eau est sous le contrôle de la vasopressine (AVP, également appelée hormone antidiurétique ; ADH) qui stimule l'expression de l'aquaporine 2 à la membrane apicale des cellules, favorisant ainsi le retour de l'eau de la lumière du canal vers le plasma (Wilke *et al.*, 2005).

Les glucocorticoïdes, présents dans le sang en quantité bien plus importante que les minéralocorticoïdes, ont la même affinité pour le MR que l'aldostérone. Pour prévenir une activation illégitime du cortisol sur les cellules exprimant le MR, ce stéroïde est inactivé par l'enzyme 11-β-hydroxystéroïde-déshydrogénase de type 2 (11βHSD2), qui transforme le cortisol en cortisone (Ferrari, 2010). Un déficit en 11βHSD2 peut conduire à un effet minéralocorticoïde du cortisol (Lian *et al.*, 2015). Dans les cas d'hypercortisolisme, l'enzyme 11β-HSD2 peut être débordée permettant ainsi l'effet minéralocorticoïde du cortisol.

1.2. Régulation de la sécrétion d'aldostérone

Comme pour les autres stéroïdes, l'aldostérone n'est pas stockée dans les cellules de la ZG. Dès que sa synthèse est terminée, l'aldostérone diffuse passivement à travers la membrane cytoplasmique pour rejoindre la circulation sanguine. La régulation de la sécrétion de l'aldostérone se produit donc au niveau de sa synthèse. Deux facteurs majeurs veillent à la régulation de l'aldostérone ; l'angiotensine II (AngII) et le taux de potassium plasmatique, tandis que l'ACTH participe à la régulation de l'aldostérone dans une moindre mesure (Bollag, 2014) (**Figure 11**).

L'angiotensine II

Le premier acteur du système rénine-angiotensine (SRA)-aldostérone est la rénine, facteur déterminant dans la mise en place de cette chaîne de régulation. Les autres acteurs du système sont en effet présents en excès (Nishiyama and Kim-Mitsuyama, 2010). La rénine est produite et libérée par les cellules juxtaglomérulaires du rein en réponse à une diminution de la perfusion rénale. La rénine clive l'angiotensinogène produit par le foie en angiotensine I. L'angiotensine I est à son tour convertie en AngII par l'enzyme de conversion de l'angiotensine

(ECA), produite par le poumon. L'AngII a une action majeure sur la soif et la réabsorption de Na^+ *via* la production d'aldostérone, et une action mineure sur la vasoconstriction. Dans la surrénale humaine, les effets de l'AngII sont relayés par deux récepteurs couplés aux protéines G : le récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT-1) chez l'adulte (Spät and Hunyady, 2004; Nishiyama and Kim-Mitsuyama, 2010), et par le récepteur de type 2 chez le fœtus (Breault *et al.*, 1996). Le récepteur AT-1 est couplé à la voie de signalisation phospholipase C/calcium/protéine kinase calmoduline-dépendante (PLC/Ca^{2+}/CamKII) et à l'ouverture des canaux calciques. La fixation de l'AngII est donc liée à un influx calcique provoquant une élévation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique qui stimule la sécrétion d'aldostérone (Spät and Hunyady, 2004). De plus, l'activation de la CamKII engendrée par la fixation de l'AngII sur son récepteur permet la phosphorylation de StAR, provoquant une augmentation de son activité biologique (Arakane *et al.*, 1997).

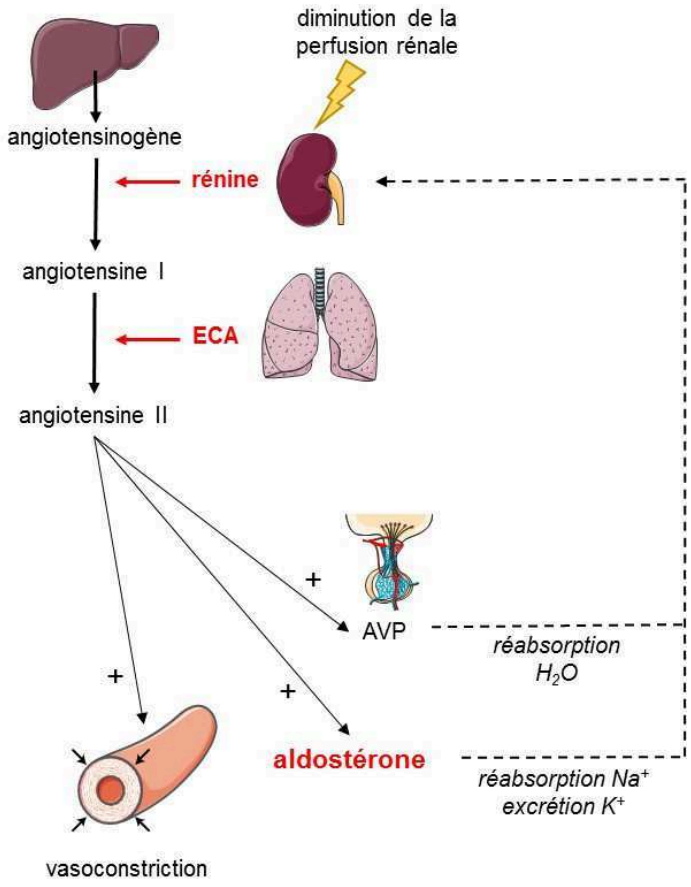


Figure 11 : Régulation de la sécrétion des minéralocorticoïdes chez l'Homme. La sécrétion d'aldostérone est principalement régulée par l'AngII dont le précurseur est l'angiotensinogène produit par le foie. L'angiotensinogène est clivé par la rénine, produite par le rein en cas d'hypoperfusion rénale, en angiotensine 1 elle-même transformée en angiotensine II grâce à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (**ECA**) produite par l'épithélium pulmonaire. L'AngII agit à 3 niveaux : elle favorise la vasoconstriction, stimule la libération d'aldostérone par la surrénale et d'arginine-vasopressine (**AVP**) par l'hypophyse. En réponse, ces deux hormones agissent au niveau du rein pour stimuler la réabsorption de sodium et l'excrétion de potassium ainsi que la réabsorption d'eau.

Le potassium

Les cellules de la ZG, véritables senseurs du potassium plasmatique, sont capables de percevoir la moindre augmentation de concentration dans le compartiment extracellulaire entraînant ainsi une dépolarisation de la membrane plasmique. La dépolarisation génère un influx calcique qui conduira à l'augmentation de la production d'aldostérone (Spät, 2004).

L'adrénocorticotrophine

L'ACTH, hormone hypophysaire dont le premier rôle est la régulation de la synthèse des glucocorticoïdes (Daidoh *et al.*, 1995), est capable de réguler la sécrétion d'aldostérone (Williams, 2005). Sachant que la fixation de l'ACTH à son récepteur, exprimé à la surface des cellules de la ZG, induit une augmentation de l'activité PKA (voir § II.D.2.2.2 Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes), la stimulation de la production de l'aldostérone passe notamment par une phosphorylation de la protéine StAR (Betancourt-Calle *et al.*, 2001) et par une promotion de l'influx calcique *via* les canaux de type L (Sculptoreanu *et al.*, 1993). L'ACTH a également des effets transcriptionnels qui influencent la sécrétion d'aldostérone à plus long terme, effets qui passent notamment par une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription CREB pour lequel le promoteur du gène codant l'enzyme StAR possède un site de fixation (Clem *et al.*, 2005; Hattangady *et al.*, 2012).

2. Fonction glucocorticoïde

2.1. Rôle des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont représentés par le cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez les rongeurs. Ils permettent notamment de faire face à des situations de stress qu'elles soient d'origine endogène (anxiété, infection) ou liées à l'environnement (stress proie-prédateur, traumatisme physique). Les glucocorticoïdes régulent le métabolisme des glucides, des protéines, des lipides et ont une action sur le métabolisme osseux, le système immunitaire et le système nerveux central.

Au niveau du métabolisme glucidique, le cortisol diminue l'entrée du glucose dans le tissu adipeux afin d'en diminuer le stockage et ainsi le rendre apte à répondre aux besoins énergétiques des cellules. Le cortisol augmente la synthèse hépatique de glucose à partir de substrats non glucidiques (néoglucogenèse) et stimule la transformation du glycogène en glucose (glycogénolyse). Ces effets biologiques vont dans le sens d'une élévation de la glycémie. En parallèle, il inhibe également la synthèse protéique et stimule le catabolisme

protéique afin de rendre les acides aminés disponibles pour la néoglucogenèse. Le cortisol a en outre une action au niveau du métabolisme lipidique en diminuant la lipogenèse et en favorisant la libération d'acides gras à partir des tissus adipeux. Ces acides gras sont des substrats énergétiques alternatifs pour les tissus en cas de pénurie de glucose (Arlt and Stewart, 2005). Le métabolisme osseux, et plus particulièrement calcique, se trouve impacté par le cortisol qui est capable de diminuer l'absorption intestinale de calcium (par effet antagoniste de la vitamine D) et augmente son élimination en inhibant la réabsorption tubulaire du calcium (Komori, 2016). Notons qu'à forte dose, les glucocorticoïdes ont un effet sur la balance hydroélectrolytique similaire à celui des minéralocorticoïdes *via* l'activation du MR ; ils peuvent donc avoir une incidence sur la rétention hydrosodée et la pression artérielle.

Au niveau du système immunitaire, les glucocorticoïdes diminuent la réponse immunitaire grâce à leur action anti-inflammatoire, à la base de leur utilisation en thérapeutique. Enfin, ils ont un effet orexigène et augmentent l'excitabilité du système nerveux central (Cain and Cidlowski, 2017).

2.2. Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes

L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien ou axe corticotrope

La sécrétion de cortisol par la surrénale est soumise au contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Figure 12**). Cet axe est activé le matin selon un rythme circadien et en réponse à un stress environnemental et/ou métabolique (Locatelli *et al.*, 2010; Chung *et al.*, 2011). L'ACTH est un polypeptide de 39 acides aminés synthétisé à partir de la proopiomélanocortine (POMC) par les cellules du lobe antérieur de l'hypophyse. Sa sécrétion est contrôlée positivement par la corticolibérine (*corticotropin-releasing hormone* ; CRH) et l'AVP, deux hormones produites et secrétées par le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. L'AVP a des effets très modestes sur la sécrétion d'ACTH mais elle potentialise l'action de la CRH. La CRH a une action rapide en stimulant l'exocytose d'ACTH et un effet à plus long terme en promouvant sa synthèse *via* la stimulation de l'expression de la POMC (Raff *et al.*, 2014). Au cours du nycthémère, la concentration minimum d'ACTH circulante est mesurée dans le sang vers minuit tandis qu'un pic d'ACTH est observé vers 8h, le taux plasmatique d'ACTH diminue ensuite tout au long de la journée. La fixation de l'ACTH à son récepteur active la voie AMPc/PKA comme expliqué précédemment, ce qui a pour conséquence d'augmenter la sécrétion de cortisol. L'ACTH stimule également la production de facteurs vasoactifs et angiogéniques qui, indirectement, stimulent la stéroïdogenèse par une augmentation du flux

sanguin irriguant la glande (Lefebvre, Duparc *et al.*, 2015). Globalement, l'ACTH exerce une régulation paracrine indirecte *via* ses effets sur les nombreuses populations cellulaires composant l'environnement surrénalien.

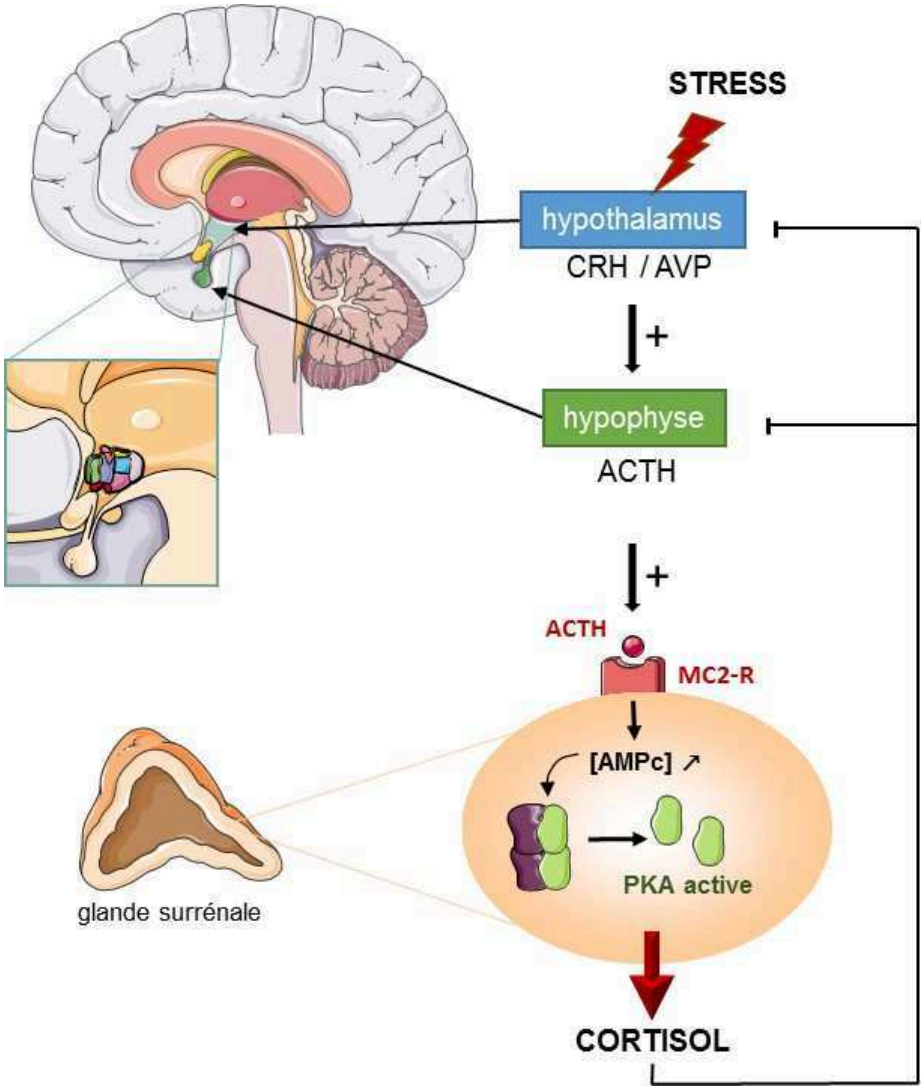


Figure 12 : Régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes par l'axe hypothalamo-hypophysaire chez l'Homme. Sous l'effet d'un stimulus comme le stress, l'axe hypothalamo-hypophysaire stimule la production de cortisol par la surrénale. Le cortisol exerce ensuite un rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. **Ac** : adénylate cyclase, **ACTH** : adrénocorticotrophine, **AMPc** : adénosine mono-phosphate cyclique, **AVP** : arginine-vasopressine, **CRH** : corticolibérine, **MC2-R** : récepteur des mélanocortines de type 2, **PKA** : protéine kinase A.

Suivant la variation nycthémérale de la sécrétion de l'ACTH, le cortisol est libéré selon un rythme circadien ; le taux plasmatique de cortisol est faible entre 23h et 1h, puis il augmente progressivement au cours de la nuit pour atteindre un maximum entre 6h et 9h le matin (Paragliola *et al.*, 2017). Après sa libération dans la circulation systémique, le cortisol est majoritairement transporté par la transcortine ou CBG (*corticosteroid binding globulin*), une

protéine produite par le foie qui lui est spécifique et dans une moindre mesure par l'albumine (Perogamvros *et al.*, 2012). Seulement 5% du cortisol circule sous forme libre dans le plasma ; c'est cette fraction qui est capable d'interagir sur les tissus cibles. La demi-vie du cortisol est d'environ 60 min. Au niveau hépatique, le cortisol fait l'objet d'une 6-hydroxylation et d'une glucuroconjugaison (Pal, 1978; Raff *et al.*, 2014). Ces métabolites inactifs sont ensuite excrétés dans les urines conjointement avec du cortisol libre.

Le cortisol agit au niveau des tissus cibles en se fixant sur son récepteur intracellulaire ; le récepteur aux glucocorticoïdes (GR ; *glucocorticoid receptor*) (Busada and Cidlowski, 2017). Le complexe hormone-récepteur a la capacité de se fixer sur les nGRE (*negative glucocorticoid responsive elements*) présents au niveau de la séquence régulatrice des gènes cibles afin de moduler la transcription génique (Dostert and Heinzel, 2004). Par ce mécanisme, le cortisol plasmatique exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe HH ; il est en effet capable de diminuer la sécrétion de CRH et d'inhiber l'expression de la POMC (Beyer *et al.*, 1988; Lundblad and Roberts, 1988).

Effets directs de l'ACTH au niveau surrénalien

En dehors de l'action exercée sur la libération du cortisol, l'ACTH stimule l'expansion du cortex surrénalien et la capacité des cellules à produire des corticostéroïdes, notamment *via* la stimulation de l'expression de son propre récepteur et de MRAP, *SCARB1*, *StAR* et de différents gènes intervenant dans la stéroïdogenèse tels que *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A2* et *HSD3B2* (Xing *et al.*, 2010). A l'inverse, les déficits en ACTH induisent une régression de la ZF (Thomas *et al.*, 2004).

Dissociation de l'axe hypothalamo-hypophysaire / surrénale

Chez l'Homme, en réponse à un stress intense comme une chirurgie ou un sepsis (réponse inflammatoire généralisée), les taux plasmatiques d'ACTH et de cortisol sont augmentés dans un premier temps, puis la concentration d'ACTH circulante diminue alors que celle du cortisol reste élevée (Roth-Isigkeit and Schmucker, 1997; Vermes and Beishuizen, 2001; Bornstein *et al.*, 2008). Ces données mettent en évidence une dissociation entre les sécrétions d'ACTH et de cortisol et suggèrent une réponse au stress non médiée par l'ACTH. Cette altération de l'axe corticotrope a également été observée chez les patients sujets à la dépression ou suite à un stress post-traumatique (Rubin *et al.*, 2006; Pervanidou and Chrousos, 2007). Chez le rat, l'application d'un stress chronique de contention pendant 14 jours engendre

une dissociation entre les sécrétions d'ACTH et de corticostérone qui s'accompagne d'une augmentation de la production intrasurrénalienne de sérotonine et d'acide 5-hydroxyindolacétique (métabolite attestant de la dégradation de la sérotonine), et la surexpression du récepteur sérotoninergique eutopique 5-HT_7 au sein de la corticosurrénale (García-Iglesias *et al.*, 2013). L'activation d'une boucle de régulation sérotoninergique pourrait avoir pour fonction d'élever le taux de glucocorticoïdes indépendamment de l'ACTH, qui est freinée du fait du rétrocontrôle par les glucocorticoïdes, dans une situation de stress intense et prolongé.

Parallèlement à ces travaux, des auteurs ont mis en évidence, chez des patients souffrant d'une affection sévère pris en charge en unité de soins intensifs, une diminution de l'expression d'enzymes responsables du catabolisme du cortisol, et notamment des 5α- et 5β-réductases dans le foie et de la 11β-HSD2 dans le rein, se traduisant par une augmentation de la demi-vie du cortisol plasmatique (Boonen *et al.*, 2013, 2015).

Globalement, la dissociation observée entre la baisse du taux d'ACTH et le maintien de taux de cortisol élevés en condition de stress majeur et prolongé peut donc relever de deux mécanismes : i) l'intervention de facteurs stimulants intrasurrénaliens indépendants de l'ACTH ; ii) la réduction du métabolisme périphérique du cortisol.

3. Régulation paracrine de la sécrétion des corticostéroïdes

Étonnamment chez les patients ayant subi une néphrectomie bilatérale, des taux circulants non négligeables d'aldostérone sont observés malgré des taux circulants de rénine et d'AngII bas (Mitra *et al.*, 1972). Le fait que tous les composants du SRA puissent être exprimés dans la surrénale humaine normale explique en partie le maintien de la sécrétion d'aldostérone malgré l'absence de rénine rénale (Peters, 2012; Lalli *et al.*, 2016). En effet, ce système est fonctionnel chez le fœtus humain et en période néonatale avant que le rein mature ne prenne le relais. Chez les rats néphrectomisés, l'absence de rénine d'origine rénale est compensée par une augmentation de la synthèse de rénine par les cellules de la ZG qui permet d'élever la production d'aldostérone (Doi *et al.*, 1984). Cependant, l'administration d'inhibiteurs du SRA, tels que des inhibiteurs de l'ECA ou des antagonistes du récepteur AT-1, n'entraînent qu'une diminution modérée des taux d'aldostérone chez le rat ou la souris (Gomez, 2017). Le SRA intrasurrénalien seul ne suffit donc pas à expliquer le maintien de la sécrétion d'aldostérone chez ces animaux. Ces données suggèrent l'existence de systèmes de régulation qui s'additionnent aux principaux régulateurs des sécrétions d'aldostérone. En plus des cellules stéroïdogènes, toute une variété de types cellulaires compose le tissu surrénalien.

Ces différentes cellules sont capables de libérer des substances bioactives qui modulent la sécrétion des corticostéroïdes (Lefebvre, Duparc *et al.*, 2015). A la régulation de la fonction corticosurrénalienne par les facteurs circulants décrits précédemment s'ajoute donc la régulation par des facteurs locaux, *via* un contrôle para- ou autocrine (Lefebvre *et al.*, 2013). La majorité de ces systèmes de régulation ont été décrits *in vitro* et/ou dans des modèles animaux (Schinner and Bornstein, 2005). Les résultats obtenus jusqu'à présent sont quelque peu disparates car les effets exercés par les facteurs locaux varient parfois selon l'espèce et l'approche expérimentale utilisée. Par exemple chez le rat, la dopamine diminue la sécrétion d'aldostérone par la surrénale perfusée alors qu'elle augmente la sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulées de rat en culture primaire. *A contrario*, la dopamine inhibe la sécrétion d'aldostérone par les cellules corticosurrénaliennes de bœuf en culture (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998). À cause de ces variations inter-espèces, il ne semble donc pas judicieux de transposer les résultats obtenus chez les animaux directement à l'Homme. Les résultats divergents observés au cours des expérimentations menées *in vivo* et *in vitro* montrent l'importance des interactions entre les différents types cellulaires composant le tissu corticosurrénalien (**Figure 13**).

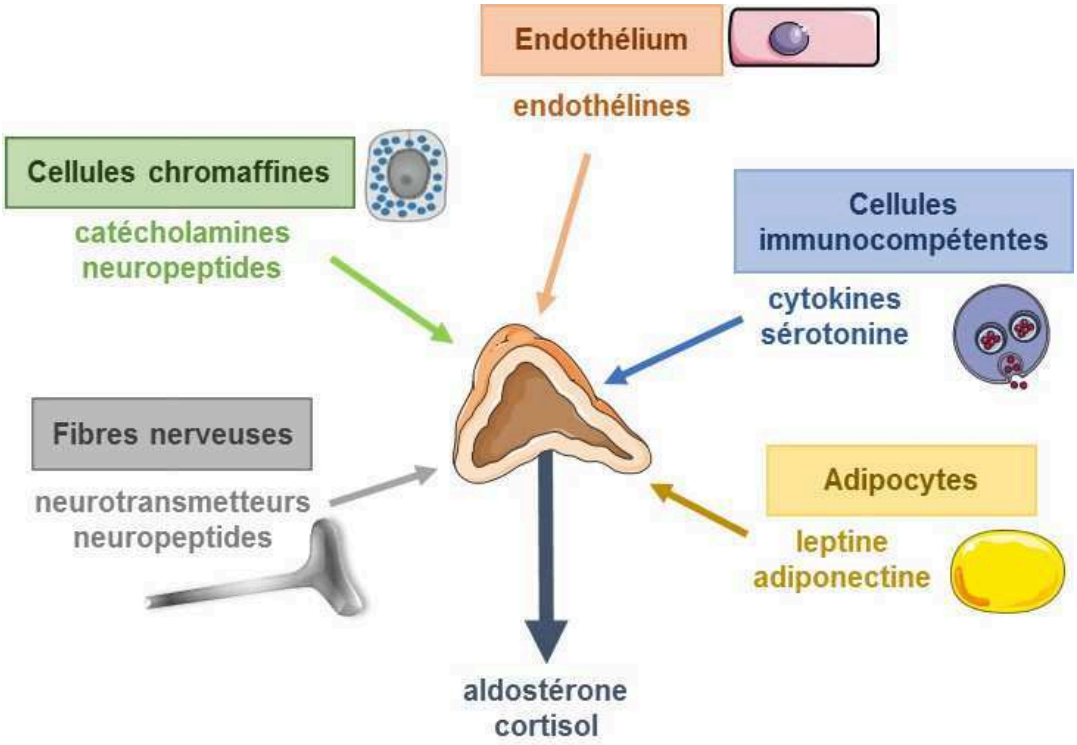


Figure 13 : Régulation paracrine des sécrétions d'aldostérone et de cortisol dans la surrénale humaine. Adapté d'après (Lefebvre, Duparc *et al.*, 2015).

3.1. Cellules chromaffines

Il n'existe pas de séparation physique entre les cellules de la médullosurrénale et les cellules de la zone réticulée qui sont d'ailleurs décrites comme étant plutôt entremêlées, avec des cordons de cellules chromaffines qui s'insinuent dans le cortex et inversement (Gallo-Payet *et al.*, 1987; Bornstein *et al.*, 1994). Cet enchevêtrement de cellules forme la jonction corticomédullaire. Une équipe allemande a largement décrit les éventuelles interactions chimiques qui existent entre les cellules chromaffines et les cellules de la réticulée, en particulier l'action de la DHEA sur les cellules chromaffines (Haase *et al.*, 2011). Dans la glande surrénale normale, l'ACTH est exprimée dans la médullosurrénale, au même titre que la CRH, et semble capable de stimuler les cellules corticales de façon paracrine (Vrezas *et al.*, 2003; Lefebvre *et al.*, 2016). Une étude réalisée sur des cellules corticosurrénaliennes et médullaires de bœuf en co-culture a montré que l'ACTH d'origine médullaire pouvait influencer la sécrétion des zones fasciculée et réticulée (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2000). Il est possible que le contrôle paracrine de l'ACTH soit sollicité dans les mécanismes de réponse au stress et/ou à l'inflammation. Du fait de la distance séparant les cellules chromaffines des cellules de la ZG et de la ZF d'une part, et du flux sanguin centripète traversant la surrénale d'autre part, il paraît peu probable que les sécrétions des cellules chromaffines aient un quelconque effet sur la sécrétion des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes *in vivo*. Toutefois, il existe des cellules chromaffines isolées dans le cortex qui pourraient en effet contrôler la sécrétion de cortisol par la libération d'ACTH (Bornstein *et al.*, 1994). La capacité des catécholamines à stimuler la production de cortisol a été observée dans des cellules corticosurrénaliennes de bœuf *in vitro* (Walker *et al.*, 1988; Güse-Behling *et al.*, 1992). Dans ces modèles, il a également été montré que les catécholamines pouvaient stimuler l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse et de StAR (Haidan *et al.*, 2000). De tels effets ne sont pas retrouvés chez l'Homme. Les cellules chromaffines produisent également toute une variété de neuropeptides et notamment la CRH, les tachykinines, les enképhalines, le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), le VIP (*vasoactive intestinal peptide*), le NPY (neuropeptide Y) et la somatostatine qui peuvent potentiellement influencer la stéroïdogenèse (Leszczyszyn *et al.*, 1991; Hinson *et al.*, 1994; Nussdorfer and Malendowicz, 1998; Conconi *et al.*, 2006). Leurs effets sur les cellules corticosurrénaliennes sont abordés ci-après.

3.2. Fibres nerveuses

Les fibres nerveuses traversant le cortex surrénalien sont susceptibles d'exercer une influence directe sur le tissu en projetant des terminaisons nerveuses au contact des cellules corticosurrénaliennes. A l'image des cellules chromaffines, les fibres nerveuses contiennent divers neurotransmetteurs conventionnels et neuropeptides tels que l'acétylcholine, la noradrénaline, la dopamine, la cholescytokinine, la substance P, le PACAP, le VIP, le CGRP (*calcitonin gene-related peptide*), le NPY ou encore la somatostatine. Les effets de ces neuropeptides ont été décrits dans quelques modèles animaux chez lesquels ils se sont montrés capable d'influencer la stéroïdogenèse (pour revue : (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998)). Le rôle exercé par ces nombreux neuropeptides et neurotransmetteurs classiques reste à éclaircir mais il existe vraisemblablement un contrôle nerveux non négligeable de la sécrétion des corticostéroïdes. Des travaux en cours de réalisation dans notre équipe tendent à renforcer ce concept, notamment *via* l'étude de la stimulation directe par la substance P de la sécrétion d'aldostérone chez l'Homme.

3.3. Cellules adipeuses

Les glandes surrénales sont entourées d'un épais tissu adipeux. Les adipocytes qui composent ce tissu sont également présents de manière isolée au voisinage des cellules corticosurrénaliennes. Le surnageant d'adipocytes a été décrit comme capable de stimuler la sécrétion de stéroïdes par les cellules corticosurrénaliennes H295R, avec un effet prédominant sur la sécrétion d'aldostérone (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 2003). La même équipe a montré que la stimulation de la stéroïdogenèse passait partiellement par une stimulation de l'expression de StAR (Krug *et al.*, 2007; Schinner *et al.*, 2007), suggérant une capacité des adipocytes à sécréter des substances bioactives pouvant influencer les sécrétions stéroïdiennes de manière paracrine. Les adipocytes sécrètent, entre autres, des facteurs appelés adipokines. Parmi elles, trois substances potentiellement impliquées dans la régulation paracrine de la sécrétion des corticostéroïdes ont été étudiées : la leptine, l'adiponectine et le CTRP-1 (*complement-C1q TNF-related protein-1*) (Dinh Cat *et al.*, 2016). D'après les travaux menés par l'équipe de S. Bornstein, la leptine est capable de stimuler à la fois la synthèse d'aldostérone et de cortisol de façon dose-dépendante mais également d'inhiber l'expression de l'enzyme CYP17 (Glasow and Bornstein, 2000). De son côté, l'adiponectine augmente l'expression de StAR et stimule la sécrétion de cortisol (Degawa-Yamauchi *et al.*, 2005). Enfin, CTRP-1, analogue de l'adiponectine partageant avec cette dernière 30 à 50 % d'homologie de séquence, stimule la

production d'aldostérone par les cellules H295R et augmente l'expression de *CYP11B2* mais pas de *CYP11B1* (Jeon *et al.*, 2008). La validité de ces résultats est confortée par la mise en évidence des récepteurs de la leptine et de l'adiponectine dans la glande surrénale humaine (Glasow *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 2006), le récepteur de CTRP-1 n'ayant pas été identifié à ce jour. Au niveau physiopathologique, ces facteurs sont soupçonnés de jouer un rôle dans la genèse de l'hyperaldostéronisme observé chez le sujet obèse.

3.4. Cellules de l'endothélium

Comme décrit plus tôt dans ce document, les glandes surrénales sont traversées par un dense réseau vasculaire. En dehors de la fonction d'irrigation, le réseau vasculaire exerce une régulation paracrine grâce aux cellules endothéliales capables de sécréter des peptides bioactifs : les endothélines de type 1 (ET-1), 2 et 3. Les effets de l'ET-1 sont relayés par les récepteurs ET_A et ET_B, la présence d' ET_A ayant été montrée dans la ZG spécifiquement tandis que le récepteur ET_B est retrouvé dans tout le cortex (Rossi *et al.*, 1994; Davenport *et al.*, 1996). L'ET-1 module la sécrétion d'aldostérone dans diverses espèces (Delarue *et al.*, 2004). Chez l'Homme, l'ET-1 est connu pour augmenter la sécrétion d'aldostérone (Rossi *et al.*, 2000).

3.5. Cellules immunitaires et facteurs de croissance

Les cellules immunitaires présentes à l'intérieur du tissu surrénalien, telles que les macrophages, les mastocytes et les lymphocytes, sécrètent des substances capables de moduler directement l'activité sécrétoire ; notamment les interleukines 1 (IL-1), 6 (IL-6) ainsi que le facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor* ; TNFα) (Bornstein *et al.*, 2004). Les cellules surrénaliennes ont elles-mêmes la capacité de produire des interleukines (González-Hernández *et al.*, 1995; Päth *et al.*, 1997). IL-1 et son ARNm correspondant sont retrouvés dans le cortex surrénalien bien que son effet sur la sécrétion des corticostéroïdes ne soit pas connu chez l'Homme (González-Hernández *et al.*, 1995). Chez le rat, IL-1 est inhibiteur de la synthèse d'aldostérone mais stimule la libération de corticostérone (Natarajan *et al.*, 1989; Tominaga *et al.*, 1991). La présence des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNFα, ainsi que celle de leurs récepteurs ont été mises en évidence au sein des trois zones qui composent le cortex surrénalien humain (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 1994; González-Hernández *et al.*, 1996; Päth *et al.*, 1997). Ces deux cytokines stimulent la sécrétion de cortisol par les cellules corticosurrénaliennes humaines en culture (Judd *et al.*, 2000). Paradoxalement, l'IL-6 stimule tandis que TNFα inhibe la libération d'aldostérone. Ces cytokines produites et sécrétées localement sont soupçonnées

d'influencer la réponse au stress aigu et chronique en agissant comme facteur paracrine. Enfin, les mastocytes renferment de nombreux médiateurs chimiques contenus dans des granules de sécrétion. L'activation de ces mastocytes provoque leur dégranulation entraînant la libération de substances, telles que l'histamine et des facteurs de croissance. Les facteurs de croissance comme l'EGF (*endothelial growth factor*) ou le FGF (*fibroblast growth factor*) sont connus de longue date pour favoriser le développement surrénalien et influencer, selon le contexte cellulaire, la sécrétion d'aldostérone (Feige and Baird, 1991). Les mastocytes libèrent également de la sérotonine dont le rôle bien documenté sera détaillé dans un chapitre dédié (voir § II.F.2. Rôle périphérique de la sérotonine).

4. Anomalies de la sécrétion des hormones corticosurrénaliennes

4.1. L'insuffisance surrénalienne

Les anomalies de la sécrétion des glucocorticoïdes peuvent se traduire par un défaut de sécrétion du cortisol ; on parle alors d'insuffisance surrénalienne. Les causes d'insuffisance surrénalienne sont multiples. Elles peuvent être acquises et résulter notamment d'une atteinte auto-immune (maladie d'Addison) ou constitutionnelles en relation avec une anomalie génétique.

L'hyperplasie congénitale des surrénales (HCS) est une maladie liée à un déficit enzymatique provoquant chez le patient une incapacité totale ou partielle à produire certains corticostéroïdes, notamment l'aldostérone et le cortisol (**Figure 14**). Ce type d'insuffisance surrénalienne est rare puisqu'il touche 1 naissance sur 15 000 en Europe. De transmission autosomique récessive, l'HCS peut être causée par 4 déficits enzymatiques différents (21-OH, 11β-OH, 3β-HSD2, 17α-OH), la forme la plus fréquente étant le déficit en 21-OH communément appelé « bloc en 21-OH » (90 % des cas d'HCS) (Turcu and Auchus, 2015). Un tel déficit enzymatique est à l'origine d'une accumulation des précurseurs. Ces précurseurs, majoritairement représentés par la 17-OHP, sont redirigés vers la voie de synthèse des androgènes. Leur abondance est responsable d'un excès d'androgènes surrénaliens chez le patient entraînant une masculinisation des filles (Kamrath *et al.*, 2013; Witchel, 2017).

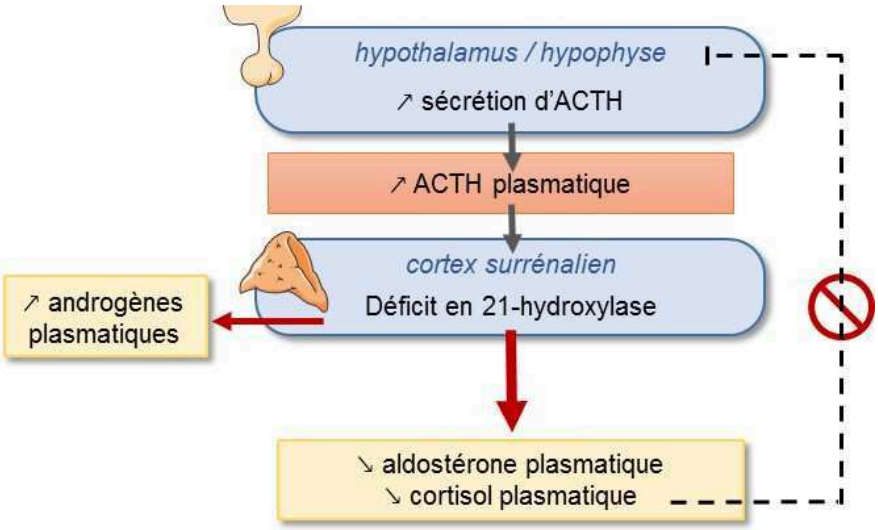


Figure 14 : Schéma illustrant la physiopathologie du bloc en 21-hydroxylase. Le déficit en 21-hydroxylase entraîne une diminution de la synthèse d'aldostérone et de cortisol. L'absence de rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire est responsable d'une hypersécrétion d'adrénocorticotrophine (**ACTH**) qui stimule l'activité et la synthèse des enzymes de la stéroïdogenèse, contribue à l'accumulation de précurseurs en amont du bloc et *in fine*, à la production d'androgènes.

L'HCS est, depuis 1996, dépistée dès le 3e jour de vie grâce au test néonatal du buvard (ou test de Guthrie) qui permet un dosage rapide de la 17-OHP. Les mutations du gène *CYP21A2*, situé sur le bras court du chromosome 6, peuvent s'exprimer de deux manières différentes :

- ***La forme classique avec déficit enzymatique sévère (fréquence 1/15000) :*** l'enzyme 21-hydroxylase est non fonctionnelle. La forme classique présente deux formes cliniques : une forme virilisante pure, responsable d'une perte de sel et une virilisation des organes génitaux externes chez le nouveau-né de sexe féminin, ou avec perte de sel (Witchel, 2017). Le traitement substitutif est indispensable, adapté au déficit hormonal en minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes, et doit être pris à vie. En règle générale, les patients sont traités par fludrocortisone pour palier au déficit en aldostérone et par hydrocortisone pour compenser le déficit en cortisol.
- ***La forme non classique, sans perte de sel (fréquence 1/1000) :*** le déficit enzymatique est modéré car l'enzyme est partiellement fonctionnelle. La forme non classique est généralement découverte pendant ou après la puberté. Les patients présentent des signes d'excès en androgènes (acné, croissance accélérée, pilosité précoce), particulièrement gênants chez la femme et se traduisant selon la sévérité du bloc enzymatique par un hirsutisme, des ovaires polykystiques, une hypofertilité et une irrégularité menstruelle. Chez ces femmes, la prescription d'anti-androgènes peut éviter d'avoir recours à des

glucocorticoïdes. Selon la gravité du déficit, les traitements substitutifs ne sont pas toujours nécessaires.

Dans cette pathologie, l'absence de rétrocontrôle négatif par le cortisol au niveau hypothalamo-hypophysaire conduit à une augmentation de la sécrétion de CRH et d'ACTH (Falhammar and Nordenström, 2015). L'hyperstimulation de la surrénale par l'ACTH génère une croissance corticale. Il en résulte une hyperplasie du tissu, en particulier des ZF et ZR. La suractivation de la voie AMPc/PKA *via* le MC2-R pourrait également affecter le développement du tissu surrénalien en induisant un déséquilibre avec les voies Wnt/β-caténine.

4.2. L'hypersécrétion de minéralocorticoïdes

L'hyperaldostéronisme primaire est une pathologie caractérisée par une sécrétion autonome d'aldostérone avec un taux de rénine généralement bas car la sécrétion de l'enzyme est réprimée par l'excès d'aldostérone plasmatique (Lalli *et al.*, 2016). En accord avec le rôle physiologique des minéralocorticoïdes, l'hypersécrétion d'aldostérone entraîne une fuite urinaire de potassium à l'origine d'une hypokaliémie, tandis que la rétention excessive de sodium est responsable d'une hypervolémie induisant une hypertension artérielle permanente souvent résistante aux antihypertenseurs. L'hyperaldostéronisme est la cause la plus fréquente d'hypertension artérielle secondaire. L'hypertension artérielle s'accompagne de troubles neuromusculaires et notamment asthénie, crampes, crises de tétanie, troubles de la sensibilité aux extrémités des membres et constipation. L'hyperaldostéronisme primaire est dû, dans 30 à 50 % des cas, à l'apparition d'un adénome corticosurrénalien producteur d'aldostérone (APA) également appelé adénome de Conn. Il s'agit d'une tumeur unilatérale bénigne de la glande surrénale mesurant entre 10 et 15 mm. En revanche, dans la majorité des cas (50-70 %), l'hyperaldostéronisme est la conséquence d'une hyperplasie bilatérale des surrénales (Funder *et al.*, 2008).

Anomalies liées aux mutations génétiques

L'apparition d'un adénome de Conn peut être consécutive à une mutation somatique de type « gain de fonction » impactant des sous-unités des canaux calciques de types L et T (*CACNA1D*, *CACNA1H*), les canaux potassiques (*KCNJ5*) ou encore des sous-unités des ATPases (*ATP1A1* et *ATP2B3*) (Fernandes-Rosa *et al.*, 2017; Zennaro *et al.*, 2018). Globalement, ces mutations entraînent une dépolarisation membranaire des cellules à l'origine d'une élévation du calcium cytosolique conduisant à une production augmentée d'aldostérone (**Figure 15**). Les hyperplasies sont plus couramment induites par des mutations germinales

responsables des formes familiales d'hyperaldostéronisme primaire. Dans ces cas, les mutations germinales peuvent affecter les gènes *KCNJ5* ou *CACNA1D* / *CACNA1H* mais peuvent également être dues à un évènement génétique de type recombinaison homologue inégale (*cross-over*) entre les gènes *CYP11B1* et *CYP11B2*. Cette recombinaison provoque l'apparition d'un gène chimère possédant le promoteur de *CYP11B1* et la séquence codante *CYP11B2*. En conséquence, la sécrétion d'aldostérone est fortement stimulée par l'ACTH et réprimée par les glucocorticoïdes exogènes comme la dexaméthasone.

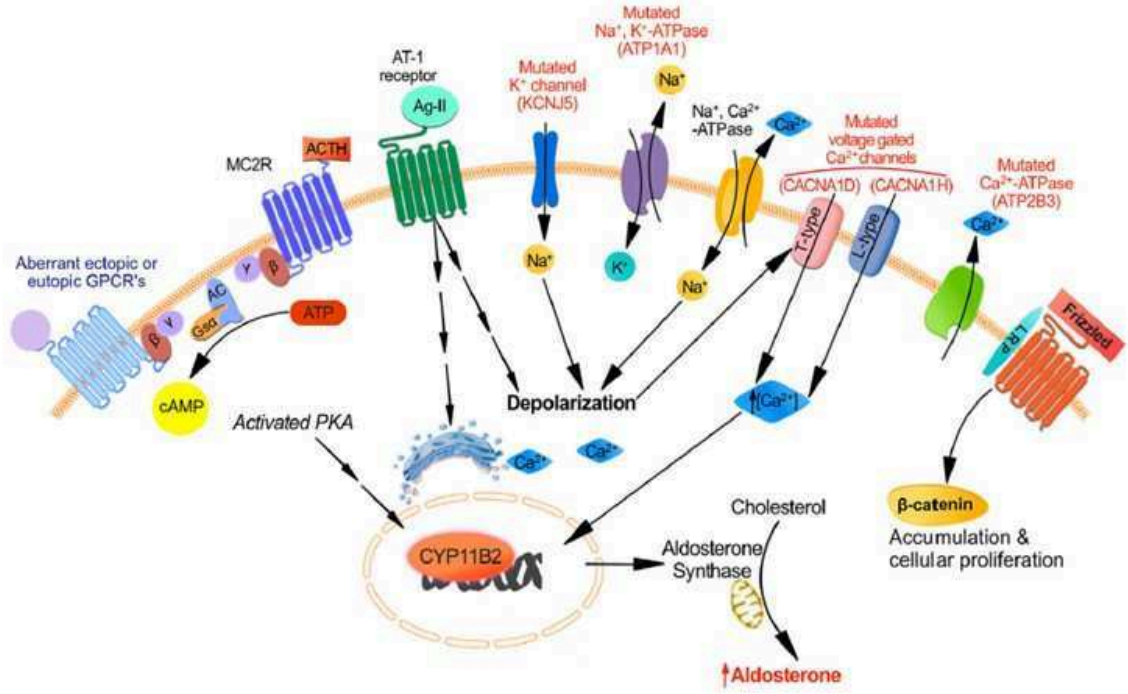


Figure 15 : Régulation de la synthèse d'aldostérone en conditions physio- et pathologiques. En conditions physiologiques, la production d'aldostérone est régulée par l'AngII, l'ACTH (en noir) et le taux de potassium plasmatique. Dans les adénomes producteurs d'aldostérone, la synthèse d'aldostérone peut être contrôlée par des récepteurs illégitimes (en bleu), par l'intervention de canaux ioniques aberrants (en rouge). D'après (El Ghorayeb *et al.*, 2016).

Les mutations du gène *PRKACA*, codant une sous-unité catalytique de la PKA, ont été décrites chez des patients avec adénome de Conn mais il s'agit d'un évènement inhabituel pour des lésions sécrétant de l'aldostérone, ces mutations étant plutôt observées dans les adénomes sécrétant du cortisol ou dans les tumeurs malignes de la corticosurrénale (corticosurrénalomes) (Rhayem *et al.*, 2016).

Les altérations de la voie Wnt-β-caténine sont maintenant mises en cause dans de nombreuses pathologies corticosurrénaliennes (El Wakil and Lalli, 2011). En effet, des mutations du gène *CTNNB1* codant la β-caténine ont été mises en évidence dans des adénomes

de Conn et des hyperplasies responsables d'un hyperaldostéronisme primaire (Åkerström *et al.*, 2016). Dans le modèle murin ΔCat, présentant une activation sélective de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien suite à la délétion de l'exon 3 portant les régions régulatrices du gène *Ctnnb1*, il a été montré qu'il existe une corrélation positive entre l'expression de *Axin2* ou *Lef1* et *Cyp11b2*, associant l'activation de la voie Wnt/β-caténine à l'hyperaldostéronisme (Berthon *et al.*, 2014). De manière intéressante, un adénome de Conn avec mutation somatique *CTNNB1* a été découvert chez deux femmes enceintes et une femme ménopausée. Cette anomalie génétique était accompagnée d'une expression anormale de récepteurs à la LH/hCG et à la GnRH (Teo *et al.*, 2015). Les auteurs suggèrent que l'activation de la voie Wnt/β-caténine pourrait conduire à l'apparition de récepteurs illégitimes reflétant une différenciation gonadique des cellules. Ces résultats sont corroborés par les travaux de l'équipe de K.D. Wu montrant une expression hétérogène de la β-caténine et des récepteurs gonadiques à la LH et à la GnRH (GnRH-R) dans une série d'adénomes de Conn (Wu *et al.*, 2017). Cette observation n'a cependant pas été confirmée dans une étude rétrospective récente, portant notamment sur une large série d'adénomes exprimant le LH-R puisque ceux-ci ne présentaient pas de mutation *CTNNB1* (Gagnon *et al.*, 2018). Le possible lien entre l'activation de la voie Wnt/β-caténine due à une mutation *CTNNB1* et l'expression de récepteurs illégitimes reste donc un sujet de débat.

Chez les patients atteints de polypose adénomateuse familial (FAP; *familial adenomatous polyposis*), il existe une mutation germinale inactivatrice du gène *APC* codant une protéine qui participe à la dégradation de la β-caténine. Il en résulte une activation de la voie Wnt/β-caténine corrélée à l'émergence de clones cellulaires agressifs et à des taux de survie particulièrement faibles (De Marchis *et al.*, 2017). Ces patients sont prédisposés à l'apparition de tumeurs coliques mais aussi extra-coliques, comme les tumeurs corticosurrénaliennes par exemple (Groen *et al.*, 2008). Les analyses génétiques ont montré que dans certains adénomes surrénalien, l'ADN tumoral contient un allèle portant une mutation germinale et un allèle avec mutation somatique conduisant à une inactivation complète du gène *APC* dans ces cellules, en accord avec le modèle du *second-hit* (Gaujoux *et al.*, 2010; Berthon *et al.*, 2012). Une cinquantaine de cas de patients présentant un adénome surrénalien suite à un FAP ont été rapportés dans la littérature en un siècle, pour la plupart asymptomatiques et souvent découverts à l'autopsie. La plupart des adénomes ne sont pas sécrétants bien que des cas d'adénomes produisant de l'aldostérone ou du cortisol aient été rapportés (Groen *et al.*, 2008). Des hyperplasies nodulaires bilatérales ont également été décrites. Les carcinomes

surrénaliens associés à un FAP sont extrêmement rares. De manière intéressante, il a été rapporté un cas d'hyperaldostéronisme primaire dû à un adénome de Conn avec mutation *KCNJ5*, associé à une polypose colique familiale découverte fortuitement (Vouillarmet *et al.*, 2016). D'après les auteurs, l'hyperaldostéronisme primaire serait entièrement imputable à la mutation « gain de fonction » du canal potassique tandis que la mutation APC, à l'origine de la formation de nombreux nodules, jouerait un rôle majoritaire dans l'hyperplasie des surrénales.

Anomalies liées aux récepteurs couplés aux protéines G

Les trois décennies précédentes ont vu paraître une série d'études *in vivo* et *in vitro* démontrant l'expression anormale de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) activant une sécrétion hormonale dans les lésions surrénaliennes (St-Jean *et al.*, 2018). Dans les APA, une augmentation de l'expression de certains RCPG présents naturellement dans la surrénale, ainsi qu'une expression ectopique d'autres RCPG ont été décrites. Dans une série de patients avec APA, il a été montré que l'administration d'AVP chez les patients stimulait anormalement la sécrétion d'aldostérone *via* l'activation de récepteurs V1a (Perraudin *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'administration de GnRH chez quelques patients avec APA induisait une élévation de l'aldostéronémie (Albiger *et al.*, 2011). Cette réponse hormonale était due à une augmentation de l'expression du GnRH-R et du LH-R détectée par PCR quantitative, les récepteurs à la LH et à la GnRH étant retrouvés dans la surrénale humaine normale (Pabon *et al.*, 1996; Nakamura *et al.*, 2014). Le LH-R est en effet abondamment exprimé au niveau de la ZR tandis que le récepteur à la GnRH est préférentiellement localisé dans la ZG et la ZF de manière éparse. Ces observations sont en accord avec les travaux réalisés par C.V. Rao qui, en traitant les cellules corticosurrénaliennes H295R avec l'hCG, a remarqué une augmentation de la sécrétion de DHEA-S (Rao *et al.*, 2004). Comme cité dans le précédent paragraphe, les récepteurs à la LH et à la GnRH ont également été mis en évidence dans les adénomes de Conn de patientes enceintes et d'une patiente ménopausée, souffrant toutes trois d'hyperaldostéronisme (Albiger *et al.*, 2011; Teo *et al.*, 2015). De manière intéressante, la stimulation du LH-R et du récepteur à la GnRH dans les APA conduit à une augmentation de l'expression de l'aldostérone synthase en agissant directement sur le promoteur de *CYP11B2* (Saner-Amigh *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2014). Des analyses transcriptomiques sur puces à ADN menées sur des APA ont mis en évidence la surexpression ou l'expression ectopique de différents RCPG dont les récepteurs de la LH, la GnRH, du glutamate et les récepteurs sérotoninergiques de type 4 et 7 (Ye *et al.*, 2007). Les anomalies relatives aux récepteurs de la sérotonine seront détaillées dans le chapitre

concerné. Pour l'heure, le lien de cause à effet entre les mutations génétiques et l'expression de récepteurs illégitimes n'est pas connu.

4.3. Anomalies de la sécrétion de glucocorticoïdes

A l'instar de ce que nous venons d'évoquer pour les minéralocorticoïdes, la sécrétion de glucocorticoïdes peut présenter des altérations diverses. Ainsi, un déficit en cortisol définit l'insuffisance surrénalienne comme observé dans le bloc enzymatique en 21-OH décrit précédemment (**Figure 14**). A l'inverse, il existe des pathologies responsables d'un excès de cortisol, ou hypercortisolisme, à l'origine d'un tableau clinique et biologique appelé syndrome de Cushing.

Le syndrome de Cushing est caractérisé par un ensemble de symptômes comprenant hypertension artérielle, diabète, amyotrophie proximale notamment quadricipitale, répartition facio-tronculaire, érythrose cutanée et vergetures pourpres abdominales et axillaires (Raff *et al.*, 2014; Ceccato and Boscaro, 2016) (**Figure 16**). Le syndrome de Cushing peut résulter d'un excès ACTH lié à un adénome hypophysaire (maladie de Cushing) ou résultant d'une production ectopique d'ACTH par une tumeur extra-hypophysaire (syndrome de Cushing paranéoplasique). Ces deux situations sont désignées par le terme d'hypercortisolisme ACTH-dépendant. Dans les autres cas, l'hypersécrétion de cortisol provient de lésions surrénaliennes uni- ou bilatérales, entraînant une freination de la production hypophysaire d'ACTH. On parle alors d'hypercortisolisme ACTH-indépendant (Lacroix *et al.*, 2015).

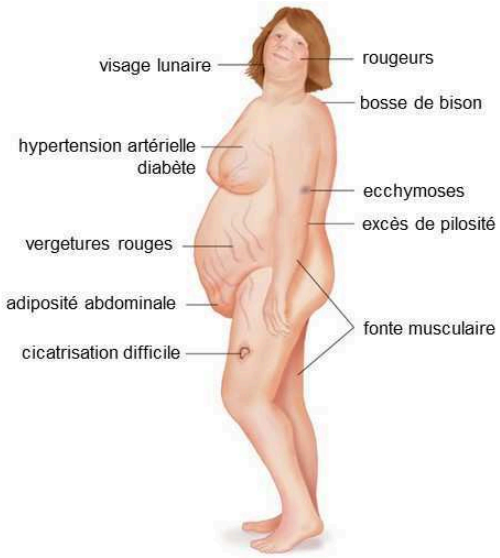


Figure 16 : Illustration des principaux signes cliniques observables au cours du syndrome de Cushing.

4.3.1. Le syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH

Adénome corticotrope sécrétant de l'ACTH

La maladie de Cushing est une pathologie rare, bien qu'elle représente la cause la plus fréquente de l'hypercortisolisme endogène. La maladie de Cushing est en effet à l'origine de 75% des diagnostics de syndrome de Cushing (Chabre, 2014). Elle touche les femmes de façon prédominante. La maladie de Cushing résulte de l'hypersécrétion d'ACTH par un adénome hypophysaire corticotrope, souvent de petite taille (2 mm ou moins dans 90 % des cas), qui stimule de façon intense et prolongée la sécrétion de cortisol au niveau surrénalien (**Figure 17**). L'adénome corticotrope n'est pas sensible au rétrocontrôle négatif par le cortisol. L'hypercortisolisme peut s'accompagner d'une hypersécrétion d'androgènes surrénaliens liée à la stimulation des cellules de la ZR par l'ACTH. L'hyperandrogénie est responsable d'un hirsutisme et de troubles du cycle menstruel chez la femme. De rares cas familiaux ont été rapportés pour cette pathologie qui est plutôt de présentation sporadique (Albani Adriana *et al.*, 2017).

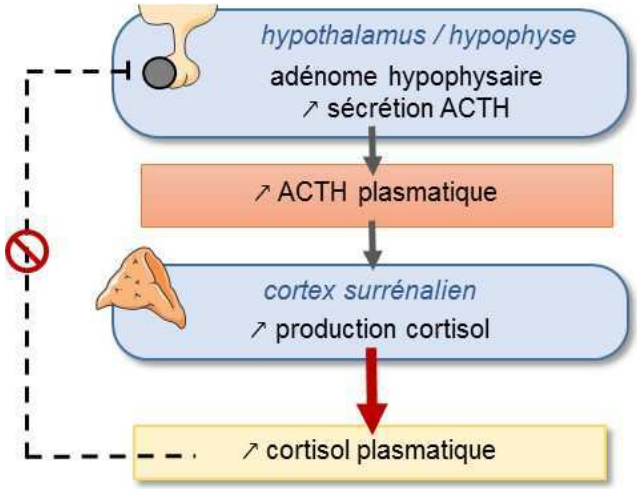


Figure 17 : Schéma illustrant la physiopathologie de la maladie de Cushing. Dans la maladie de Cushing, la sécrétion d'adrénocorticotrophine (**ACTH**) par un adénome hypophysaire corticotrope est responsable de l'élévation du taux plasmatique d'ACTH. La stimulation de la stéroïdogenèse qui en résulte est à l'origine de l'hypercortisolisme chez les patients. La sécrétion d'ACTH par l'adénome hypophysaire est insensible au rétrocontrôle par le cortisol plasmatique.

Syndrome de Cushing paranéoplasique

Une sécrétion ectopique d'ACTH peut également être à l'origine d'un syndrome de Cushing, dit paranéoplasique. Dans environ 10% des syndromes de Cushing, l'ACTH est produite par un carcinome peu différencié ou indifférencié de mauvais pronostic (cancer à petites cellules du poumon) ou par une tumeur neuroendocrine bien différenciée (tumeur carcinoïde) (Sand *et al.*, 2007; Satoh *et al.*, 2012). Ces tumeurs primaires sécrétantes sont la

cause d'une forte élévation des taux d'ACTH et de cortisol plasmatiques. Dans le cas où des métastases s'installent au niveau surrénalien, la sécrétion d'ACTH locale amplifie la stimulation des cellules productrices de cortisol (**Figure 18**). Certains phéochromocytomes, tumeurs de la médullosurrénale productrices de catécholamines, peuvent également être la cause d'une hypersécrétion locale d'ACTH pouvant ainsi conduire à un syndrome de Cushing ACTH-dépendant (Ballav *et al.*, 2012; Sakuma *et al.*, 2016).

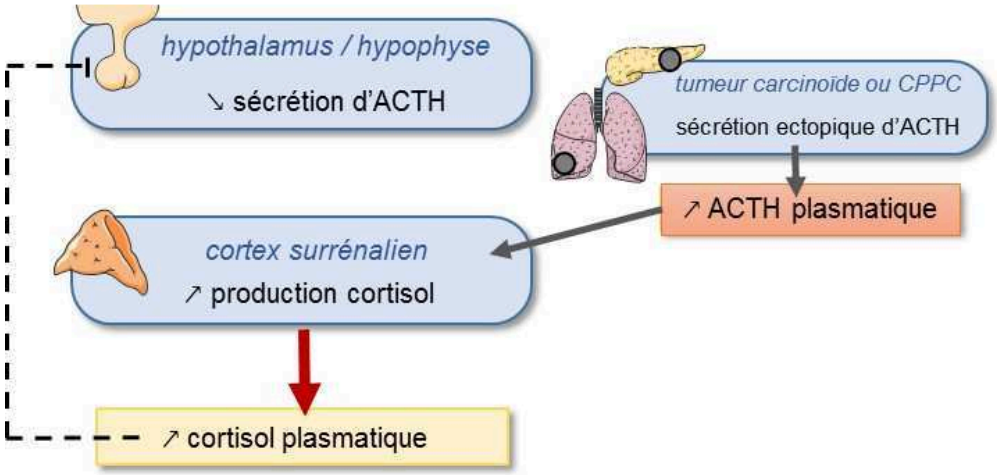


Figure 18 : Schéma illustrant la physiopathologie du syndrome de Cushing paranéoplasique. La sécrétion ectopique d'adrénocorticotrophine (**ACTH**) provoque une importante augmentation du taux plasmatique d'ACTH qui est responsable de l'hypercortisolisme. La cortisolémie élevée exerce un rétrocontrôle sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. **CPPC** : cancer du poumon à petites cellules.

Dans la littérature a été rapporté un cas de Cushing paranéoplasique exceptionnel dû à une tumeur primaire pancréatique sécrétant à la fois de l'ACTH et de la CRH (Young *et al.*, 1998). Dans ce cas particulier, la sécrétion ectopique de CRH stimulait la production d'ACTH par les cellules hypophysaires normales, ce qui renfonçait l'hypercortisolisme. Les syndromes de Cushing paranéoplasiques ont également été mis en évidence chez l'enfant et l'adolescent (More *et al.*, 2011).

4.3.2. Le syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH

Le syndrome de Cushing ACTH-indépendant résulte dans 90% des cas de néoplasies corticosurrénaliennes bénignes, le plus souvent unilatérales (adénomes), parfois bilatérales (hyperplasies). Les hyperplasies sont subdivisées en hyperplasies macro- ou micronodulaires. Dans tous les cas, les lésions libèrent des quantités excessives de cortisol alors même que l'ACTH plasmatique est effondrée sous l'effet de la freination de l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'hypercortisolisme. Comment expliquer la persistance de l'hypersécrétion de glucocorticoïdes en l'absence de toute stimulation par l'ACTH circulante ? Initialement, les

chercheurs pensaient que les syndromes de Cushing ACTH-indépendants résultaient d'une sécrétion autonome, non régulée, de cortisol. Puis progressivement, des systèmes aberrants de régulation ont été mis en évidence, caractérisés par l'expression de récepteurs illégitimes couplés à une sécrétion de corticostéroïdes associée ou non à des mutations génétiques (Lacroix *et al.*, 2009, 2015; Drougat *et al.*, 2015; Lodish and Stratakis, 2016) (**Figure 19**). Les adénomes producteurs de cortisol, les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales et la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales figurent parmi les lésions corticosurrénaliennes primaires présentant de telles particularités.

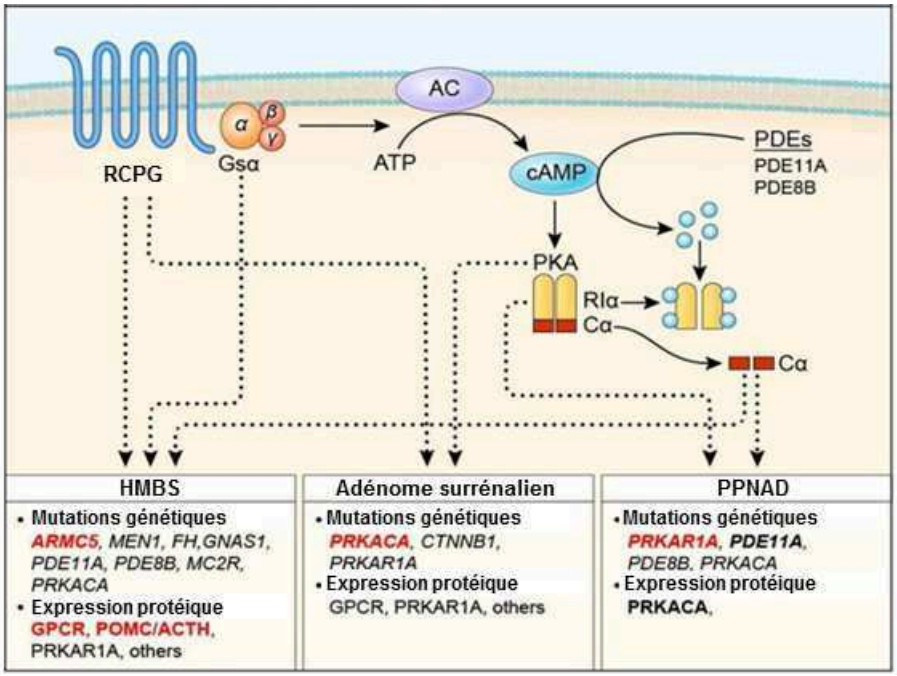


Figure 19 : Mécanismes physiopathologiques des hypercortisolismes primaires dus à une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales (**HMBS**), un adénome, une dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (en anglais **PPNAD** pour *Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease)* et des mutations responsables de ces pathologies. Adapté d'après (Lacroix *et al.*, 2015)

L'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales (HMBS) est une pathologie surrénalienne rare, responsable de moins de 1% des syndromes de Cushing (Lacroix *et al.*, 2009). L'HMBS est caractérisée par la présence de surrénales volumineuses comportant des macronodules riches en lipides. Elle apparaît plus fréquemment chez les femmes. Le diagnostic d'hypercortisolisme se fait chez le patient âgé de 50 à 60 ans en moyenne. Cette pathologie se présente principalement de façon sporadique principalement mais des cas familiaux ont été mis en évidence (Stratakis and Boikos, 2007; Assié *et al.*, 2013). Les patients souffrent d'un hypercortisolisme modéré qui contraste avec la masse importante des lésions surrénaliennes et

le nombre de cellules stéroïdogènes. La discordance entre le statut hormonal et le volume tumoral est expliquée par la répartition différentielle de la 17α-OH et de la 3β-HSD2 dans les cellules compactes et spongiocytaires, ce qui réduit l'efficacité de la stéroïdogenèse (Sasano *et al.*, 1994).

Récepteurs membranaires illégitimes

La physiopathologie des HMBS est restée incomprise pendant de nombreuses années. C'est au début des années 1990 qu'ont été découverts les premiers éléments permettant d'expliquer le taux d'ACTH plasmatique bas voire indétectable associé à la surproduction de cortisol observés chez les patients souffrant d'HMBS. La première anomalie décrite dans la littérature est l'expression de RCPG illégitimes tels que les récepteurs du peptide insulinotrope dépendant du glucose (*gastric inhibitory polypeptide*, GIP) (Lacroix *et al.*, 1992; Reznik *et al.*, 1992), de la sérotonine (Contesse *et al.*, 2005; Louiset *et al.*, 2006), de l'hormone lutéinisante (Lacroix *et al.*, 1999) et de l'AVP (Lacroix *et al.*, 2004, 2009). L'activation de ces récepteurs par des facteurs circulants comme l'AVP, le GIP ou la LH, stimule la production de cortisol ce qui permet en partie d'expliquer que la production de glucocorticoïdes puisse s'affranchir du contrôle par l'ACTH (Lacroix *et al.*, 1999; Bertherat *et al.*, 2005; Louiset *et al.*, 2014). Les mécanismes qui sous-tendent l'expression de ces récepteurs illégitimes ne sont pour l'heure pas clairement identifiés. Il existe cependant des hypothèses qui se concentrent sur une explication moléculaire. Par exemple, l'expression anormale du LH-R pourrait résulter d'un déséquilibre entre les facteurs de transcription spécifiques de la différenciation du primordium adrénogonadique en cellules surrénaliennes et gonadiques, comme les facteurs GATA4 et GATA6. En effet, l'expression de *GATA4* a été montrée dans une hyperplasie bilatérale responsable d'un syndrome de Cushing et exprimant des récepteurs de la LH fonctionnels (Plöckinger *et al.*, 2017). Ces résultats coïncident avec la colocalisation des protéines GATA4 et LH-R observée dans un modèle murin transgénique gonadectomisé (Rahman *et al.*, 2004). Certains auteurs ont cependant montré chez la souris que l'activation du LH-R pourrait être un prérequis nécessaire à l'augmentation de l'expression de *GATA4* parallèlement à la diminution de l'expression de *GATA6* (Doroszko *et al.*, 2017). Concernant le GIP-R, il a très récemment été décrit dans une HMBS l'existence d'une duplication du bras long du chromosome 19, contenant le gène qui code le GIP-R, à l'origine d'un gain de matériel génétique susceptible d'expliquer la surexpression de ce récepteur (Lecoq *et al.*, 2017). Dans cette étude, les auteurs ont également rapporté la présence de microduplications associées à des réarrangements

chromosomiques dans deux adénomes responsables d'un syndrome de Cushing exprimant le GIP-R, avec une microduplication en aval d'un promoteur sensible aux éléments de réponse aux glucocorticoïdes pour l'un des deux adénomes. Dans ce cas particulier, la production de cortisol représenterait par conséquent un facteur de contrôle positif de l'expression du GIP-R formant ainsi une boucle locale d'auto-amplification de la stéroïdogenèse surrénalienne. Dans les HMBS peuvent également apparaître des couplages aberrants de récepteurs eutopiques provoquant par exemple une régulation anormale par les facteurs paracrines (Lefebvre, Céline Duparc, *et al.*, 2015).

Production intra-surrénalienne d'ACTH

L'anomalie la plus fréquente observée dans les HMBS est sans conteste la production intra-surrénalienne d'ACTH (Lefebvre *et al.*, 2003; Mazzuco *et al.*, 2007; Iwata *et al.*, 2012). Une étude menée par notre équipe chez 30 patients atteints d'HMBS a révélé une expression variable du gène *POMC* et de la proconvertase 1, enzyme nécessaire à la maturation de la POMC en ACTH, au niveau de la corticosurrénale (Louiset *et al.*, 2013). La présence d'ACTH a été également mise en évidence par immunohistochimie dans de petits groupes de cellules stéroïdogènes éparses. Les facteurs de transcription hypophysaires TPIT et PTX1 sont nécessaires à l'expression de la POMC dans l'hypophyse (Lamolet *et al.*, 2001). L'absence de ces deux facteurs de transcription dans les lésions surrénaliennes a montré que ces cellules ne présentaient pas de différenciation hypophysaire mais possédaient bien toutes les caractéristiques de cellules stéroïdogènes avec notamment l'expression de la 17α-OH et de SF1. Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'expression intrasurrénalienne de *POMC* ne sont pas connus à ce jour. Dans l'hypophyse, il a été rapporté que l'hypométhylation du promoteur du gène *POMC*, en particulier au niveau des sites de fixation des facteurs de transcription, est un critère indispensable à son expression (Newell-Price, 2003). L'hypométhylation du promoteur du gène *POMC* a également été observée dans les tumeurs thymiques carcinoïdes sécrétant de l'ACTH (Ye *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant d'étudier la méthylation du promoteur de la POMC dans les HMBS pour vérifier si l'expression du gène est due ou non à un défaut de méthylation. Possédant les caractéristiques des cellules stéroïdogènes, ces cellules productrices d'ACTH sont de plus positives pour le marqueur gonadique *insulin-like* 3 (INSL3), suggérant une différenciation pseudo-gonadique des cellules (Ivell *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 2003). Il est à noter que le gène de la POMC est aussi exprimé dans les cellules stéroïdogènes testiculaires et ovariennes de façon physiologique (Bardin *et al.*, 1987). La différenciation

pseudo-gonadique des cellules corticosurrénaliennes produisant de l'ACTH est également cohérente avec la présence illégitime du LH-R dans certaines HMBS. Les cellules productrices d'ACTH et leurs voisines sont également positives pour le MC2-R, dont l'expression est connue pour être stimulée par l'ACTH (Hofland *et al.*, 2012), bien que l'expression de ce récepteur dans les HMBS soit globalement diminuée par rapport à la surrénale normale (Assie *et al.*, 2010). Ce résultat démontre que l'ACTH intrasurrénalienne est capable de stimuler de manière autocrine et/ou paracrine la sécrétion de cortisol dans les HMBS. De plus, l'ACTH produite au sein de la surrénale ne semble pas être régulée négativement par le cortisol à la différence de l'ACTH hypophysaire. En revanche, la sécrétion d'ACTH par les HMBS apparaît stimulée par les ligands des récepteurs illégitimes (LH, sérotonine et GIP) (Louiset *et al.*, 2013). Globalement, ces découvertes ont conduit à revoir la classification des causes de syndrome de Cushing puisqu'il apparaît inexacte de classifier les HMBS dans la catégorie des syndromes de Cushing ACTH-indépendant. En résumé, les récepteurs illégitimes peuvent être i) des témoins de la différenciation gonadique (LH-R par exemple) ou ii) résulter de l'activation de la PKA suite à des mutations activatrices comme cela a été montré dans la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (*primary pigmented nodular adrenocortical disease* ; PPNAD) (Bram *et al.*, 2016) ou iii) possiblement par la production locale d'ACTH dans les HMBS.

Anomalies génétiques responsables de l'activation de la voie AMPc/PKA

Les mécanismes moléculaires à l'origine du développement des lésions surrénaliennes responsables d'un syndrome de Cushing sont longtemps restés méconnus. Toutefois, le caractère bilatéral des HMBS, ainsi que les cas familiaux qui ont été décrits dans la littérature, ont logiquement soulevé la question d'une éventuelle cause génétique (Alencar *et al.*, 2014). Il est désormais admis que les HMBS sont en partie la résultante d'anomalies génétiques. Globalement, les études génomiques récentes ont permis d'identifier des mutations favorisant le développement des néoplasies surrénaliennes productrices de cortisol (Faillot and Assie, 2016). Différents gènes codant des acteurs de la voie AMPc/PKA peuvent être affectés, à commencer par le gène *GNAS*, codant la protéine Gs, dont la mutation est responsable du syndrome de McCune-Albright, pathologie à caractère héréditaire responsable de tumeurs multiples (Weinstein *et al.*, 1991; Boston *et al.*, 1994). Dans cette pathologie, la sous-unité α de la protéine Gs est mutée provoquant ainsi l'activation constitutive de la voie AMPc/PKA. Dans la glande surrénale, l'activation de la protéine Gs qui est couplée au MC2-R entraîne une surproduction de cortisol *via* l'activation de la voie AMPc/PKA. Des mutations activatrices du

MC2R ont été décrites mais elles restent rares dans les HMBS (Lacroix *et al.*, 2015). Parmi les mutations activatrices, il existe des mutations affectant le gène *PRKACA* codant une des deux sous-unités catalytiques de la PKA ont été rapportées (Beuschlein *et al.*, 2014). Très récemment, des mutations activatrices du gène *PRKACB* codant la sous-unité catalytique β ont également été décrites (Espiard *et al.*, 2018). Dans ce cas, les sous-unités catalytiques ne peuvent pas se lier aux sous-unités régulatrices ; il en résulte alors une activation constitutive de la voie. Ces mutations ont été identifiées dans les adénomes de petite taille sécrétant du cortisol et responsables d'un syndrome de Cushing (Di Dalmazi *et al.*, 2014; Goh *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2014). Ils sont en général diagnostiqués chez le sujet jeune. Des mutations inactivatrices ont également été mises en évidence au niveau de gènes codant des éléments régulateurs de la voie AMPc/PKA et notamment *PRKAR1A* qui code pour la sous-unité régulatrice R1α de la PKA (Almeida and Stratakis, 2010). La suractivation de la voie AMPc/PKA qui en résulte conduit à l'apparition du PPNAD (Groussin *et al.*, 2002). Cette pathologie est caractérisée par l'apparition dans les surrénales d'un grand nombre de petits nodules pigmentés de jaune à marron-noir. Elle est diagnostiquée chez l'enfant ou le jeune adulte. Le PPNAD apparaît pour 60 % des cas dans le cadre d'un Complexe de Carney mais des cas sporadiques ont été rapportés (Groussin *et al.*, 2002; Bertherat *et al.*, 2003). L'inactivation spécifique du gène *Prkar1a* dans la surrénale de souris conduit à l'apparition d'un phénotype similaire au PPNAD avec formation de tumeurs et apparition d'un syndrome de Cushing plus fréquent chez les souris femelles comme cela a pu être observé chez l'humain (Bertherat *et al.*, 2009; Sahut-Barnola *et al.*, 2010; de Joussineau *et al.*, 2012). Des mutations inactivatrices peuvent impacter les PDE de types 8B et 11A, les rendant ainsi incapables d'hydrolyser l'AMPc en adénosine mono-phosphate (Horvath *et al.*, 2006; Almeida and Stratakis, 2010; Vezzosi *et al.*, 2012; Leal *et al.*, 2015). L'excès d'AMPc est à l'origine d'une forte activation de l'activité PKA qui engendre une surproduction de cortisol dans les cellules corticosurrénaliennes. Dernièrement, des mutations activatrices du récepteur aux glucocorticoïdes ont été mises en évidence dans une cohorte de patients avec HMBS, avec une prévalence non négligeable de 5% (Vitellius *et al.*, 2018). Les mutations inactivatrices touchant les gènes codant la ménine (MEN1), la fumarate hydratase (FH) ou la protéine APC sont également connues pour favoriser la survenue de lésions surrénaliennes cortisolosécrétantes (Lacroix *et al.*, 2015).

ARMC5 : premier gène de prédisposition aux HMBS

Par ailleurs, il a été montré qu'une partie des HMBS est associée à la présence de mutations germinales inactivant le gène *Armadillo Repeat Containing 5* ou *ARMC5* (chromosome 16, bras court). Ces mutations ont été identifiées chez 25 à 50% des patients atteints d'HMBS (Assié *et al.*, 2013; Drougat *et al.*, 2015). Les mutations *ARMC5* sont actuellement considérées comme la première prédisposition génétique d'HMBS. Ces mutations sont associées à un syndrome de Cushing plus sévère que chez les patients avec HMBS non-mutées pour *ARMC5*. Le gène *ARMC5* a été très conservé au cours de l'évolution des espèces, évoquant un rôle essentiel dans le fonctionnement des cellules (Berthon *et al.*, 2017). Il semble être un gène suppresseur de tumeur au regard des résultats observés après inhibition de l'expression de la protéine dans la lignée de cellules corticosurrénaliennes humaines H295R et de la survenue d'un second évènement génétique somatique inactivant l'allèle sain dans les nodules d'hyperplasie (Assié *et al.*, 2013). Dans ce même article, il a d'ailleurs été montré l'existence d'une fratrie présentant un syndrome de Cushing sévère sans mutation *ARMC5* et d'une autre fratrie avec mutation *ARMC5*, des hyperplasies macronodulaires mais pas de syndrome de Cushing. Ces résultats montrent que la mutation inactivatrice d'*ARMC5* semble avant tout favoriser la prolifération des cellules. En effet, l'extinction d'*ARMC5* dans les H295R augmente la capacité de prolifération des cellules sans affecter leur viabilité (Cavalcante, Nishi, *et al.*, 2018). De plus, l'absence d'ARMC5 est associée à l'apparition de méningiomes chez des patients présentant une HMBS, suggérant l'impact de l'inactivation d'*ARMC5* dans la genèse de ces tumeurs (Elbelt *et al.*, 2015). Alors que le rôle des mutations *ARMC5* dans le développement de l'hyperplasie macronodulaire paraît très vraisemblable, leur implication dans la genèse de l'hypercortisolisme semble moins évidente. En effet, l'extinction d'*ARMC5* dans les cellules H295R induit étonnamment une diminution de l'expression de SF1, de certaines enzymes de la stéroïdogenèse et *in fine* une diminution de la synthèse de cortisol, ce qui est en accord avec la faible efficacité de la stéroïdogenèse chez les patients (Assié *et al.*, 2013). Les protéines ARMC5 sont principalement localisées dans le cytoplasme. Elles seraient impliquées dans la dégradation protéique, le stress oxydatif et la régulation de la voie AMPc/PKA. Il a en effet été montré qu'ARMC5 était capable d'interagir avec la sous-unité Cα de la PKA et que l'expression de cette sous-unité catalytique était diminuée dans les nodules de surrénales de patients avec HMBS mutés pour le gène *ARMC5* (Berthon *et al.*, 2017). Une étude a par ailleurs révélé que la voie AMPc/PKA est par conséquent moins activée lorsqu'*ARMC5* est invalidé dans les cellules H295R ou dans la lignée cellulaire HeLa (issue du cancer du col de l'utérus),

entrainant une diminution globale de la phosphorylation (Espiard *et al.*, 2015). La nature de cette interaction reste à déterminer cependant. Dans le modèle murin hétérozygote pour *Armc5* (Armc5+/-), les animaux présentent d'abord, vers douze mois de vie, une baisse transitoire de la corticostéronémie associée à une diminution de l'expression de la sous-unité catalytique Cα de la PKA puis apparaît une hypercorticostéronémie au cours du vieillissement (Berthon *et al.*, 2017). Ces données sont en accord avec les résultats recueillis grâce à l'utilisation du modèle cellulaire invalidé pour *ARMC5*. Elles sont également cohérentes avec l'apparition tardive de l'hypercortisolisme vers 50-60 ans observée chez les patients avec HMBS mutés *ARMC5*. Globalement, les partenaires d'ARMC5 sont toujours en cours d'identification. Très récemment, il a été montré la Cullin3, intervenant dans les processus d'ubiquitination, était capable d'interagir avec ARMC5 et qu'une mutation faux-sens dans le domaine BTB du gène *ARMC5* ne permet plus cette interaction, suggérant un impact des mutations du gène *ARMC5* sur l'ubiquitination et la dégradation (Cavalcante, Clauser, *et al.*, 2018). L'ensemble de ces résultats suggère par conséquent que la genèse des HMBS pourrait comporter 2 étapes : l'apparition de l'hyperplasie sous l'effet de l'inactivation d'*ARMC5* puis de l'hypersécrétion de cortisol. Le mécanisme causal de l'hypersécrétion de cortisol reste discuté. L'inflation de la masse surrénalienne suffit-elle à elle seule à provoquer un hypercortisolisme malgré une efficacité de la stéroïdogenèse réduite ? Il est difficile de répondre à cette question de manière formelle. Il est malgré tout logique de suggérer que l'expression progressive du gène POMC puis de la production d'ACTH dans les tissus pourrait peu à peu stimuler la production de cortisol de façon auto/paracrine en contrecarrant l'action répressive des mutations *ARMC5* sur les enzymes de la stéroïdogenèse. En accord avec cette interprétation, notre équipe a montré que la cortisolémie des patients atteints d'HMBS était positivement corrélée à l'expression de la POMC et de l'ACTH dans les tissus hyperplasiques (Louiset *et al.*, 2013). Enfin, le lien entre ARMC5 et l'expression intra-surrénalienne de la *POMC* reste à établir (**Figure 20**).

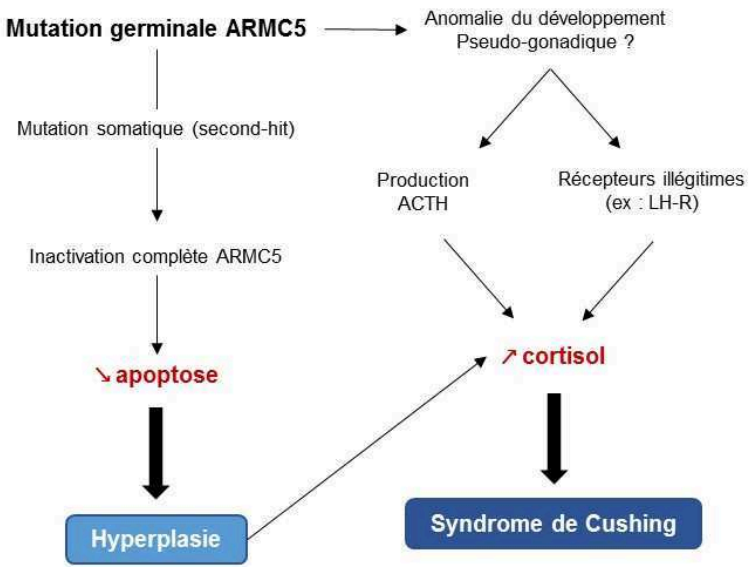


Figure 20 : Schéma illustrant l'implication supposée d'ARMC5 dans le syndrome de Cushing. **ACTH** : adrénocorticotrophine **; ARMC5** : *armadillo repeat containg* 5 ; **LH-R** : *luteinizing hormone receptor.*

A ce jour, un certain nombre de questions nous permet d'entrevoir la suite des recherches. Les données obtenues *in vitro* suggèrent que la synthèse d'ACTH intra-surrénalienne est responsable de l'hypercortisolisme. L'industrie pharmaceutique développe actuellement des antagonistes du MC2-R qu'il serait intéressant d'utiliser chez les patients pour connaître leur pertinence dans le traitement du syndrome de Cushing associé à l'HMBS.

La seconde partie de l'introduction consiste en la présentation de la sérotonine et la mise en évidence de son rôle dans la sécrétion des hormones corticosurrénaliennes en pathologie.

II. La sérotonine

A. Mise en évidence de la sérotonine

La sérotonine a été mise en évidence pour la première fois en 1912 par J.M. O'Connor qui rapporte les effets vasoconstricteurs d'une substance isolée du sérum et suspectée d'être contenue dans les plaquettes. A son tour en 1937, le scientifique italien Vittorio Erspamer remarque l'effet contractile sur les muscles lisses d'une substance extraite à partir de cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal sur les muscles lisses. Il désigne alors cette substance « entéramine » (Erspamer and Asero, 1952). A partir du sérum de bœuf, Maurice M. Rapport et Arda A. Green et Irvine H. Page isolent et caractérisent la substance qu'ils nommeront ensuite « sérotonine » (séro- = sérum, -tonine = tonus vasculaire) en 1948 (Rapport

et al., 1948). L'année suivante, M. Rapport détermine que la sérotonine possède une structure en 5-hydroxytryptamine. George H. Reid et Michael J. Rand réalisent peu de temps après que la sérotonine et l'entéramine se trouvent être la même molécule (Reid and Rand, 1952) tandis que J.H. Humphrey et R. Jaques localisent la sérotonine au niveau plaquettaire deux ans plus tard (Humphrey and Jaques, 1954). En parallèle, des équipes montrent la présence de récepteurs sérotoninergiques dans le cerveau de vertébrés (Twarog and Page, 1953; Amin *et al.*, 1954). Ces données, associées au fait que la sérotonine a été décelée dans beaucoup de tissus et notamment dans le cerveau, le poumon, le rein et le tractus gastro-intestinal, amènent les chercheurs à penser que la sérotonine serait probablement un neurotransmetteur (Brodie and Shore, 1957). Cette hypothèse est confirmée peu de temps après avec la découverte de la sérotonine dans les terminaisons nerveuses et les neurones de petits mammifères (Deiraldi *et al.*, 1963; Michaelson and Whittaker, 1963). La notion de système sérotoninergique naît en 1964 après la mise en évidence de groupes de neurones producteurs de sérotonine dans le cerveau de rat (Dahlstroem and Fuxe, 1964).

B. Biosynthèse

La sérotonine (=5-hydroxytryptamine ; 5-HT ; 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol) appartient à la famille des indolamines. Elle est synthétisée à partir du L-tryptophane, acide aminé essentiel apporté par l'alimentation. Absorbé par l'intestin, cet acide aminé pénètre dans la circulation systémique et peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Le tryptophane circulant est capté de façon active par le cerveau et les organes périphériques ; il pénètre dans les neurones sérotoninergiques ou les tissus périphériques *via* un transporteur membranaire non sélectif. La réaction de synthèse de la 5-HT se déroule en deux étapes successives (**Figure 21**) ; la tryptophane hydroxylase, enzyme limitante de la synthèse de sérotonine, transforme le tryptophane en 5-hydroxytryptophane (El-Merahbi *et al.*, 2015). Celui-ci est ensuite converti en 5-HT par le biais de la décarboxylase des acides aminés aromatiques. Il existe deux isoformes de la tryptophane hydroxylase ; le type 1 (TPH1) et le type 2 (TPH2) respectivement codées par les gènes *TPH1* (chromosome 11) et *TPH2* (chromosome 12) chez l'Homme. Ces deux enzymes ont une distribution différente : la TPH2 est plutôt présente dans le système nerveux central (SNC) tandis que TPH1 est localisée à la fois aux niveaux central et périphérique (Walther and Bader, 2003).

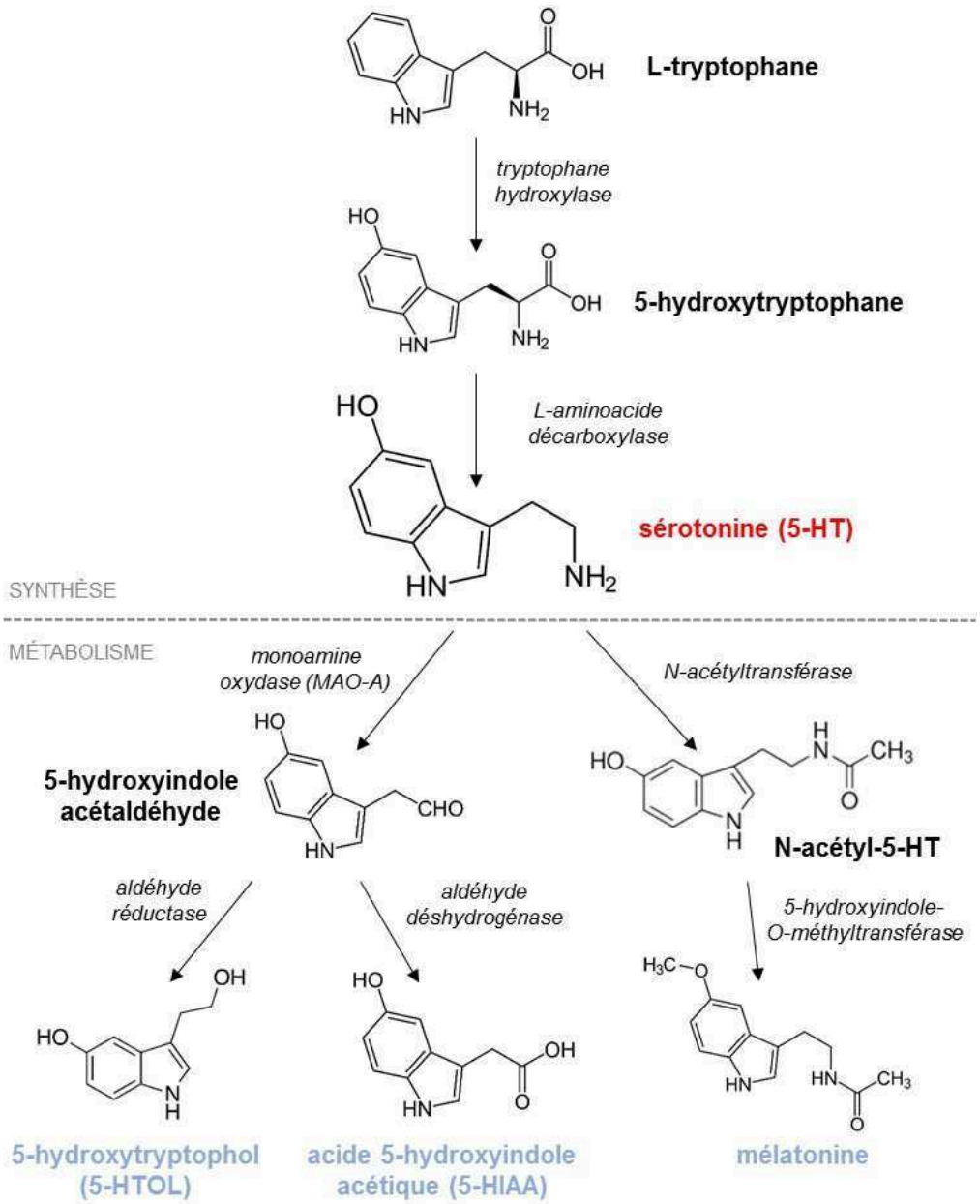


Figure 21 : Biosynthèse et dégradation de la sérotonine. La sérotonine (**5-HT**) est synthétisée à partir du L-tryptophane grâce à la tryptophane hydroxylase. Elle peut être dégradée par l'intervention d'une monoamine oxydase de type A (**MAO-A**) ou transformée en mélatonine. **5-HIAA** : acide 5-hydroxyindole acétique ; **5-HTOL** : 5-hydroxytryptophol**.**

C. Stockage, libération et transport

Environ 95% de la 5-HT corporelle totale est localisée en périphérie chez l'Homme, dont la majeure partie au niveau des cellules entérochromaffines de l'intestin (El-Merahbi *et al.*, 2015). Ces dernières synthétisent et stockent la sérotonine avec d'autres médiateurs peptidiques comme les cholécystokinines ou le peptide PPY dans des vésicules localisées près de la membrane basale. La sécrétion se fait par exocytose, directement dans la lumière du tube

digestif. Cette libération est augmentée en cas de stimulation du nerf vague. Les mastocytes sont eux aussi capables de synthétiser la 5-HT qu'ils stockent dans des granules de sécrétion.

La sérotonine sécrétée dans la circulation sanguine est captée par les plaquettes sanguines. Les plaquettes absorbent la 5-HT grâce à un transporteur membranaire à partir du plasma sanguin et la stockent dans des granules de sécrétion denses (Ni and Watts, 2006). Ce système de stockage protège les muscles lisses vasculaires des puissants effets vasoactifs de la 5-HT. De ce fait, la quantité de 5-HT libre dans le plasma est de l'ordre de la nanomole par litre de sang, soit une quantité très faible au regard de la concentration à l'intérieur des plaquettes (micromole/litre) (Da Prada and Picotti, 1979). Malgré tout, la 5-HT peut être libérée dans le sang en cas d'agrégation plaquettaire. La 5-HT synthétisée en périphérie est incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique. La 5-HT intracérébrale est donc produite localement à partir du tryptophane. Une fois synthétisée, la 5-HT est stockée dans des vésicules de sécrétion dans les neurones. Suite à une dépolarisation membranaire, la 5-HT est directement libérée par exocytose dans la fente synaptique par les terminaisons synaptiques.

D. Recapture et catabolisme de la 5-HT

La recapture de la 5-HT est un mécanisme qui permet de limiter l'interaction de l'amine avec ses tissus cibles. Elle est assurée par le transporteur de la 5-HT (*serotonin transporter* ; SERT), un transporteur sodium-dépendant à 12 domaines transmembranaires (Mohammad Zadeh, 2008). En périphérie, le SERT présent à la surface des plaquettes leur permet d'absorber la 5-HT circulante. Il est aussi exprimé dans différents types cellulaires, comme les cellules musculaires lisses ou les fibroblastes, appartenant à des organes aux fonctions très différentes tels que les poumons, le cœur, les surrénales et l'intestin. Au niveau nerveux, le SERT est localisé au niveau de la membrane cytoplasmique des terminaisons sérotoninergiques. Après recapture, la sérotonine est recyclée ou détruite. Sa dégradation est réalisée par désamination oxydative de la chaîne aminée latérale par une monoamine oxydase (MAO) (**Figure 22**). La MAO est localisée dans la membrane externe des mitochondries. Deux isoformes sont connus pour cette enzyme ; la MAO de type A (MAO-A) et la MAO de type B, codées par deux gènes distincts tous deux localisés sur le chromosome X chez l'Homme (Weyler *et al.*, 1990). Les deux types diffèrent par leur distribution et leur activité. La 5-HT est d'ailleurs préférentiellement dégradée par la MAO-A et son principal métabolite, le 5-hydroxy-indol-acétaldéyde (5-HIA), est transformé dans un second temps en acide 5-hydroxy-indol-acétique (5-HIAA) par une aldéhyde déshydrogénase ou en 5-hydroxytryptophol par une aldéhyde réductase. Le 5-HIAA est éliminé dans les urines où sa quantité ne doit pas excéder 10 mg/24h

en conditions physiologiques normales. La 5-HT peut aussi être glucuronoconjuguée ou sulfoconjuguée dans le foie pour être ensuite éliminée dans les urines. Enfin, la 5-HT peut être métabolisée en mélatonine dans la glande pinéale (**Figure 21**).

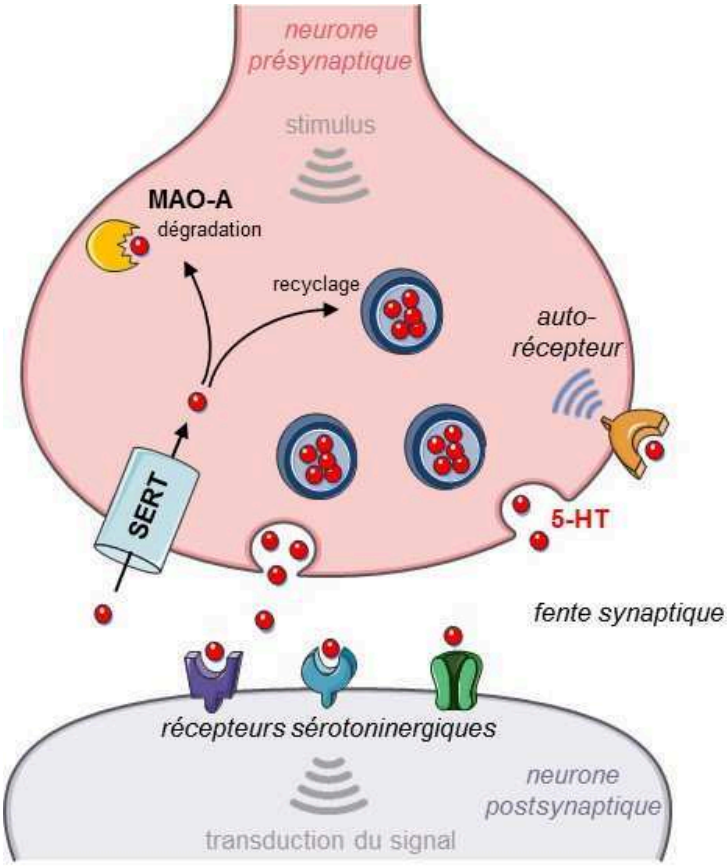


Figure 22 : Schéma illustrant le fonctionnement d'une synapse sérotoninergique. La 5-HT libérée se lie à ses récepteurs situés sur la membrane du neurone postsynaptique et à ses autorécepteurs localisés sur la membrane du neurone présynaptique. Elle peut aussi être captée par le SERT pour être ensuite dégradée par la MAO-A ou recyclée dans des vésicules de sécrétion. **5-HT** : sérotonine, **MAO-A** : monoamine oxydase de type A, **SERT** : (en anglais : *serotonin transporter*) transporteur de la 5-HT.

E. Récepteurs sérotoninergiques

Une des caractéristiques de la signalisation sérotoninergique est son incroyable complexité. Chez les mammifères, il n'existe pas moins de 14 sous-types de récepteurs sérotoninergiques répartis en 7 classes (5-HT_1 à 5-HT_7) (Kroeze *et al.*, 2002) (**Figure 23**). En dehors du récepteur sérotoninergique de type 3 (5-HT_3) qui est un récepteur canal, les autres récepteurs appartiennent à la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G. D'un point de vue phylogénique, ces récepteurs sont issus d'un unique récepteur ancestral qui a évolué pour donner les différents sous-types connus aujourd'hui. Très

conservés au cours de l'évolution, ces récepteurs sont aussi bien retrouvés chez les invertébrés que chez les grands mammifères (Peroutka and Howell, 1994).

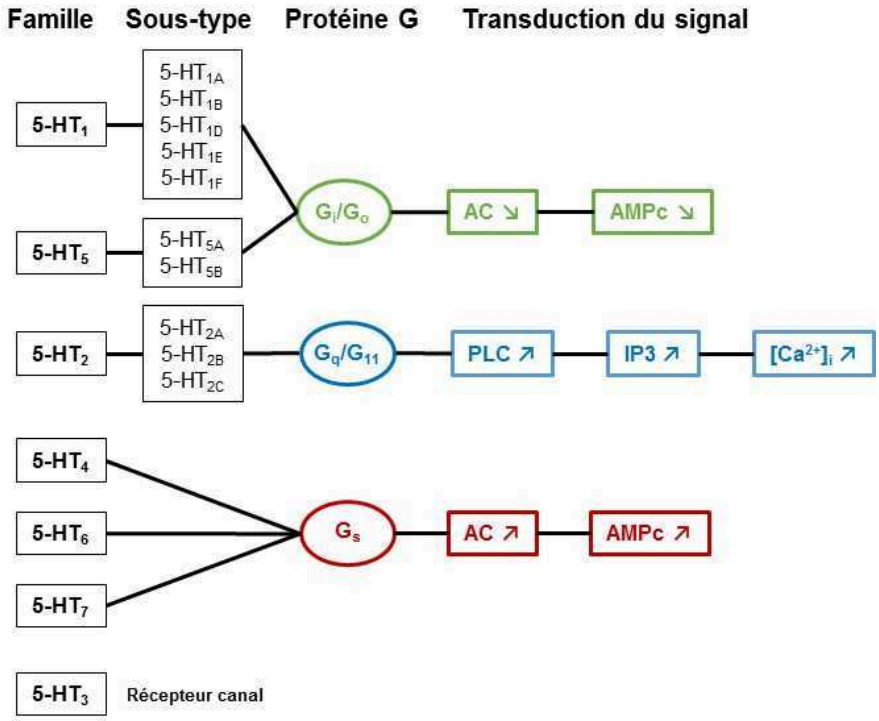


Figure 23 : Les récepteurs de la sérotonine. Il existe 14 récepteurs de la sérotonine, répartis en 7 familles (5-HT1 à 5-HT7). **AC** : adénylate cyclase ; **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique ; **IP3** : inositol triphosphate ; **PLC** : phospholipase C. Adapté d'après (Noda *et al.*, 2004).

1. Identification et classification des récepteurs de la sérotonine

L'identification des récepteurs de la 5-HT s'est faite de manière progressive par l'utilisation de différentes méthodes d'étude. Ces récepteurs ont été décrits dès la fin des années 1980. L'identification des récepteurs 5-$HT_{1A, 1B, 1D}$, 5-HT_2, 5-HT_3 et 5-HT_4 a été possible grâce à une première approche dite pharmacologique avec l'utilisation de ligands, d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs (Bradley *et al.*, 1986). Dans un second temps, l'approche fonctionnelle a permis d'identifier et de caractériser les récepteurs en fonction de leur voie de transduction. Cette approche a conduit à la mise en évidence des récepteurs 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2B} et à certaines modifications dans la classification existante, telles que le changement d'appelation du 5-HT_{1C} en 5-HT_{2C} (Hoyer, 1988; Humphrey *et al.*, 1993). Enfin, l'approche moléculaire basée sur l'homologie de séquences nucléotidiques codant les récepteurs a notamment permis d'identifier les récepteurs 5-$HT_{5A, 5B}$, 5-HT_6 et 5-HT_7 (Hoyer and Martin, 1997; Hoyer, 2017). La nomenclature actuelle prend en compte la structure des récepteurs et leurs voies de signalisation. Les 14 récepteurs sont répartis en 4 classes :

- Les récepteurs couplés à une protéine Gi/o, dont l'activation est associée à une inhibition de l'adénylate cyclase et une diminution de l'AMPc intracellulaire : 5-HT_1, 5-HT_{5A}. Le mode de couplage de 5-HT_{5B} est encore incertain chez la souris (Hannon and Hoyer, 2008). Chez l'Homme, le gène codant 5-HT_{5B} est un pseudogène.
- Les récepteurs couplés à une protéine Gq/G_{11}, entraînant une activation de la phospholipase C et une augmentation de l'IP3 (inositol triphosphate) intracellulaire : 5-$HT_{2A, 2B, 2C}$
- Les récepteurs couplés à une protéine Gs dont l'activation provoque l'augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire : 5-HT_4 (Dumuis *et al.*, 1988; Contesse *et al.*, 1996), 5-HT_6 et 5-HT_7. Cela s'accompagne d'un influx de Ca^{2+} dans le cas du récepteur 5-HT_4. Notons que le 5-HT_4 peut dans certains cas être couplé à la tyrosine kinase Src, activant également ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*) ou la phospholipase Cγ (Bockaert *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été décrit que le récepteur 5-HT_6 à la capacité de recruter mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Meffre *et al.*, 2012). L'utilisation d'un modèle cellulaire corticosurrénalien humain (H295R) et murin (ATC7) a également permis d'établir le lien entre mTOR et la voie AMPc/PKA (de Joussineau *et al.*, 2014).
- Le récepteur formant un canal ionique : 5-HT_3. Il s'agit d'un récepteur ionotrope formé de plusieurs sous-unités dont l'activation entraîne une entrée de calcium et de sodium dans la cellule.

Il peut également exister des variants pour un même sous-type de récepteur. Par exemple, pas moins de cinq variants, résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm, ont été décrits pour le 5-HT_4 chez l'Homme. Ces derniers diffèrent par la longueur et la structure de leur extrémité C-terminale. Enfin, il a été montré que les récepteurs de la 5-HT sont capables de former des homo- (5-$HT_{1B, 1D}$, 5-HT_{2C}, 5-HT_4) ou des hétérodimères (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_3).

2. Distribution et fonction des récepteurs sérotoninergiques

En raison de leur distribution dans l'organisme et de leurs caractéristiques mentionnées ci-dessus, les récepteurs sérotoninergiques sont considérés comme l'une des familles de récepteurs de neurotransmetteurs les plus complexes. Ils possèdent également des fonctions particulières et une affinité variable pour la 5-HT (Hannon and Hoyer, 2008). Les récepteurs sérotoninergiques sont tous représentés au sein des systèmes nerveux central et périphérique. Leur distribution a été largement décrite dans le cerveau des mammifères (Mengod *et al.*, 1996).

Un même sous-type de récepteur peut tout à fait être présent dans plusieurs zones cérébrales différentes. Cette notion permet notamment de comprendre pourquoi une drogue spécifique d'un sous-type de récepteur peut avoir de multiples effets sur le comportement. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux récepteurs sérotoninergiques de type 4, 6 et 7.

Au niveau du SNC, le récepteur 5-HT_4 est localisé au niveau des structures limbiques, du tubercule olfactif, du striatum, de l'hypothalamus, de l'hippocampe, du septum et de la substance noire (Eglen *et al.*, 1995; Medhurst *et al.*, 2001). Il est impliqué dans la régulation du tonus musculaire, dans l'anxiété, les capacités mnésiques et les fonctions cognitives. En périphérie, le 5-HT_4 est retrouvé à la surface des cardiomyocytes des oreillettes droite et gauche, conférant à la 5-HT des propriétés inotrope et chronotrope (Kaumann *et al.*, 1990). Situé également au niveau de certains viscères, dont l'intestin et la surrénale, il contrôle la motricité digestive, la contraction des muscles lisses (utérus, vessie, intestin, bronches) et l'excrétion des électrolytes.

Les récepteurs de type 5-HT_6 sont retrouvés exclusivement dans le SNC (Marazziti *et al.*, 2013). La stimulation de ces récepteurs exerce une influence sur les fonctions cognitives, l'humeur et l'appétit.

Enfin, le récepteur 5-HT_7 est principalement localisé dans le thalamus, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex dans le SNC, et au niveau des muscles lisses en périphérie (Hedlund and Sutcliffe, 2004). Jouant un rôle dans le contrôle des rythmes circadiens, le sommeil et la thermorégulation au niveau central, le 5-HT_7 peut aussi être impliqué dans les désordres psychiatriques tels que l'anxiété et la dépression (Laenen *et al.*, 2007). En périphérie, il est responsable de la relaxation des muscles lisses en état de contraction.

F. Principales fonctions de la sérotonine

Les récepteurs de la 5-HT sont largement distribués au niveau central et périphérique. Ceci explique les nombreux rôles de la 5-HT, pas seulement en tant que neurotransmetteur, son rôle le plus connu, mais également comme facteur autocrine/paracrine en périphérie.

1. La sérotonine comme neurotransmetteur

Dans le système nerveux, moins d'un neurone sur un million produit de la 5-HT. Seuls 5% de la 5-HT corporelle totale sont localisés au niveau central. Selon la région cérébrale et le récepteur sollicité, la 5-HT peut moduler des processus comportementaux et

neuropsychologiques tels que l'humeur, l'appétit, la douleur, l'agressivité, la peur, la mémoire, le sommeil, la nociception ou encore la sexualité (Berger *et al.*, 2009). En clinique, son rôle le plus important est son implication dans la genèse de certaines pathologies psychiatriques comme l'anxiété, la dépression ou encore la schizophrénie (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008; Manchia *et al.*, 2017). Cette caractéristique explique le ciblage des récepteurs sérotoninergiques et de la synthèse de la 5-HT dans le traitement de ces pathologies.

2. Rôle périphérique de la sérotonine

Le rôle de la 5-HT périphérique est à ce jour mal connu et peu étudié. Les multiples sites de production de la molécule, ainsi que l'existence de nombreux récepteurs sérotoninergiques complexifient la compréhension des rôles de la 5-HT en périphérie. Pourtant, la 5-HT régule de nombreux processus physiologiques périphériques dont les principaux sont évoqués ci-après.

Effets sur le système digestif

La majeure partie de la 5-HT produite en périphérie est confinée au sein des cellules entérochromaffines de l'intestin (Berger *et al.*, 2009). Seule une faible proportion de la 5-HT synthétisée dans l'intestin pénètre dans la circulation systémique. La 5-HT agit localement en favorisant le péristaltisme intestinal lors de l'arrivée du bol alimentaire dans la lumière du tube digestif (Mawe and Hoffman, 2013). Dans ce cas, les effets de la 5-HT sont relayés par les récepteurs 5-HT_{1D}, 5-HT_3 et 5-HT_4. Chez les patients souffrant du syndrome de l'intestin irritable, la libération excessive de 5-HT dans la lumière du tube digestif participe à la physiopathologie de la maladie, caractérisée par des douleurs abdominales associées à une alternance de diarrhées et constipation (Crowell, 2004). Les patients peuvent alors être traités par des antagonistes du récepteur 5-HT_3 pour diminuer les nausées et par des agonistes 5-HT_4 pour lutter contre la constipation. Ces symptômes peuvent également être observés chez les patients après une chimiothérapie cytotoxique qui provoque une libération massive de 5-HT. De ce fait, les antagonistes 5-HT3 sont fréquemment associés aux chimiothérapies anti-cancéreuses pour limiter les effets digestifs adverses de ces dernières (Minami *et al.*, 2003).

Effets sur le métabolisme glucidique et lipidique

A la fin des années 60, il a été montré que la 5-HT possédait des effets métaboliques puisque l'injection de 5-HT chez les sujets sains provoquait une augmentation des acides gras libres et du glycérol dans le sang, suggérant une induction de la lipolyse (Carlson *et al.*, 1967).

Il semblerait que la 5-HT diminue la capture du glucose et également la production d'adiponectine (Uchida-Kitajima *et al.*, 2008). Par ailleurs, les chercheurs ont mis en évidence que l'inhibition de la synthèse de la 5-HT périphérique chez la souris réduisait l'obésité et les dysfonctions métaboliques, suggérant un rôle de la 5-HT dans la résistance à l'insuline (Crane *et al.*, 2015). Il a par ailleurs été montré chez la souris que la 5-HT était importante pour le développement des cellules β pancréatiques et l'augmentation de la production d'insuline au cours de la gestation (Kim *et al.*, 2010). D'après ces données, la prolactine et l'hormone lactogène placentaire sont à l'origine de l'expression pancréatique de TPH1 et par extension de la synthèse de sérotonine. La 5-HT sécrétée exerce ensuite un rôle auto- et paracrine stimulant la prolifération des cellules β pancréatiques. Ces effets de la 5-HT seraient relayés par les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}. La 5-HT intervient également dans le développement de la glande mammaire et l'excrétion de lait lors de l'allaitement (Matsuda *et al.*, 2004; Stull *et al.*, 2007). Enfin, sur le versant régénération/développement, l'absence ou le déficit en 5-HT perturberait la régénération hépatique successive à une résection d'après des études effectuées chez la souris déficiente en plaquettes sanguines ou en TPH1 périphérique (souris $TPH1^{-/-}$) (Lesurtel *et al.*, 2006).

Effets cardiovasculaires

La 5-HT a de nombreux effets cardiovasculaires, comprenant notamment la modulation de la résistance vasculaire, la régulation de la pression artérielle et du rythme cardiaque, et la coagulation (Berger *et al.*, 2009). Elle induit en effet une variation du diamètre des artères et joue également un rôle dans la perméabilité capillaire. D'autre part, en cas d'activation des plaquettes, la libération de 5-HT dans le sang augmente l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction des vaisseaux voisins *via* les récepteurs 5-HT_2 (Cerrito *et al.*, 1993). Par la suite, la vasodilatation serait assurée par les récepteurs 5-HT_1 (Vanhoutte, 1987). La fibrillation atriale observée chez des patients avec des taux circulants élevés de 5-HT montre que cette molécule exerce également des effets directs au niveau cardiaque (Langer *et al.*, 2007). Les effets chronotrope et ionotrope positifs de la sérotonine au niveau cardiaque semble être médiés par le récepteur 5-HT_4 (Singh, 2004). La stimulation du récepteur 5-HT_{2B} jouerait également un rôle dans le développement cardiaque *in utero* et l'apparition de valvulopathies chez l'Homme (Rothman *et al.*, 2000; Roth, 2007).

Effets surrénaliens

Chez les mammifères, la 5-HT intervient à plusieurs niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysaire dans le cadre de la réponse au stress (Contesse *et al.*, 2000; Carrasco and Van de Kar, 2003). Au niveau du SNC, la 5-HT est capable de déclencher la sécrétion de CRH par les neurones hypothalamiques et de stimuler la sécrétion d'ACTH par les cellules hypophysaires (Jørgensen *et al.*, 2002). Les effets de la 5-HT sur la sécrétion des stéroïdes par le cortex surrénalien ont initialement été mis en évidence chez le lapin, le rat et le bœuf notamment (Rosenkrantz, 1959). L'influence de la sérotonine sur la sécrétion d'aldostérone est précisément décrite *in vitro* pour la première fois chez le rat (Müller and Ziegler, 1968; Bing and Schulster, 1977; Al-Dujaili *et al.*, 1982). Ses effets sur la sécrétion d'aldostérone chez l'Homme seront découverts peu après *via* l'injection de 5-HT chez des volontaires sains (Mantero *et al.*, 1982). Dans le cortex surrénalien humain, la 5-HT est produite et stockée par les mastocytes périvasculaires, situés à proximité de la capsule (Lefebvre *et al.*, 1992). Cette synthèse est assurée par la TPH1. Notre équipe a montré que l'ajout du composé 48/80 (agent dégranulant des mastocytes) était responsable d'une libération de 5-HT intrasurrénalienne permettant d'établir l'origine mastocytaire de la 5-HT dans la surrénale (Lefebvre *et al.*, 2001). Les mécanismes régulant la production de 5-HT par les mastocytes restent imprécis. Notre équipe a néanmoins montré que les mastocytes intrasurrénaliens établissent des contacts avec des fibres nerveuses, suggérant qu'ils pourraient être contrôlés par le système nerveux végétatif (Duparc *et al.*, 2015). En outre, chez la souris, le régime désodé active les mastocytes vraisemblablement par le biais de l'élévation de l'AngII circulante (Boyer *et al.*, 2017) comme le laissent penser les données obtenues chez le rat montrant l'expression du récepteur AT-2 au niveau mastocytaire (Carvalho *et al.*, 2006) (**Figure 24**).

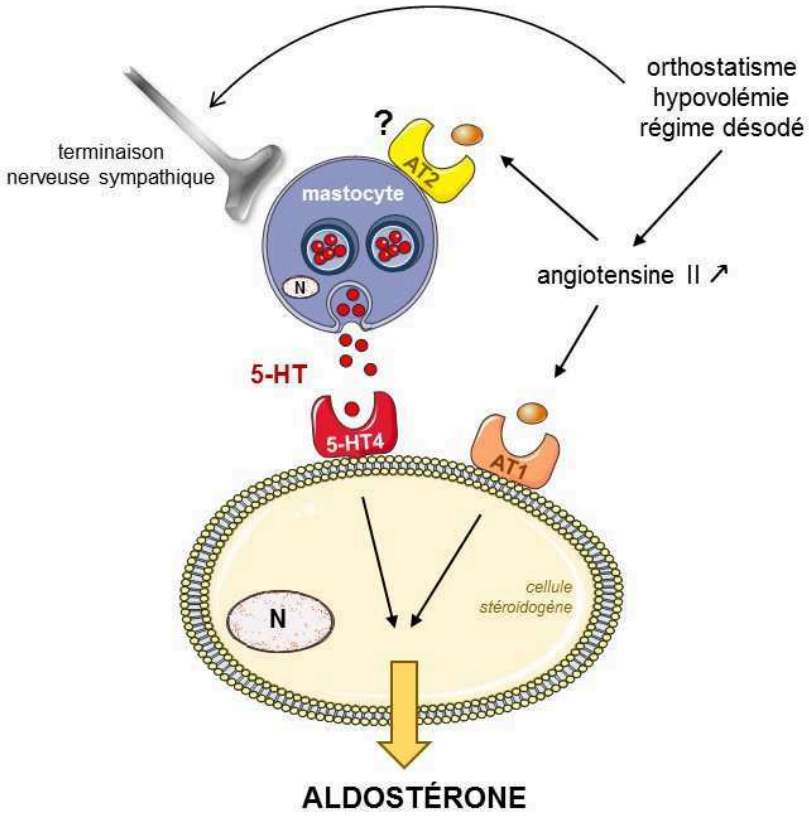


Figure 24 : Mécanismes potentiels de la régulation de la dégranulation des mastocytes surrénaliens et contrôle de la sécrétion d'aldostérone. En dehors de la régulation nerveuse, il est probable que la dégranulation des mastocytes soit directement régulée par l'angiotensine II *via* son récepteur de type 2 (**AT2**) comme cela a pu être montré chez les rongeurs. **5-HT4** : récepteur sérotoninergique de type 4 ; **AT1** : récepteur de l'angiotensine II de type 1 ; **N** : noyau.

L'ensemble de ces données suggéraient l'existence d'un contrôle paracrine de l'activité sécrétoire du cortex surrénalien par la 5-HT d'origine mastocytaire. La stimulation des cellules corticosurrénaliennes humaines en culture primaire avec la 5-HT ou des agonistes du récepteur 5-HT_4 augmente la production d'aldostérone et dans une moindre mesure la production de cortisol (Contesse *et al.*, 2000; Lefebvre *et al.*, 2001). Il a en effet été montré que les effets de la 5-HT au sein de la glande surrénale étaient relayés par le récepteur 5-HT_4 chez l'Homme (Lefebvre *et al.*, 1992). Les études cliniques menées chez des volontaires sains préalablement traités à la dexaméthasone pour bloquer la sécrétion d'ACTH ont révélé que le zacopride et le cisapride, agonistes du récepteur 5-HT_4, augmentaient la sécrétion d'aldostérone de manière significative sans modifier la cortisolémie (Lefebvre *et al.*, 1993, 1995). Les effets stimulants du cisapride et de l'AngII apparaissent additifs. Il est intéressant de noter que l'administration prolongée de ces agonistes chez les volontaires sains entraîne une désensibilisation des récepteurs qui se traduit par une atténuation rapide de la réponse de l'aldostérone (Lefebvre,

Gonzalez, *et al.*, 1998). Chez le rat, l'effet sécrétoire de la 5-HT est relayé par le récepteur 5-HT_7 exprimé par les cellules corticosurrénaliennes (Contesse *et al.*, 2000; Lenglet *et al.*, 2002). L'absence d'effet de la 5-HT ou des agonistes 5-HT_4 sur la production de glucocorticoïdes chez l'Homme peut d'une part s'expliquer par la faible quantité d'ARNm codant les récepteurs 5-HT_4 au niveau des cellules de la ZF, en comparaison à celles de la ZG, comme le montrent les hybridations *in situ* et les études histologiques réalisées sur le cortex humain normal (Cartier *et al.*, 2005; Bram *et al.*, 2016; Louiset *et al.*, 2017). Il est également fort probable que la distance qui sépare les cellules fasciculées des mastocytes sous-capsulaires ne permette pas un contrôle sérotoninergique de la production de glucocorticoïdes chez l'Homme. En conclusion, dans la surrénale humaine normale, la 5-HT paraît exercer un contrôle paracrine de la sécrétion d'aldostérone par les cellules de la ZG, susceptible de venir s'ajouter à l'effet stimulant de l'AngII notamment en situation de réduction des apports sodés.

G. Sérotonine et thérapeutique

L'excès comme le défaut de 5-HT peuvent être délétères pour l'organisme. Aussi existe-t-il des molécules ciblant la synthèse de 5-HT ou ses récepteurs qui visent à rétablir un tonus sérotoninergique normal.

1. Traitement de la migraine

La migraine peut être traitée par des ligands des récepteurs sérotoninergiques appelés triptans. Ces antimigraineux sont des agonistes des récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} également utilisés dans le traitement des crises d'algies vasculaires de la face. Les triptans ne passent pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) ; ils ont une action intracrânienne mais pas intracérébrale (Sleight and Peroutka, 1991). Ces médicaments induisant une vasoconstriction, ils sont contre-indiqués en cas de maladies coronariennes et d'infarctus du myocarde.

2. Traitement des nausées

Dans le cadre du traitement des nausées et vomissements, il est classiquement prescrit des ligands de récepteurs sérotoninergiques de la famille des sétrons. Ils appartiennent à la catégorie des antiémétiques et présentent des propiétés antagonistes des récepteurs 5-HT_3. Les sétrons sont particulièrement utilisés dans la prévention des vomissements consécutifs à un traitement anti-cancéreux tel que la radiothérapie ou la chimiothérapie. Ils ne sont pas capables de passer la BHE et ciblent précisément les fibres vagales du complexe gastro-intestinal (Hamon and Gozlan, 1993).

3. Traitement des désordres comportementaux

Des modifications dans la densité des récepteurs à la 5-HT ont été observées dans certaines pathologies caractérisées par des troubles du comportement ou neurodégénératifs. C'est notamment le cas des patients atteints de la maladie d'Alzheimer chez lesquels il a été montré un effet protecteur des agonistes 5-HT_4 pour contrebalancer une disparition du 5-HT_4 dans l'hippocampe de ces patients. Dans ce cas précis, les agonistes 5-HT_4 réduiraient la production de la protéine β-amyloïde, principal composant des agrégats appelés plaques amyloïdes, anormalement présents chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Lezoualc'h, 2007). De façon similaire, il a pu être observé une diminution de la densité en récepteurs 5-HT_4 dans le putamen des patients souffrant de la chorée de Huntington (Wong *et al.*, 1996).

Les états anxieux et dépressifs appartiennent également à la catégorie des désordres comportementaux. La synthèse de la 5-HT et les récepteurs sérotoninergiques sont très couramment ciblés dans le traitement de ces pathologies.

Les agonistes partiels des récepteurs 5-HT_{1A} tels que la buspirone font partie de la famille des anxiolytiques. L'utilisation de ces ligands présente plusieurs avantages ; ils n'induisent ni accoutumance ni dépendance. De plus, ils ne sont pas sédatifs, myorelaxants ou anesthésiants à la différence des benzodiazépines. Par contre, leur délai d'action est de plusieurs jours contrairement aux benzodiazépines dont les effets sont immédiats. Les antagonistes 5-HT_2 sont aussi classés comme antipsychotiques.

L'action des antidépresseurs repose sur une augmentation de concentration extracellulaire en 5-HT, en particulier dans la fente synaptique. Les inhibiteurs de recapture de la sérotonine (IRS) se lient au transporteur SERT et se retrouvent ensuite dans le cytosol de la terminaison présynaptique. En bloquant le SERT et en augmentant la biodisponibilité de la 5-HT dans la synapse, les IRS entraînent une stimulation de tous les récepteurs sérotoninergiques présents dans la synapse. Ce mécanisme concerne également les autorécepteurs avec effet inhibiteur exprimés sur la membrane du neurone présynaptique, tels que 5-HT_{1B} et 5-HT_{1D} (Miquel *et al.*, 1992). Dans un premier temps, le traitement par les IRS est donc inefficace. Leur action n'est observable qu'à partir de 2 semaines, temps nécessaire à la désensibilisation des autorécepteurs. Les IRS n'agissent pas spécifiquement au niveau du système nerveux. A cet égard, il a été montré que l'administration d'IRS chez des patients déprimés normotendus provoquait une augmentation de l'aldostérone plasmatique (Ahmed *et al.*, 2011). Ces résultats

concordent avec les effets stimulants connus de la 5-HT au niveau surrénalien et sur la rénine. Les inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) visent à bloquer la dégradation de la sérotonine, ce qui a la même finalité que les IRS. Ils ont des effets analogues aux IRS mais provoquent en revanche de nombreux effets indésirables du fait de leur spécificité non exclusive pour la MAO-A.

H. Anomalies de la synthèse de 5-HT

1. Toxicité de la sérotonine

La combinaison de traitement antidépresseurs peut conduire à un excès de 5-HT au niveau du SNC. Cette pathologie, appelée syndrome sérotoninergique, est caractérisée par une triade composée de signes cliniques témoin de l'hyperactivation du système nerveux autonome (diarrhées, mydriases, tachycardie), de signes neuromusculaires (hyperréflexie, myoclonie, tremblement, raideur) et de signes traduisant une altération de l'état mental (Isbister *et al.*, 2007). Ce syndrome, d'origine majoritairement iatrogène, peut résulter du surdosage d'un médicament ou de la synergie entre les traitements visant à élever les taux de 5-HT. Plus rarement, le syndrome sérotoninergique peut se développer suite à l'apparition d'une tumeur carcinoïde productrice de 5-HT (Mohammad-Zadeh *et al.*, 2008).

2. L'adénome de Conn

Au fil des études ont été mises en évidence diverses caractéristiques des adénomes de Conn et en particulier des anomalies concernant les mastocytes et la voie sérotoninergique. L'augmentation de la densité des mastocytes dans une tumeur productrice de minéralocorticoïdes a été décrite pour la première fois au milieu des années 80 (Aiba *et al.*, 1985). C'est bien plus tard que la présence de mastocytes surnuméraires a été montrée dans une série de 29 adénomes de Conn (Duparc *et al.*, 2015). L'élévation du nombre de mastocytes dans les adénomes de Conn est vraisemblablement responsable d'une augmentation de la quantité de 5-HT intrasurrénalienne. Par ailleurs, la surexpression du récepteur 5-HT_4 dans cette pathologie a été décrite grâce aux techniques de PCR classique, de PCR quantitative et d'hybridation *in situ* (Lefebvre *et al.*, 2002; Cartier *et al.*, 2005). Les analyses transcriptomiques ont également révélé à la fois une surexpression des récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7 dans les adénomes de Conn (Ye *et al.*, 2007). La surexpression du 5-HT_4 dans les adénomes de Conn permet d'expliquer la réponse importante de la sécrétion d'aldostérone observée chez des patients avec hyperaldostéronisme primaire en réponse à l'administration de cisapride,

métoclopramide ou tégasérod, agonistes du récepteur 5-HT$_4$ (Lefebvre, Contesse, *et al.*, 1998). De plus, la sécrétion d'aldostérone par des fragments de surrénale provenant de patients souffrant d'hyperaldostéronisme primaire, en réponse à une stimulation par la 5-HT ou par le cisapride est inhibée en présence de l'antagoniste 5-HT$_4$ GR113808 (Lefebvre *et al.*, 2002), montrant le rôle du récepteur 5-HT$_4$ dans la physiopathologie des adénomes de Conn (**Figure 25**). Par ailleurs, certaines cellules stéroïdogènes composant les adénomes de Conn sont capables de produire de la 5-HT (Cartier *et al.*, 2005). Ces résultats témoignent de l'importance de la 5-HT, exerçant ses effets *via* une action para- voire autocrine, dans la physiopathologie de l'hyperaldostéronisme.

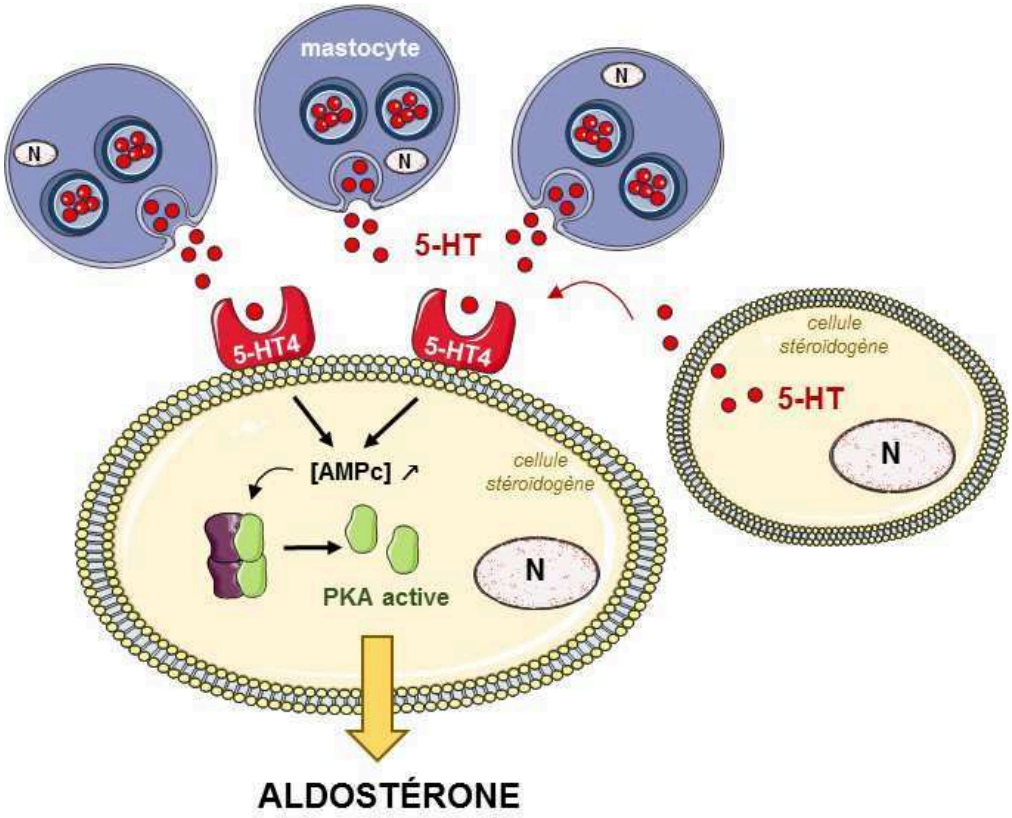


Figure 25 : Physiopathologie de l'adénome de Conn. Dans l'adénome de Conn, les mastocytes présents de façon surnuméraire produisent de la sérotonine (**5-HT**). L'indolamine est également anormalement synthétisée par une sous-population de cellules stéroïdogènes. La 5-HT libérée stimule les récepteurs sérotoninergiques de type 4 (**5-HT4**), surexprimés par les cellules productrices d'aldostérone. L'activation des récepteurs 5-HT4 entraîne l'augmentation de la concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (**AMPc**) qui active la protéine kinase A (**PKA**). Ces mécanismes participent vraisemblablement à l'hypersécrétion d'aldostérone. **N** : noyau.

3. Lésions surrénaliennes à l'origine d'un syndrome de Cushing

Chez certains patients présentant une HMBS associée à un syndrome de Cushing infraclinique ou patent, la sécrétion de cortisol est anormalement stimulée par des agonistes du

récepteur 5-HT_4 tels que le cisapride ou le métoclopramide (Bourdeau *et al.*, 2001; Lacroix *et al.*, 2001). Chez ces patients répondant au cisapride in *vivo*, il a été montré que le récepteur 5-HT_4 était surexprimé dans le tissu surrénalien par rapport à la surrénale normale, suggérant un couplage illicite du récepteur 5-HT_4 à la synthèse de cortisol dans ces lésions (Cartier *et al.*, 2003). De façon intéressante, l'effet stimulant de la 5-HT sur la sécrétion de cortisol par certaines HMBS n'était pas influencé par les antagoniste 5-HT_4, suggérant l'implication d'un ou plusieurs autre(s) type(s) de récepteur(s) sérotoninergique(s). Dans cette situation, il a été montré l'expression anormale du récepteur 5-HT_7 par certaines cellules corticosurrénaliennes des hyperplasies (Louiset *et al.*, 2006). Par ailleurs, la présence de 5-HT a été décelée dans des groupes de cellules stéroïdogènes, aussi bien dans les HMBS que dans des adénomes corticosurrénaliens produisant du cortisol (Bertherat *et al.*, 2005; Contesse *et al.*, 2005). Ces résultats démontrent la synthèse ectopique de 5-HT et l'importance de ce facteur paracrine dans la physiopathologie des lésions responsables d'un syndrome de Cushing.

Pour ce qui concerne les lésions malignes, le cas d'un corticosurrénalome producteur de rénine et responsable d'un syndrome de Cushing sévère a pu être étudié par notre équipe (Louiset *et al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent que certaines cellules malignes produisaient elles-mêmes de la 5-HT capable ensuite de stimuler la production de cortisol via un mécanisme paracrine impliquant un récepteur ectopique de type 5-HT_7.

4. Le PPNAD

Notre équipe a également étudié la voie de signalisation sérotoninergique dans des PPNAD liés majoritairement à des mutations touchant le gène *PRKAR1A*, à l'origine de l'activation de la voie AMPc/PKA (Bram *et al.*, 2016). Cette étude a révélé la surexpression du récepteur 5-HT_4 ainsi que l'expression ectopique des récepteurs 5-HT_6 et 5-HT_7 dans les micronodules produisant du cortisol, parallèlement à une production ectopique de TPH2 dans les cellules stéroïdogènes, témoignant ainsi de la formation d'une boucle sérotoninergique illicite complète. De plus, les immunomarquages indiquaient la présence de 5-HT dans les cellules stéroïdogènes et la 5-HT était détectée dans le milieu d'incubation des cultures cellulaires dérivées de surrénales de patients avec PPNAD, montrant ainsi une sécrétion de 5-HT par les cellules surrénaliennes. Le traitement de ces cellules a par ailleurs révélé une augmentation de la sécrétion de cortisol en présence de 5-HT, bloquée par l'inhibiteur de PKA H89 et par les antagonistes des récepteurs 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7. L'utilisation d'outils moléculaires permettant d'activer la voie AMPc/PKA dans des cellules H295R en culture a confirmé que la stimulation de cette voie de signalisation était à l'origine de l'émergence de

récepteurs sérotoninergiques ectopiques, de la surexpression du récepteur eutopique 5-HT_4 et de l'expression ectopique de TPH2 dans les cellules stéroïdogènes. Dans le PPNAD, il semblerait donc que l'activation de la voie AMPc/PKA soit à l'origine de la mise en place d'une boucle de régulation sérotoninergique locale, agissant de manière auto- et/ou paracrine et participant à la genèse de l'hypercortisolisme (**Figure 26**).

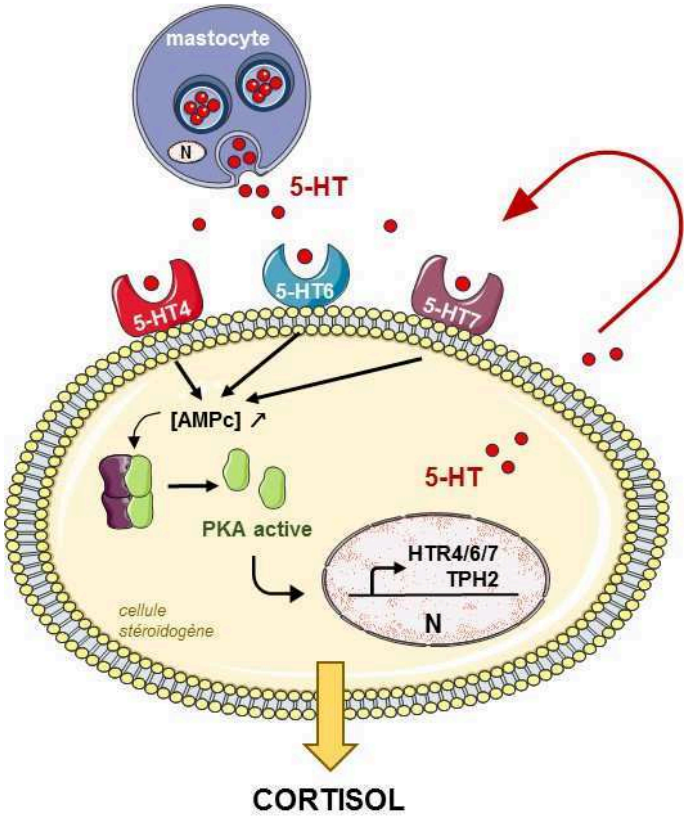


Figure 26 : Physiopathologie de la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (PPNAD). Dans le PPNAD, l'activation constitutive de la voie AMPc/PKA est à l'origine de l'expression illégitime de la tryptophane hydroxylase de type 2 (**TPH2**) et des récepteurs sérotoninergiques de type 4, 6 et 7 (**5-HT4/6/7**) dans les cellules corticosurrénaliennes productrices de cortisol. La sérotonine (**5-HT**) produite par les cellules stéroïdogènes stimule de manière auto- et paracrine les récepteurs sérotoninergiques couplés à la voie AMPc/PKA, donnant naissance à une boucle sérotoninergique intrasurrénalienne. **AMPc** : adénosine monophosphate cyclique, **N** : noyau ; **PKA** : protéine kinase A.

L'ensemble des données présentées dans cette seconde partie indique l'existence d'un contrôle sérotoninergique intra-surrénalien de la sécrétion de cortisol dont les effets apparaissent minimes en physiologie mais qui sont considérablement renforcés dans certaines pathologies (Lefebvre, Duparc, *et al.*, 2015). Dans le cas du PPNAD, cette boucle autonome est déclenchée par un évènement génétique conduisant à une activation constitutive de la voie AMPc/PKA. Ces résultats suggèrent qu'une stimulation prolongée du tissu surrénalien par l'ACTH, dont l'action est relayée par l'AMPc, pourrait elle aussi conduire à l'induction de la voie de signalisation sérotoninergique.

Objectifs de l’étude

Objectifs de l'étude

Les facteurs paracrines intrasurrénaliens tels que la 5-HT, qui participent à la régulation fine de la sécrétion des corticostéroïdes, ainsi que les récepteurs membranaires illégitimes peuvent contribuer à la physiopathologie des maladies surrénaliennes comme cela a pu être montré dans l'adénome de Conn, les HMBS et le PPNAD. Par ailleurs, les études récentes de génomique ont montré que ces affections surrénaliennes sont fréquemment liées à des mutations somatiques capables d'activer des voies de signalisation intracellulaire qui participent à la tumorigenèse et la physiopathologie de l'hypersécrétion de stéroïdes. Il est possible que ces altérations génétiques favorisent également l'émergence des boucles de régulation intrasurrénaliennes illicites et participent à la surexpression des récepteurs illégitimes.

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier, par des approches moléculaires, immunohistochimiques et pharmacologiques, le rôle des voies de signalisation AMPc/PKA et Wnt/β-caténine dans la formation des systèmes de régulation aberrants au sein de la corticosurrénale, et en particulier dans l'émergence de récepteurs membranaires illégitimes et la production ectopique de 5-HT. Les mécanismes sous-tendant l'expression illégitime de récepteurs du GIP et de la LH/hCG couplés à une synthèse de cortisol dans le cortex surrénalien sont pour l'heure mal connus. En revanche, les précédentes études de notre équipe ont montré que l'activation de la voie AMPc/PKA dans le PPNAD était à l'origine de l'expression de récepteurs sérotoninergiques illégitimes couplés à une synthèse de cortisol.

Dans un premier temps, nous avons donc recherché si une stimulation chronique de la voie AMPc/PKA par des taux d'ACTH plasmatique élevés pouvait entraîner l'apparition de récepteurs membranaires illégitimes et d'une synthèse illicite de 5-HT au sein des cellules corticostéroïdogènes. Dans ce but, nous avons étudié l'expression de TPH1, 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7 par PCR quantitative et par immunohistochimie, et réalisé des études fonctionnelles à partir de tissus surrénaliens humains collectés dans le cadre du réseau national COMETE-Bio et de notre collaboration avec le *National Institutes of Health* de Bethesda. En outre, compte-tenu des effets connus de l'ACTH sur la trophicité du cortex surrénalien et la différenciation des cellules qui le composent, nous nous sommes intéressés à l'impact d'une telle stimulation sur l'histologie de la glande surrénale chez ces patients.

Par ailleurs, la présence de récepteurs illégitimes a été mise en évidence dans les adénomes producteurs d'aldostérone présentant une mutation du gène *CTNNB1* conduisant à l'activation de la voie Wnt/β-caténine. Pour déterminer s'il existe un lien de cause à effet entre l'activation de la voie Wnt/β-caténine et l'expression des récepteurs, nous avons utilisé différents modèles. Nous avons d'abord étudié les effets d'une activation de la voie Wnt/β-caténine, grâce à l'utilisation de rétrovirus, dans des cellules corticosurrénaliennes humaines normales en culture primaire. Dans un second temps, nous avons également pu apprécier les effets d'une activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien dans un modèle murin généré par des chercheurs de l'équipe INSERM U1103 de l'Université de Clermont-Ferrand. Nous avons pu ainsi étudier l'expression des récepteurs de la 5-HT, de la LH/hCG et du GIP *via* les techniques de PCR quantitative et d'immunohistochimie. Enfin, à partir de fragments de tissu surrénalien appartenant à un patient atteint de polypose adénomateuse familiale (mutation inactivatrice sur le gène *APC*), nous avons évalué à la fois l'expression des gènes et protéines d'intérêt cités ci-dessus ainsi que certaines enzymes de la stéroïdogenèse, et réalisé une étude fonctionnelle visant à déterminer la réponse stéroïdogène au GIP, à la LH/hCG, à la 5-HT et à des agonistes ou antagonistes des récepteurs 5-HT_4 et 5-HT_7.

Au-delà de son intérêt physiopathologique, ce travail s'inscrit dans une démarche visant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des hypercortisolismes et/ou hyperandrogénies.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Patients

***Surrénales humaines normales (SHN)* :** Les prélèvements de surrénales de patients en état de mort encéphalique donneurs d'organes ont été réalisés conformément au protocole établi entre l'unité INSERM U1239, représentée par le Pr Hervé Lefebvre, et le CHU de Rouen représenté par le Dr Edgar Menguy, médecin coordinateur de l'unité de prélèvements et greffes du CHU de Rouen. Ce protocole a reçu l'approbation de l'Agence de Biomédecine. Il requiert la participation des chirurgiens digestifs et urologues du CHU de Rouen avec lesquels notre équipe collabore depuis plusieurs années. Les glandes surrénales sont recueillies extemporanément lors du prélèvement des reins par le chirurgien et placées immédiatement dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life Technologies, France), contenant 1% d'une solution antibiotique et antimycotique (AA ; Life Technologies). En fonction de la taille du fragment surrénalien récupéré, le tissu frais est utilisé pour les études fonctionnelles, fixé au paraformaldéhyde (PFA) puis inclus en paraffine pour les études histologiques et/ou congelé à -80°C en vue d'extraire les acides nucléiques. Des prélèvements de surrénales également considérés comme normales sont issus de patients ayant bénéficié d'une néphrectomie élargie suite à un cancer du rein. Dans ce cas, le prélèvement est directement transmis au service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques qui fournit les coupes de tissu fixé et inclus en paraffine. Les surrénales de greffe et de néphrectomie sont utilisées comme tissus contrôles.

***Surrénales pathologiques* :** Les tissus pathologiques utilisés dans cette étude sont issus de 7 centres français (Rouen, Caen, Grenoble, Lyon et Assistance Publique des Hôpitaux de Paris dont Cochin, Kremlin-Bicêtre, La Pitié-Salpêtrière) et du *National Institutes of Health* de Bethesda (États-Unis). Les surrénales ont été prélevées chez 15 patients avec maladie de Cushing, 2 patients souffrant d'un syndrome de Cushing paranéoplasique dû à une sécrétion ectopique d'ACTH, 5 patients avec bloc enzymatique en 21-OH, 5 patients présentant une HMBS, 8 patients avec adénome corticosurrénalien sécrétant du cortisol dont 4 mutés pour le gène *PRKACA* et 1 patient présentant une polypose adénomateuse familiale. Les surrénales de ces patients ont été collectées immédiatement après la chirurgie et examinées par un pathologiste. Pour 6 patients avec maladie de Cushing, 2 patients avec bloc en 21-OH et 8 patients avec adénomes corticosurrénaliens producteurs de cortisol, des fragments surrénaliens

ont été congelés et conservés à -80°C dans le but d'en extraire les ARN pour l'étude de l'expression des gènes par PCR quantitative. Pour un des 2 patients présentant un Cushing paranéoplasique, un fragment surrénalien frais a pu être utilisé pour l'étude fonctionnelle. Pour tous les patients, un fragment de surrénale a été fixé et inclus en paraffine pour l'étude histologique. Le consentement a été recueilli pour chacun des patients.

Culture cellulaire

***Culture primaire* :** Après le prélèvement, les surrénales sont immédiatement transportées au laboratoire de recherche pour y être séparées du tissu adipeux périsurrénalien et disséquées. Les surrénales sont découpées en fragments de quelques millimètres. Les fragments sont placés dans une solution enzymatique contenant de la collagénase IA (60 mg/ml ; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et de DNase de type I (4 mg/ml ; Sigma-Aldrich) pendant 45 minutes sous agitation dans un incubateur avec 5% de CO_2. Après la digestion, une dissociation mécanique est exercée par pipetages successifs. Les enzymes sont éliminées par centrifugation des cellules. Les cellules de surrénale normale sont mises en suspension dans le milieu de culture composé de DMEM/Ham F12 1:1 (Life Technologies), 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF ; Sigma-Aldrich), 10% de sérum de cheval (Eurobio, Courtaboeuf, France), 2.5% de sérum de remplacement n°3 (Sigma-Aldrich), 1% de solution AA (Life Technologies), 1% de la solution insuline-transferrine-sélénium (BD Biosciences, San Jose, États-Unis) et 1 µl/ml de gentamycine (Life Technologies). Pour la mise en culture des cellules issues de surrénales pathologiques, le milieu ne contient ni sérum de cheval, ni sérum de remplacement n°3, ni gentamycine. En fonction des expérimentations prévues, les cellules sont distribuées à une densité de 10^6 cellules/ml dans des plaques de culture cellulaire Corning® 24 puits (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) pour les études pharmacologiques ou dans des boîtes de Pétri P10 (VWR) coatées au collagène IA (Institut de Biotechnologies Jacques Boy, Reims, France) pour les transfections cellulaires. Les cellules sont ensuite placées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO_2 et 95% d'air. Le milieu est renouvelé 24h après la mise en culture pour éliminer les cellules non-adhérentes.

***Études fonctionnelles* :** Les cellules sont placées dans un milieu appauvri à 1% de SVF la veille des études fonctionnelles. Les cellules sont traitées soit avec de l'ACTH 1-24 (Synacthène, Novartis Pharma, France), la 5-HT (Sigma-Aldrich), des agonistes 5-HT4 (BIMU-8, Sigma-Aldrich), 5-HT7 (AS-19, Tocris, France) ou une combinaison de 5-HT et des antagonistes 5-

HT4 (GR113808, Sigma-Aldrich) ou 5-HT7 (SB269970, Sigma-Aldrich). Ces agents pharmacologiques sont dilués dans du DMEM additionnée de 1% de solution AA. Les stimulations sont conduites pendant 24h à 37°C. Les surnageants de culture sont ensuite collectés et conservés à -20°C en attendant le dosage des stéroïdes.

Traitement de la lignée cellulaire H295R : La lignée cellulaire H295R provient de l'*American Type Culture Collection* (CRL-2128 ; Virginie, Etats-Unis). Elle est issue du corticosurrénalome primaire d'une patiente de type afro-américain (Gazdar *et al.*, 1990). Ces cellules produisent des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et des androgènes. Elles sont cultivées dans un milieu composé de DMEM/Ham F12 (1:1), 2.5% BD NuSérum (BD Biosciences), 1% de solution AA et 1% de la solution insuline-transferrine-sélénium. Les cellules H295R sont traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques ciblant la voie β-caténine. Deux molécules inhibant la tankyrase (médiateur de la voie Wnt/β-caténine qui empêche la liaison de l'AXIN) et deux molécules empêchant la liaison entre TCF4 et la β-caténine ont été utilisées : XAV939 (10^{-8} M) et JW74 (10^{-8} M), iCRT14 (10^{-5} M) et PKF118-310 (10^{-8} M) (Sigma-Aldrich). Les produits sont dilués dans de l'eau ou du DMSO (diméthylsulfoxyde). Les cellules H295R sont incubées en présence de ces inhibiteurs ou du milieu contrôle (DMEM + 1% AA + diluant) pendant 24h puis les cellules sont prélevées et les ARN extraits.

Lignée cellulaire H295R présentant une inhibition de la voie Wnt/β-caténine : Les cellules H295R transfectées avec des ARN courts en épingle à cheveux (*short hairpins ;* sh) ciblant la β-caténine (sh-βCAT) ou des sh contrôles (sh-CTRL) ont été générées par le Dr Michaël Thomas comme décrit précédemment (Salomon *et al.*, 2015).

***Transfection cellulaire* :** L' ADN complémentaire (ADNc) codant la β-caténine mutée S37A (*β-catenin*^{S37A}), offert par le Pr. S.W. Byers (Orford *et al.*, 1997), est cloné dans le plasmide pLPCX portant la résistance à la puromycine (Clontech, Palo Alto, CA), en aval du promoteur précoce du cytomégalovirus. La construction pLPCX-β-caténine^{S37A} et le vecteur rétroviral vide correspondant sont utilisés pour transfecter séparément la lignée cellulaire murine PT67 (CRL-12284) à l'aide du kit *Effecten Transfection Reagent* (Life Technologies). La lignée PT67, issue de la lignée 3T3 murine, a été génétiquement modifiée pour exprimer des gènes codant des composants rétroviraux (*gag*, *pol*, *env*). Les cellules sont soumises à une sélection à la puromycine (1 µg/ml) pendant 3 jours. Le surnageant contenant les virus amphotropiques est

collecté après 24h d'incubation et purifié avec une seringue munie d'un filtre 0.45 µm afin d'obtenir une solution de virus dépourvue de cellules PT67. Lorsque la densité des cellules corticosurrénaliennes humaines en culture primaire atteint 30-40% de confluence dans les boites de Pétri P10, la solution rétrovirale contenant les virus pLPCX-β-catenin^{S37A} (pLPCX-βCAT) ou les virus portant le plasmide vide (pLPCX) est ajoutée aux cellules pendant 72h. Enfin, les cellules sont sélectionnées à l'aide de la puromycine (0.8 µg/ml) pendant 3 jours pour générer des lignées cellulaires humaines stables surexprimant la β-caténine^{S37A}.

Dosage des stéroïdes par radioimmunodosage

Le dosage du cortisol est réalisé selon une méthode radioimmunologique mise au point au laboratoire (Lefebvre *et al.*, 1992), par compétition entre l'hormone marquée au tritium et l'hormone à doser. La DHEAS a également été dosée. L'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée pendant toute la nuit à +4°C. Après séparation au charbon, la radioactivité de la fraction liée à l'anticorps est quantifiée sur un compteur β (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). La sensibilité des dosages RIA est de 150 pg/ml pour le cortisol. La réactivité croisée des anticorps anti-cortisol est <0.001% pour l'aldostérone, <0.004% pour la progestérone et la 17-hydroxyprogestérone, <0.01% pour la deoxycorticostérone, <0.3% pour la corticostérone et <5% pour le déoxycortisol.

RT-PCR quantitative (QPCR)

Les ARN totaux sont extraits, à partir de tissus frais ou congelés à -80°C et à partir de cellules en culture, à l'aide de Tri Reagent (Sigma-Aldrich) puis purifiés sur des colonnes d'extraction Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). La qualité et la quantité des ARN sont respectivement évaluées sur bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) et NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Villebon-Sur-Yvette, France). Les ARN purifiés ainsi que les ARN poly A de SHN, placenta, intestin grêle, testicule et hypothalamus humains (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) utilisés pour la validation des amorces sont convertis en ADNc grâce au système de rétro-transcription ImProm-II (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ADNc sont incubés en présence du mélange Master SYBR Green (Applied Biosystems, Villebon-Sur-Yvette, France) et des amorces spécifiques des gènes étudiés **(Tableau 1)**.

L'amplification par PCR en temps-réel et la lecture des plaques sont réalisées à l'aide d'un appareil QuantStudio 3 (Applied Biosystems). La quantification des ARN d'intérêt est normalisée par l'utilisation du le gène *PPIA*, codant la cyclophiline, comme gène de référence. L'analyse des résultats est basée sur le calcul des ΔΔCt correspondant à la différence entre l'écart du nombre de cycles d'amplification entre le gène *PPIA* et le gène d'intérêt (ΔCt) et la moyenne de ces écarts. Les valeurs de variation d'expression des ARNm sont élevées à la puissance 2 ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) pour obtenir l'expression relative des gènes dans les échantillons traités ou les surrénales pathologiques comparée à celle des échantillons non-traités ou des surrénales normales. Pour le gène *HTR6*, les résultats sont exprimés en nanogrammes d'ARNm *HTR6* par nanogrammes d'ARNm *PPIA*.

Gène	Séquence 5'-3'		N° Accession GenBank	Taille amplicon (pb)
	Amorce sens	Amorce antisens		
AMH	CCTTCCACTCGGCTCACTTA	GCCAGTCCAAGTCTTCTCGG	NM_000479.4	189
AXIN2	AGTCAGCAGAGGGACAGGAA	ACACCTGCCAGTTTCTTTGG	NM_004655.3	113
CTNNB1	CTTGCTCAGGACAAGGAAGC	CATATGTCGCCACACCTTCA	NM_001904.3 NM_001098209.1 NM_001098210.1 NM_001330729.1	103
CYP11B1	AGGAGACCTTGCGGCTCTACC	GAACACGCGCACCAATGTC	NM_000497.3 NM_000498.3	110
CYP11B2	TCCAGGTGTGTTCAGTAGTTCC	GAAGCCATCTCTGAGGTCTGTG	NM_000498.3	146
FOXL2	GAGTTTTTGTTGGGCCTTCA	GAGGGTGAAACTTCCCCAAT	NM_023067.3	97
GATA4	TCCCTCTTCCCTCCTCAAAT	TCAGCGTGTAAAGGCATCTG	NM_001308093.1 NM_002052.4 NM_001308094.1	194
GATA6	GAGAAGATGGAAGGGAAGGG	TGTGTACCAAATGGCCTCA	NM_005257.5	285
GIP-R	GTGATGGCCAATGGGGACTT	TACATGACCTGCAACCGCTC	NM_000164.3 NM_001308418.1	109
HTR4	CTGTGGTGGCCTTCTACATCCC	ATGCACAGGGTCTTGGCTGC	NM_001040169.2 NM_000870.6 NM_001286410.1 NM_001040172.2 NM_199453.3 NM_001040173.2	199
HTR6	GGGTGCCATATGCTTCACCT	TCAGCAGACTCCACCCCTG	NM_000871.2	150
HTR7	AAAACATCTCCATCTTTAAGCGAGAA	GTAAAGGCCCCGACGATGAT	NM_000872.4 NM_019860.3 NM_019859.3	70
INSL3	GCCCTGGTGTTCGCGTTGG	CGCACTAGCGCGCGTACG	NM_001265587.1 NM_005543.3	86
LEF1	CAGTCATCCCGAAGAGGAAG	AGGGCTCCTGAGAGGTTTGT	NM_016269.4 NM_001130713.2 NM_001130714.2	125
LHCG-R	CTGCCGAGCTATGGCCTAG	ATTCTGTTCTTTTGTTGGCAAGTT	NM_000233.3	165
MC2R	GGACCGCTACATCACCATCT	AGGCACAGGATGAAGACCAG	NM_000529.2	198
POMC	CAGCCAGTGTCAGGACCTC	GGTCAGAGGCTGCTCGTC	NM_001035256.2 NM_000939.3 NM_001319204.1 NM_001319205.1	121
PPIA	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	TTGCCATTCCTGGACCCAAA	NM_021130.4 NM_001300981.1	241
StAR	GGCTACTCAGCATCGACCTC	CATCCCACTGTCACCAGATG	NM_000349.2	250
TPH1	TGCAAAGGAGAAGATGAGAGAATTTAC	CTGGTTATGCTCTTGGTGTCTTTC	NM_004179.2	114
TPH2	GCCTTTCCTCTGTGTTCATTAG	TCATTCCAACTGCTGTGTTACC	NM_173353.3	186
TPSAB1	CGATGTGGACAATGATGAGC	CGCCAAGGTGGTATTTTGC	NM_024164.5 NM_003294.3	104

<u>Tableau 1</u> : Séquences nucléotidiques des amorces ciblant les gènes humains utilisées en QPCR

Immunohistochimie :

Les coupes de tissu surrénalien inclus en paraffine (5 µm) sont déparaffinées en présence de cyclohexane puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes. Pour certains anticorps, un démasquage antigénique à la chaleur est réalisé dans du tampon citrate (pH=6) ou Tris-EDTA (pH=9). Les péroxydases endogènes et les sites de liaison non spécifiques sont saturés à l'aide d'un inhibiteur enzymatique (Dako, Les Ulis, France) puis avec du sérum non-immun relatif à l'espèce produisant le second anticorps (*normal goat serum*). Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire, dilué dans du tampon Tris mélangé à de l'albumine de sérum bovin (TBS-BSA 2%), en chambre humide pendant 60 minutes à température ambiante ou sur la nuit à 4°C selon le protocole établi. Après lavage des coupes, celles-ci sont mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (*horse radish peroxydase*) pendant 30 minutes. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans la **Tableau 2**. Les immunomarquages sont révélés après ajout de diaminobenzidine (Dako). Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée avant la déshydratation des coupes de tissu dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes. Les tissus sont finalement montés entre lame et lamelle avec le baume d'inclusion Eukitt (Kindler GmbH and Co., Freibourg, Allemagne). Les colorations hématoxyline-éosine-safran (HES) ont été réalisées par le Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Rouen. Les acquisitions d'images sont réalisées sur un microscope Nikon Eclipse E600D (Nikon, les Ulis, France) sur la plateforme de recherche en imagerie cellulaire de Normandie (PRIMACEN, Université de Rouen). La quantification du marquage immunohistochimique a été réalisée à l'aide du logiciel libre Image J (développé par le *National Institutes of Health*, États-Unis).

Immunocytochimie :

Pour cette technique, les cellules sont cultivées dans les Lab-Tek 8 puits (Dustcher, Issy-Les-Moulineaux, France). Les cellules sont fixées dans du PFA 4% pendant 10 minutes à 4°C puis rincées avec du DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Life Technologies). Après une étape de perméabilisation, les cellules sont traitées selon le protocole utilisé en immunohistochimie.

Cible	Espèce hôte	Démasquage antigénique	Dilution	Référence	Fournisseur
ACTH	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/50	AP15336PU-S	ACRIS antibodies
AMH	chèvre	pH6 / 95°C / 20 min	1/100	sc-6886	Santa Cruz
β-caténine	souris	pH6 / 95°C / 60 min	prêt à l'emploi	760-4242	Roche-Ventana
CD34	souris	pH6 / 95°C / 20 min	1/50	M7165 M078	Dako
CYP11B1	rat	pH9 / 95°C / 20 min	1/200	Dr C. Gomez-Sanchez, États-Unis	
CYP11B2	souris	pH9 / 95°C / 20 min	1/500		
DAB2	lapin	pH6 / 95°C / 30 min	1/200	sc-13982	Santa Cruz
FOXL2	chèvre	pH6 / 95°C / 20 min	1/100	NB100-1277	Novus Bio
GATA-4	souris	pH6 / 95°C / 20 min	1/50	clone 9F9	Origene
GATA-6	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/200	ab22600	Abcam
GIP-R	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/50	EPR5827	Abcam
INSL-3	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/2000	H-035-27	Phoenix Pharmaceuticals
Ki-67	souris	sans démasquage	1/100	MIB-1	Dako
LEF1	lapin	sans démasquage	1/100	ab137878	Abcam
LH-R	lapin	sans démasquage	1/200	PA 1552	Boster
MC2R	lapin	sans démasquage	1/50	Clone EPR5827	Abgent
TPH1	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/100	HPA022483	Sigma
Tryptase	souris	trypsine / 37°C / 15 min	1/1000	MCA1438T	Abd Serotec
5-HT	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/40	AHP522	Abd Serotec
5-HT4	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/250	bs-12054R	Interchim
5-HT6	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/1200	ab101911	Abcam
5-HT7	lapin	pH6 / full microwave / 15 min	1/100	AHP1344	Bio Rad
17-OH	lapin	pH6 / 95°C / 20 min	1/2000	Drs. V. Luu the et G. Pelletier, France	

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires utilisés en immunohistochimie et/ou immunocytochimie

Modèle murin

Le modèle murin étudié dans le cadre de cette thèse a été généré par le groupe du Dr Pierre Val comme décrit précédemment (Berthon *et al.*, 2010). Les souris sont issues du croisement entre des souris Catnb$^{lox(ex3)}$ et des souris akr1b7:Cre, exprimant la recombinase Cre spécifiquement dans le cortex surrénalien. Les animaux « contrôle » (Cttnb1$^{wt/wt}$ indifféremment porteurs de

Cre) et les animaux présentant une activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien spécifiquement (CtnnB1$^{fl/}$fl porteur de Cre; désignées par ΔCat) sont issus des mêmes croisements. Les ARNs ont été extraits à partir de surrénales de 12 souris femelles âgées de 10 mois dont 6 souris contrôle (*wild-type* ; WT) et 6 souris ΔCat. Les amorces utilisées en QPCR sont présentées dans la **Tableau 3**.

Gène	Séquence 5'-3'		N° Accession GenBank	Taille amplicon (pb)
	Amorce sens	Amorce antisens		
Axin2	ATGGGGAGTAAGAAACAGCTCC	CCAGCTCCAGTTTCAGTTTCTC	NM_015732.4	178
Gipr	GCGTGCTCTACTGCTTCATCAAC	AACTTTCCAAGACCTCATCCCC	NM_001080815.1	222
Htr6	CAGTCGCCGGCAGCGGATCA	CGTGTGAGTACGCTTGATCACGAG	XM_011250196.2	194
Htr7	CACCTGCTGAGCGGCTTCCC	GCCAGCGCCAGGGACACAAT	NM_008315.3 NM_001347442.2 NM_001360318.1 NM_001360300.1	248
Lef1	GACGAGCACTTTTCTCCGGG	TGGGGTGATCTGTCCAACGC	NM_010703.4 NM_001276402.1 NM_001276403.1	144
Lhcgr	GCCATGCATTCAATGGGACG	GGCCTGCAATTTGGTGGAAG	NM_013582.2	137
Ppib	GGAGATGGCACAGGAGGAA	GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	NM_011149.2	76

Tableau 3 : Séquences nucléotidiques des amorces ciblant les gènes murins utilisées en QPCR

Statistiques

Les données sont exploitées grâce au logiciel Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Etats-Unis) et analysées par l'utilisation de tests non paramétriques pour séries non-appariées (Test de Mann-Whitney). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (déviation standard à la moyenne) ou médiane ± interquartiles. Les valeurs de ρ inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

Résultats

Résultats

Article 1 : **Uprégulation illicite de la signalisation sérotoninergique dans les surrénales de patients exposées à des taux élevés d'ACTH plasmatique ou intrasurrénalienne.**

Julie Le Mestre, Céline Duparc, Yves Reznik, Jérôme Bertherat, Philippe Touraine, Olivier Chabre, Jacques Young, Constantine A. Stratakis, Gérald Raverot, Hervé Lefebvre et Estelle Louiset.

Article en préparation

Résumé. Dans la glande surrénale humaine normale, la sérotonine (5-HT) libérée par les mastocytes sous-capsulaires augmente la sécrétion d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée (ZG). Ces effets sont relayés par le récepteur sérotoninergique de type 4 (5-HT_4R), exprimé par les cellules de la ZG, couplé positivement à la voie de signalisation AMPc/protéine kinase A (PKA) et à un influx calcique. En revanche, le 5-HT_4R est faiblement exprimé dans la zone fasciculée (ZF). De façon intéressante, la synthèse anormale de 5-HT dans les cellules corticosurrénaliennes, ainsi que l'expression ectopique des récepteurs sérotoninergiques de type 6 et 7 (5-HT_6R, 5-HT_7R) ont été observées dans des pathologies surrénaliennes responsable d'un hypercortisolisme telles que la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (*primary pigmented nodular adrenocortical disease* ; PPNAD) (Bram *et al.*, 2016). Dans les cellules de PPNAD, le renforcement de la voie sérotoninergique apparaît comme la conséquence de l'activation de la voie AMPc consécutive à des mutations du gène *PRKAR1A*, à l'origine de la maladie.

Mon travail avait pour but d'étudier l'expression de la tryptophane hydroxylase de type 1 (TPH1 ; enzyme clé de la synthèse de 5-HT), et de 5-HT_4R, 5-HT_6R, 5-HT_7R dans la ZF de 21 patients souffrant de pathologies surrénaliennes associées à des taux élevés d'ACTH plasmatique, à savoir maladie de Cushing, sécrétion ectopique d'ACTH (syndrome de Cushing paranéoplasique) et déficit enzymatique en 21-hydroxylase (21-OHD), en comparaison avec des surrénales normales. Les tissus surrénaliens de 5 patients avec hyperplasie bilatérale des surrénales productrice d'ACTH et de 8 patients avec adénome surrénalien sécrétant du cortisol dont 4 présentant une mutation PRKACA, ont également été inclus dans cette étude. Enfin, nous avons évalué la capacité de la 5-HT à stimuler la sécrétion de cortisol par des cellules

corticosurrénaliennes en culture primaire issues d'une hyperplasie surrénalienne due à une sécrétion ectopique d'ACTH.

Les analyses de PCR quantitative ont montré une augmentation de l'expression de l'ARNm codant TPH1 dans les maladies de Cushing, suggérant une production locale de 5-HT. Le taux d'expression de l'ARNm 5-HT_4R était élevé dans les tissus de patients avec déficit enzymatique en 21-OH mais pas dans les maladies de Cushing. L'expression des ARNm 5-HT_6R et 5-HT_7R était significativement augmentée dans les maladies de Cushing. Les études immunohistochimiques ont révélé une expression élevée de 5-HT_4R, 5-HT_6R et 5-HT_7R dans des groupes de cellules appartenant à la ZF. Enfin, l'étude fonctionnelle a montré une forte augmentation de la sécrétion de cortisol par les cellules corticosurrénaliennes de syndrome de Cushing paranéoplasique en culture en réponse à la stimulation par la 5-HT ou des agonistes sérotoninergiques.

Nos résultats indiquent qu'une élévation soutenue des taux plasmatiques d'ACTH induit l'émergence d'une boucle sérotoninergique dans la ZF. Puisque le récepteur de l'ACTH est couplé positivement à l'adénylate cyclase, il est probable que ce processus résulte de l'activation de la voie de signalisation AMPc/PKA comme précédemment décrit dans le PPNAD. Ces données suggèrent également que la signalisation sérotoninergique intrasurrénalienne participe à la physiopathologie de l'hypercortisolisme ACTH-dépendant. Chez les patients avec 21-OHD, cette boucle de régulation anormale pourrait représenter un système adaptatif pour stimuler la production de glucocorticoïdes mais qui entraînerait, à la place, une surproduction de précurseurs.

Illicit upregulation of serotonin signaling in adrenals of patients with high plasma or intraadrenal ACTH levels

Julie Le Mestre[1], Céline Duparc[1], Yves Reznik[2], Jérôme Bertherat[3], Philippe Touraine[4], Olivier Chabre[5], Jacques Young[6], Constantine A. Stratakis[7], Gérald Raverot[8], Hervé Lefebvre[1,9] and Estelle Louiset[1].

[1]Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France.

[2]Department of Endocrinology-Diabetology, Caen University Hospital, Caen, France.

[3]Department of Endocrinology and Metabolic Diseases, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP), Cochin Hospital, Paris, France.

[4]Department of Endocrinology and Reproductive Medicine, AP-HP, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France.

[5]Department of Endocrinology, Diabetes and Nutrition, INSERM, U1036, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France.

[6]Department of Endocrinology and Reproductive Medicine, AP-HP, Bicêtre Hospital, Le Kremlin Bicêtre, France.

[7]Section on Endocrinology and Genetics (SEGEN), Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, 20892

[8]Department of Endocrinology, Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Bron, France

[9]Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Rouen-Normandie University Hospital, Rouen, France.

Keywords: adrenal, serotonin, serotonergic receptors, 21-hydroxylase deficiency, Cushing's disease

Abstract

Context: In the human adrenal, serotonin (5-HT), released by mast cells stimulates corticosteroid secretion through activation of type 4 serotonin receptors (5-HT_4R). In primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) cells, activation of the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway by *PRKAR1A* mutations triggers upregulation of the 5-HT synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase (TPH) and the 5-HT_4, 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors. Because ACTH stimulates cortisol secretion through binding to the melanocortin receptor type 2 and activation of PKA, adrenocortical tissues exposed to sustained stimulation by ACTH may harbor increased expression of TPH and 5-$HT_{4/6/7}$ receptors.

Objective: To investigate the effects of chronic ACTH stimulation on the serotonergic pathway in adrenals of patients with high plasma or intraadrenal ACTH levels.

Design, patients and methods: Adrenal tissues were obtained from patients with Cushing's disease (CD), ectopic secretion of ACTH (paraneoplastic Cushing's syndrome; paraCS), 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) or bilateral macronodular adrenal hyperplasia (BMAH). TPH and 5-$HT_{4/6/7}$ receptor expression was investigated using RT-PCR and immunochemistry in comparison with normal adrenals. Primary cultured adrenocortical cells originating from a paraCS patient were incubated with 5-HT and 5-HTR agonists/antagonists.

Results: TPH type 1 and 5-$HT_{4/6/7}$ receptors were overexpressed in the different types of tissues. In paraCS cultured cells, the cortisol response to 5-HT was exaggerated *vs* normal adrenals and the stimulatory action of 5-HT was reduced by 5-HT_4R antagonist.

Conclusion: Our results indicate that prolonged activation of the cAMP/PKA by ACTH induces an aberrant serotonergic stimulatory loop in the zona fasciculata which likely participates in the pathogenesis of corticosteroid hypersecretion.

Introduction

Adrenocorticotropic hormone (ACTH) released by pituitary corticotrophs, physiologically stimulates cortisol production by the adrenal cortex through binding to the melanocortin type 2 receptor (MC2R) and activation of the cAMP/protein kinase A (PKA) signaling pathway (1). Primary adrenal Cushing's syndrome is caused by adrenocortical adenomas and hyperplasias which overproduce cortisol independently of pituitary ACTH which is suppressed by cortisol excess. Interestingly, recent studies have shown that cortisol-producing neoplasias frequently display somatic or germline mutations that affect proteins of the cAMP/PKA pathway leading to constitutive activation of PKA. These mutations, which includes gain-of-function mutations of the *MC2R*, *GNAS*, *PRKACA, PRKACB* genes and inactivating mutations of the *PRKAR1A*, *PDE11A* and *PDE8B* genes (2–4), thus mimic the action of ACTH to stimulate glucocorticoid production, providing a molecular basis for the pathogenesis of primary adrenal Cushing's syndrome. As a matter of interest, it has also been shown that cortisol secretion by adrenocortical adenomas and hyperplasias could be stimulated by both locally produced ACTH (5) and aberrantly expressed membrane receptors like the serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) receptors types 4 (5-HT_4), 6 (5-HT_6) and 7 (5-HT_7) (4,6–8). 5-HT itself appears to be abnormally synthesized by a subpopulation of adrenocortical cells leading to formation of an illicit autocrine/paracrine regulatory loop which likely participates in the pathogenesis of hypercortisolism. In particular, the occurrence of an illicit intraadrenal serotonergic stimulatory mechanism has been described in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) due to *PRKAR1A* mutation (4), suggesting that activation of PKA by the causative genetic defect may be able to trigger upregulation of the 5-HT signaling pathway in neoplastic adrenocortical tissues. Consistent with this assumption, it was noticed that inactivation of *PRKAR1A* expression in the human adrenocortical carcinoma cell line H295R results in overexpression of tryptophan hydroxylase type 1 (TPH1), the key enzyme for 5-HT production, and the 5-HT_4, 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors. In addition, TPH inhibitors were found to reduce *in vitro* cortisol production by PPNAD tissue explants, indicating that these compounds may represent a new therapeutic approach in the clinical management of PPNAD-associated hypercortisolism.

Taking into account all these observations, we have therefore hypothesized that, in patients with adrenal disorders associated with high plasma ACTH concentration, overstimulation of the cAMP/PKA pathway caused by hyperactivation of the MC2-R could also lead to the appearance of an intraadrenal 5-HT regulatory loop which may contribute to the pathogenesis of the

diseases. We have thus investigated abnormal expression of the 5-HT-synthesizing enzyme TPH1 and 5-$HT_{4/6/7}$ receptors in adrenal tissues removed from patients with congenital adrenal hyperplasia linked to 21-hydroxylase enzyme deficiency (21-OHD) and ACTH-dependent Cushing's syndrome due to pituitary corticotroph adenomas (Cushing's disease; CD) or ectopic ACTH-secreting tumors (paraneoplastic Cushing's syndrome; paraCS). We have also examined expression of the 5-HT signaling pathway in bilateral adrenal hyperplasia (BMAH) samples which are known to contain clusters of ACTH-producing cells and cortisol producing adenomas (CPAs) carrying somatic *PRKACA* mutations responsible for activation of PKA in adrenocortical cells. Finally, we have studied *in vitro* the effect of 5-HT on cortisol production by adrenocortical cells from one patient with ACTH-dependent Cushing's syndrome.

Patients and methods

Tissue collection

Patients were recruited from 7 French centers (Rouen, Caen, Cochin, Kremlin-Bicêtre, La Pitié-Salpêtrière, Grenoble, Lyon) and from the National Institutes of Health (Bethesda, USA). Adrenal tissues were obtained from thirteen patients with Cushing's disease (CD) due to ACTH-secreting pituitary adenoma, three patients with ectopic ACTH-secreting tumors (ParaCS), five patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency (21-OHD), five patients with bilateral macronodular adrenal hyperplasia (BMAH), four patients with *PRKACA*-mutated CPA and four patients with CPA without *PRKACA* mutation. Clinical, biological and genetic data from each patient are summarized in Table 1. Adrenal glands were collected after surgery and immediately dissected by the pathologists. For six patients with CD, two patients with 21OHD and eight patients with adrenocortical adenoma, adrenal explants were frozen and kept at -80°C before RNA extraction for real time RT-PCR analysis. For one of the patients with paraCS, adrenal fragments were immersed in culture medium until cell dissociation. For all patients, tissues were fixed in formalin for histological study. Nine normal adrenals (control tissues) were obtained from patients undergoing expanded nephrectomy for kidney cancer. The experimental approaches carried out in the diverse pathological tissues are summarized in Table 2. The protocol of collection of the tissues and the experimental procedures were approved by the regional ethic committees, and informed consent was obtained from all subjects. Human adrenal $polyA^+$ RNA were also used as control tissue (Takara, Saint-Germain en Laye, France).

Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Total RNAs were extracted from adrenal samples by using Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and purified with the Nucleospin RNA II isolation kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). The concentration of total RNAs was measured on Nanodrop 2000c (ThermoScientific, Villebon-Sur-Yvette, France). Purified RNAs and polyA$^+$ RNAs were converted into cDNA by using ImProm-II RT kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Real-time PCR amplifications were performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Villebon-Sur-Yvette, France) in a QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with specific primers (Table 3). Quantification of cDNAs was normalized to cyclophilin (*PPIA*) gene expression. Samples were analyzed in duplicate in two different experiments. Results were analyzed using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Immunohistochemistry

Sections from formalin-fixed paraffin-embedded adrenals (5 µm) were first deparaffinized and rehydrated. Sections underwent antigen retrieval treatment by heating at 95°C in 10 mM citrate buffer (pH=6; 20 min) or Tris-EDTA SDS 0,05% (pH=9; 20 min). They were treated with a peroxidase blocking reagent (Dako Corporation, Les Ulis, France). The tissue sections were incubated for 60 min with primary antibodies against 5-HT, 5-HT_4, 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors, TPH1, ACTH and DAB2 (Table 4). They were then incubated with anti-mouse, anti-rabbit or anti-rat immunoglobulins streptavidin-biotin complex coupled to peroxidase (Dako Corporation). Immunoreactivities were revealed with diaminobenzidine (Dako Corporation). Sections were finally counterstained with hematoxylin, mounted in Eukitt (Kindler GmbH and Co., Freibourg, Germany), cover-slipped, and examined on an Eclipse E600D microscope (Nikon, Les Ulis, France) on PRIMACEN, the Cell Imaging Platform of Normandy (University of Rouen Normandy). A histological score was used to evaluate the staining intensity (0: no staining, 1:weak, 2:moderate, 3:strong staining), with moderate and strong staining being considered as positive.

Cell culture

Adrenals were sliced and stirred twice for 45 min at 37°C in cell culture medium containing collagenase type 1A (60 mg/ml; Sigma-Aldrich) and desoxyribonuclease 1 type 4 (4 mg/ml; Sigma-Aldrich) in a 5% CO_2 - 95% air atmosphere until cell dissociation. Dispersed cells were suspended in 50% DMEM and 50% Ham-F12 (Life Technologies, France) supplemented with 5% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), 1% antibiotic-antimycotic solution (Life Technologies) and 1% insulin-transferrin-selenium solution (BD Biosciences, San Jose, CA).

Cells were plated on 24-well culture dishes. Adrenocortical cells were cultured at 37°C in a 5% CO_2 - 95% air atmosphere with 100% relative humidity. The cell culture medium was changed 24 h after plating to remove non-adherent cells. The cells obtained from patient 20 with paraCS were treated either with ACTH 1-24 (Synacthen, Novartis Pharma, France), 5-HT (Sigma-Aldrich), 5-HT4R agonist (BIMU-8, Sigma-Aldrich), 5-HT7R agonist (AS-19, Tocris, France) or with a combination of 5-HT and 5-HT4R antagonist (GR113808, Sigma-Aldrich), or 5-HT7 receptor antagonist (SB269970, Sigma-Aldrich). Normal adrenocortical cells obtained from a patient undergoing expanded nephrectomy for kidney cancer were incubated with increasing concentrations of 5-HT.

Radioimmunoassays

Cortisol and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) concentrations in cell culture medium were measured by radioimmunoassay procedures using specific antibodies. As previously described (9), the sensitivity of the cortisol assay was 15 pg. Cross-reactivity of cortisol antibodies with test compounds was less than 0.01%.

Statistical analysis

RT-PCR data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis were performed by using a Mann-Whitney test to compare the mRNA levels measured respectively in control and pathological tissues (Prism 6, GraphPad Software). No statistical analysis of the data obtained in 21-OHD tissues was possible owing to the low number of samples including in this group.

Results

The 5-HT signaling pathway in adrenal tissues exposed to high circulating levels of ACTH

5-HT synthesis in adrenal tissues

TPH1 mRNA is detected in the normal human adrenal at variable levels and appears overexpressed in adrenal samples removed from patients with 21OHD or CD (Fig. 1A) whereas *TPH2* mRNA was not detectable (data not shown). In the normal adrenal, TPH1 is exclusively detected in mast cells localized under the capsule (Fig. 1B), as previously reported (4). In adrenals of 3 out of the 5 patients with 21OHD, TPH1 immunoreactivity was observed in the subcapsular region of the cortex with a diffuse and homogeneous pattern of distribution (Fig. 1D and 1E). Interestingly, subcapsular TPH1 immunostaining was superimposed to that of disabled homolog 2 (DAB2), a marker of ZG (Fig. S1). In addition, spongiocytic adrenocortical

cells positive for TPH1 were visualized in the inner cortex and/or hyperplastic nodules in adrenals of the 2 remaining 21OHD patients (data not shown). In adrenals from patients with CD, TPH1 immunoreactivity was observed in both cells of the subcapsular region and in ZF for 12 out of the 14 patients (Fig. 1G and 1H). Only one CD patient exhibited no adrenal TPH1 staining. TPH1 immunoreactivity was also visualized in the medulla for nine patients (data not shown). As expected, TPH1-positive cells were also labelled by 5-HT antibodies in NA, 21OHD and CD adrenal tissues (Fig. 1C, 1F and 1I). Conversely, no TPH1 and 5-HT labelling could be detected in adrenals from patients with paraCS (Fig. 1J-1L).

Expression of the 5-HT$_{4/6/7}$ receptors in adrenal tissues

As previously shown, normal adrenals were found to express *HTR4* mRNA and 5-HT4R immunoreactivity was principally detected in the ZG (Fig. 2A and 2B). Conversely, *HTR4* mRNA was detected at high levels in the two frozen 21OHD tissues. Strong 5-HT4R staining could be visualized the inner cortex in 4 of the 5 21OHD patients studied whereas ZG labelling was less intense and limited to some adrenocortical cells distributed throughout the subcapsular region (Fig. 2C and 2D). *HTR4* mRNA levels were similar in CD and NA samples (Fig. 2A). However, at variance with what is observed in NA, immunohistochemical detection of 5-HT$_4$R in CD adrenal tissues revealed a sharp decrease in 5-HT4R staining in ZG, *i.e.* limited to groups of cells discontinuously distributed under the capsule, contrasting with an intense staining of ZF, which was observed in some cell cords (Fig. 2E and 2F). The reduction of 5-HT4R labelling in the subcapsular zone is associated with a diminution of ZG thickness, as shown by DAB2 labelling surface (Fig. S1). In paraCS tissues, adrenocortical cells immunopositive to the 5-HT4R were principally observed in the vicinity of clusters of metastatic cells which were shown to produce ACTH (Fig. 2G and 2H, and Fig. S2).

As previously published (4), *HTR6* mRNA levels were not significant and 5-HT6R immunoreactivity were not detected in NA (Fig. 3A and 3B). By contrast, the two 21OHD adrenal tissues processed for RT-QPCR studies expressed the *HTR6* mRNA and 5-HT6R was visualized in clusters of spongiocytic cells in both the subcapsular region and the inner cortex of adrenals in 3 of the 5 patients (Fig. 3A, 3C and 3D). In CD patients, *HTR6* mRNA is overexpressed in comparison with NA (Fig. 3A). The 5-HT6R was present in ZF cells organized in clusters or cords (Fig. 3E and 3F). In addition, 5-HT6 immunoreactivity was observed in the paraCS sample from patient 19 (Fig. 3G) but not in the adrenocortical cells surrounding metastatic ACTH-producing cells in patient 20's adrenal (Fig. 3H).

As expected, *HTR7* mRNA levels were very low and no 5-HT7R immunoreactivity was seen in NA tissues (Fig. 4A and 4B). However, the *HTR7* mRNA was detectable in 21OHD tissues and 5-HT7R immunopositive cells were visualized in the cortex of 4 of the 5 patients with a distribution resembling that of 5-HT4R expressing cells, *i.e.* arranged in dispersed clusters in the ZG and cords in the ZF for two patients (Fig. 4A, 4C and 4D). *HTR7* mRNA was overexpressed in CD adrenals in comparison with NA (Fig. 4A). Immunochemical studies revealed the presence of 5-HT_7R immunopositive cell cords spanning the three zones of the cortex in 10 of the 13 patients (Fig. 4E). In the remaining 3 patients, the 5-HT7R labelling was exclusively detected in the subcapsular region (Fig. 4F). A diffuse pattern of distribution of 5-HT7R immunoreactivity was observed in paraCS samples with important heterogeneity (Fig. 4G and 4H).

Effect of 5-HT and various serotonergic receptor ligands on cortisol production from a paraCS tissue

We have examined the effects of ACTH, 5-HT, and diverse synthetic ligands of the 5-HT_4 and the 5-HT_7 receptors on cortisol secretion from adrenocortical cells removed from patient 20 with paraCS. ACTH (10^{-10} M), which was used as a positive control, induced a +644% increase in cortisol production (Fig. 5A, *inset*). 5-HT (10^{-9} to 10^{-5} M) dose-dependently stimulated cortisol secretion by adrenocortical cells (EC_{50} = 1.47 x 10^{-9} M; E_{max} = 264%). The 5-HT4R agonist BIMU-8 (10^{-9} to 10^{-5} M) and the 5-HT7R agonist AS-19 (10^{-8} to 10^{-5} M) induced modest increases in cortisol release, reaching respectively 145% and 127% with potencies of 4.74 x 10^{-9} M and 1.17 x 10^{-8} M (Fig. 5A). The action of 5-HT was not influenced by the 5-HT_7R antagonist SB-269970 (10^{-9} to 10^{-5} M) but was partially inhibited by the 5-HT_4R antagonist GR-113808 (10^{-9} to 10^{-5} M) which reduced the potency of 5-HT (EC_{50} = 3.17 x 10^{-7} M) although the compound increased the efficacy of the indolamine to 750% (Fig. 5B).

The intensities of the diverse immunostainings visualized in 21OHD, CD and para CS tissues are presented in Table 5.

The 5-HT signaling pathway in BMAH and its relation to ACTH-producing cells

In order to examine the impact of intraadrenal ACTH on the 5-HT signaling pathway in BMAH samples, consecutive sections of adrenal samples from 5 patients with BMAH were labelled with ACTH antibodies and antibodies to TPH1 and the 5-HT4/6/7 receptors. As previously reported (5), clusters of ACTH-producing cells were observed in all samples (Fig. 6A and 6B).

TPH1 and 5-HT4R immunoreactivities were essentially detected in ACTH-positive cells (Fig. 6C-6F). The distribution of the 5-HT6 and 5-HT7 receptors was more diffuse and apparently not correlated with the presence of ACTH-positive cells (Fig. 6G-6J). The intensities of TPH1 and 5-HT4/6/7 labellings in BMAH tissues are presented in Table 5.

The 5-HT signaling pathway in cortisol-producing adrenocortical adenomas

To further investigate the influence of activation of the cAMP/PKA pathway on adrenal 5-HT signaling, we have studied expression of TPH1 and the 5-HT4/6/7 receptors in a short series of CPAs carrying somatic *PRKACA* mutations in comparison with non *PRKACA*-mutated CPAs. Expression of the *HTR6* and *HTR7* mRNAs was significantly increased in both mutated and non-mutated CPAs in comparison with NA (Fig. 7A-7D). The two groups of CPAs were found to intensely express TPH1 and the three types of receptors with variable distributions throughout the tissues (Fig. 7E-7P). The intensities of TPH1 and 5-HT4/6/7 labelings in CPA tissues are presented in Table 5.

Effect of 5-HT on dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) production by cultured normal adrenocortical cells.

We have investigated the action of 5-HT on DHEAS production by normal adrenocortical cells in primary culture in comparison to the previously shown effect of the amine on cortisol release. 5-HT (10^{-9} to 10^{-6} M) significantly stimulated DHEAS production by normal adrenocortical cells in primary culture in a dose-dependent manner (Fig. 8A). The potencies of 5-HT to activate adrenal androgen and cortisol secretions were similar, with EC_{50} reaching respectively 6.53×10^{-8} M and 4.39×10^{-8} M. However, 5-HT was less efficient to stimulate DHEAS (E_{max} = 133%) than cortisol (E_{max} = 193%) synthesis. In addition, immunohistochemical studies allowed detection of 5-HT4R staining in the ZR of the normal adrenal cortex (Fig. 8B).

Discussion

In the normal human adrenal gland, 5-HT is exclusively synthesized and produced by subcapsular mast cells and, after its release, stimulates aldosterone secretion through a paracrine mechanism involving the 5-HT_4 receptor (10,11). Conversely, in PPNAD related to *PRKAR1A* mutations, activation of the cAMP/PKA pathway triggers overexpression of TPH2 and the 5-$HT_{4/6/7}$ receptors in adrenocortical cells, leading to formation of an intraadrenal serotonergic stimulatory loop which is involved in cortisol hypersecretion (4). We have thus examined whether this paracrine process could be observed in adrenal tissues exposed to chronically high plasma ACTH levels. In 21OHD and CD adrenals, TPH1 was abnormally expressed in steroidogenic cells in both ZG and ZF whereas, at variance with PPNAD samples, *TPH2* mRNA was undetectable. It is possible that preferential expression of TPH2 rather than TPH1 in PPNAD may be a consequence of the neuroendocrine differentiation of the tissues (12). The observation that TPH1 is absent in the adrenals removed from patients with paraCS who are exposed to very high concentrations of ACTH (resulting both from markedly elevated plasma levels and intraadrenal production of the hormone in two cases), could suggest that the stimulatory action of ACTH on TPH1 expression is attenuated at greater concentration values *via* a possible desensitization phenomenon. However, this possibility needs to be confirmed in a larger series of tissues. Illicit expression of TPH1 in the adrenal cortex indicates that adrenocortical cells may be able to synthesize 5-HT since L-aminoacid decarboxylase, which allows conversion of 5-hydroxytryptophan to 5-HT, is known to be expressed in the adrenal gland like in many organs (13). As expected, we could observe the presence of detectable amounts of 5-HT in TPH1-positive cells. It cannot be excluded that 5-HT contained in adrenocortical cells may also partly originate from the plasma through an uptake process as the 5-HT transporter SERT has been shown to be expressed in the adrenal cortex (4).

Ectopic synthesis of 5-HT in 21OHD and CD samples suggests that the indolamine may stimulate corticosteroid secretion by a paracrine mode of action. We have thus investigated expression of 5-HT receptors in the tissues by focusing on the types 4, 6 and 7 which had previously been shown to be upregulated in PPNAD. Globally, expression of the 5-HT_4R was increased in 21OHD and CD tissues, as well as paraCS samples. The level of 5-HT_4R mRNA in CD was similar to that of the normal adrenal but immunohistochemistry revealed that, at variance with control tissues, 5-HT_4R immunoreactivity is markedly decreased in the ZG but abnormally detected in the ZF in CD adrenals. Interestingly, the reduction in 5-HT4R staining is associated with a diminution of the subcapsular DAB2 staining surface suggesting partial

regression of the ZG under the influence of high ACTH levels, as previously proposed in animal models (14,15). The fact that 5-HT_4R labelling was particularly intense in adrenocortical cells surrounding metastatic ACTH-producing cells in paraCS tissues strongly supports a causative role of corticotropin in 5-HT_4R upregulation. The 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors, which are not physiologically present in the human cortex, were also found to be expressed at variable levels in the tissues with the exception of the 5-HT6R in the one paraCS samples. Activation of PKA by ACTH in adrenocortical cells may thus also trigger 5-HT_6 and 5-HT_7 receptor expression, as shown in PPNAD. In addition, we have examined the 5-HT signaling pathway in BMAH tissues which are known to contain islets of ACTH-producing cells (5) and CPAs carrying somatic gain-of-function mutations of *PRKACA*. Our data indicate that, in BMAH, ACTH-positive cells also express TPH1 and the 5-HT_4R indicating that ACTH may upregulate these two proteins through an autocrine process. This hypothesis is supported by previous findings showing that BMAH ACTH-positive cells express the MC2 receptor (5) and that ACTH stimulates its own synthesis in these cells (16). Conversely, expression of the 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors in the BMAH samples appears less dependent on local synthesis of ACTH. It is possible that upregulation of *HTR6* may be favored by hypersecretion of cortisol, as suggested by the identification of glucocorticoid responsive elements in the promoter of the gene (17). On the other hand, overexpression of 5-HT_7R may be rather regarded as an additional trait of pseudogonadal differentiation of the adrenal cortex observed in BMAH tissues (5). Indeed, at variance with the adrenal gland, gonads have been shown to physiologically express the 5-HT7R (18,19). We observed that the 5-HT signaling pathway is upregulated in CPAs in both *PRKACA*-mutated and *PRKACA* non-mutated tumors, a finding which could suggest that, in some tumors, other mechanisms than activation of PKA could be responsible for overexpression of TPH1 and 5-$HT_{4/6/7}$ receptors. However, it should also be noticed that activation of the cAMP/PKA pathway is frequent in CPAs and can result from various somatic mutations affecting not only *PRKACA* but also several genes encoding diverse proteins of the pathway like *GNAS* and *CREB1* (20). Therefore, it appears likely that *PRKACA* non-mutated tumors abnormally expressing the 5-HT signaling pathway may also harbor some degree of PKA activation.

Upregulation of the 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors together with overexpression of the 5-HT_4R have important potential implications in the pathogenesis of steroid hypersecretion. In fact, these three types of receptors are positively coupled to the cAMP/PKA pathway which is a major activator of corticosteroid synthesis in the ZF and ZR (21). As a matter of fact, we

observed that cortisol production from a paraCS adrenal tissue was strongly stimulated by 5-HT *in vitro* principally through activation of 5-HT_4R. In addition, the 5-HT_6R may participate in adrenocortical tumor expansion through its positive coupling to the mTOR pathway (22) whose activation is known to decrease apoptosis in adrenocortical cells (23). It is also pathophysiologically relevant to mention that both the 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors exhibit significant constitutive activity (24,25) and may thus exert partial stimulation on the adrenal tissues independently of their activation by 5-HT. Especially, this mechanism may play a significant role in paraCS tissues which do not seem to produce 5-HT but express the 5-HT_7R. Most importantly, activation of the 5-HT signaling pathway may significantly contribute to the pathogenesis of adrenal androgen hypersecretion in 21OHD. In fact, we show that 5-HT is able to stimulate DHEAS from cultured normal adrenocortical cells presumably through the eutopic 5-HT_4R which is detected in the ZR through immunohistochemistry in agreement with previous studies using binding of synthetic radioligands on adrenal slices (26). In addition, androgen levels are difficult to lower in some 21OHD patients even by administrating high doses of glucocorticoid. In these cases, the resistance of androgen secretion to ACTH suppression is likely indicative of the involvement of an intraadrenal stimulatory process like the serotonergic pathway.

Collectively, our data obtained from adrenal tissues exposed to high levels of ACTH indicates that corticotropin is able to induce the 5-HT signaling pathway in the adrenal cortex. This phenomenon may occur in physiological conditions like stress which not only induces activation of the hypothalamo-pituitary corticotropic axis but also triggers abnormal synthesis of 5-HT and overexpression of 5-HT receptors in the rat adrenal cortex (27). This mechanism is probably aimed at potentiating the glucocorticoid response to stress through recruitment of intraadrenal stimulatory signals whose action adds to that of circulating ACTH. The serotonergic pathway has also been shown to represent an inducible paracrine system in other organs such as pancreatic islets. In mice, the increase in beta-pancreatic cell mass observed during pregnancy involves upregulation of TPH and 5-HT receptors in response to prolactin and placental lactogen stimulation to enhance insulin secretion and maintain glucose homeostasis (28). The adrenal gland may thus constitute another example of the importance of 5-HT as a paracrine factor in peripheral organs that also include bone, the mammary gland and the adipose tissue (29–31). Finally, our results suggest that inhibition of adrenal 5-HT synthesis *via* administration of peripheral TPH inhibitors, which are currently developed for the treatment of carcinoid syndrome, may represent an original treatment of corticosteroid hypersecretion as

an alternative to adrenal surgery, especially in female 21OHD patients with persistently high androgen levels despite glucocorticoid suppressive treatment or patients with CPA. Overexpression of 5-HT receptors in CD adrenals also indicates that 5-HT reuptake inhibitors, which may be used to treat depressive syndrome associated to hypercortisolism, should be avoided in this condition.

References

1. **Gallo-Payet N.** Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J. Mol. Endocrinol.* 2016. doi:10.1530/JME-15-0257.

2. **Espiard S, Knape MJ, Bathon K, Assié G, Rizk-Rabin M, Faillot S, Luscap-Rondof W, Abid D, Guignat L, Calebiro D, Herberg FW, Stratakis CA, Bertherat J.** Activating PRKACB somatic mutation in cortisol-producing adenomas. *JCI Insight* 2018;3(8). doi:10.1172/jci.insight.98296.

3. **Calebiro D, Dalmazi GD, Bathon K, Ronchi CL, Beuschlein F.** cAMP signaling in cortisol-producing adrenal adenoma. *Eur J Endocrinol* 2015;173(4):M99–M106.

4. **Bram Z, Louiset E, Ragazzon B, Renouf S, Wils J, Duparc C, Boutelet I, Rizk-Rabin M, Libé R, Young J, Carson D, Vantyghem M-C, Szarek E, Martinez A, Stratakis CA, Bertherat J, Lefebvre H.** PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight* 2016;1(15). doi:10.1172/jci.insight.87958.

5. **Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Libé R, Bram Z, Groussin L, Caron P, Tabarin A, Grunenberger F, Christin-Maitre S, Bertagna X, Kuhn J-M, Anouar Y, Bertherat J, Lefebvre H.** Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 2013;369(22):2115–2125.

6. **Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, Lefebvre H.** Expression of serotonin7 receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91(11):4578–4586.

7. **Lefebvre, Duparc C, Prévost G, Zennaro MC, Bertherat J, Louiset E.** Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015;408:198–204.

8. **St-Jean M, Ghorayeb NE, Bourdeau I, Lacroix A.** Aberrant G-protein coupled hormone receptor in adrenal diseases. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018;32(2):165–187.

9. **Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, Vaudry H.** Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience* 1992;47(4):999–1007.

10. **Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Legrand A, Kuhn JM, Vaudry H, Wolf LM.** The serotonin-4 receptor agonist cisapride and angiotensin-II exert additive effects on aldosterone secretion in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80(2):504–507.

11. **Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, Kuhn JM.** Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(10):5001–5007.

12. **Stratakis CA, Carney JA, Kirschner LS, Willenberg HS, Brauer S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR.** Synaptophysin immunoreactivity in primary pigmented nodular

adrenocortical disease: neuroendocrine properties of tumors associated with Carney complex. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999;84(3):1122–1128.

13. **Chang YT, Mues G, Hyland K.** Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA. *Neurosci. Lett.* 1996;202(3):157–160.

14. **Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Tabbal H, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Pointud J-C, Gomez-Sanchez CE, Vainio S, Shan J, Sacco S, Schedl A, Stratakis CA, Martinez A, Val P.** PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun* 2016;7. doi:10.1038/ncomms12751.

15. **Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP.** Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006;291(5):E965–E973.

16. **Cavalcante IP, Nishi M, Zerbini MCN, Almeida MQ, Brondani VB, Botelho MLA de A, Tanno FY, Srougi V, Chambo JL, Mendonca BB, Bertherat J, Lotfi CFP, Fragoso MCBV.** The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018;460:36–46.

17. **Falkenberg VR, Rajeevan MS.** Identification of a potential molecular link between the glucocorticoid and serotonergic signaling systems. *J. Mol. Neurosci.* 2010;41(2):322–327.

18. **Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D, Mukhopadhyay AK.** Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000;85(3):1277–1286.

19. **Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, Levy FO.** The cloned human 5-HT7 receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2001;363(6):620–632.

20. **Ronchi CL, Di Dalmazi G, Faillot S, Sbiera S, Assié G, Weigand I, Calebiro D, Schwarzmayr T, Appenzeller S, Rubin B, Waldmann J, Scaroni C, Bartsch DK, Mantero F, Mannelli M, Kastelan D, Chiodini I, Bertherat J, Reincke M, Strom TM, Fassnacht M, Beuschlein F, European Network for the Study of Adrenocortical Tumors (ENSAT).** Genetic Landscape of Sporadic Unilateral Adrenocortical Adenomas Without PRKACA p.Leu206Arg Mutation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2016;101(9):3526–3538.

21. **Tsai L-CL, Beavo JA.** The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11(6):670–675.

22. **Meffre J, Chaumont-Dubel S, Mannoury la Cour C, Loiseau F, Watson DJG, Dekeyne A, Séveno M, Rivet J-M, Gaven F, Déléris P, Hervé D, Fone KCF, Bockaert J, Millan MJ, Marin P.** 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med* 2012;4(10):1043–1056.

23. **de Joussineau C, Sahut-Barnola I, Tissier F, Dumontet T, Drelon C, Batisse-Lignier M, Tauveron I, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M, Stratakis CA, Bertherat J, Val P, Martinez A.** mTOR pathway is activated by PKA in adrenocortical cells and participates in vivo to apoptosis resistance in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). *Hum. Mol. Genet.* 2014;23(20):5418–5428.

24. **Kohen R, Fashingbauer LA, Heidmann DE, Guthrie CR, Hamblin MW.** Cloning of the mouse 5-HT6 serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2001;90(2):110–117.

25. **Krobert KA, Levy FO.** The human 5-HT7 serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br. J. Pharmacol.* 2002;135(6):1563–1571.

26. **Kuc RE, Parker CA, Gee AD, Bao YP, Brown MJ, Davenport AP.** 5-HT4 receptor distribution in the human adrenal revealed by 3H-GR113808 A 5-HT4 receptor antagonist. *Proc. Brit. Parmacol. Soc.* 2005;3:68.

27. **García-Iglesias BB, Mendoza-Garrido ME, Gutiérrez-Ospina G, Rangel-Barajas C, Noyola-Díaz M, Terrón JA.** Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT_7 receptors. *Neuropharmacology* 2013;71:216–227.

28. **Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, German MS.** Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat. Med.* 2010;16(7):804–808.

29. **Michalowska M, Znorko B, Kaminski T, Oksztulska-Kolanek E, Pawlak D.** New insights into tryptophan and its metabolites in the regulation of bone metabolism. *J. Physiol. Pharmacol.* 2015;66(6):779–791.

30. **Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, Bailey JP, Nieport KM, Walther DJ, Bader M, Horseman ND.** Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell* 2004;6(2):193–203.

31. **Wyler SC, Lord CC, Lee S, Elmquist JK, Liu C.** Serotonergic Control of Metabolic Homeostasis. *Front Cell Neurosci* 2017;11:277.

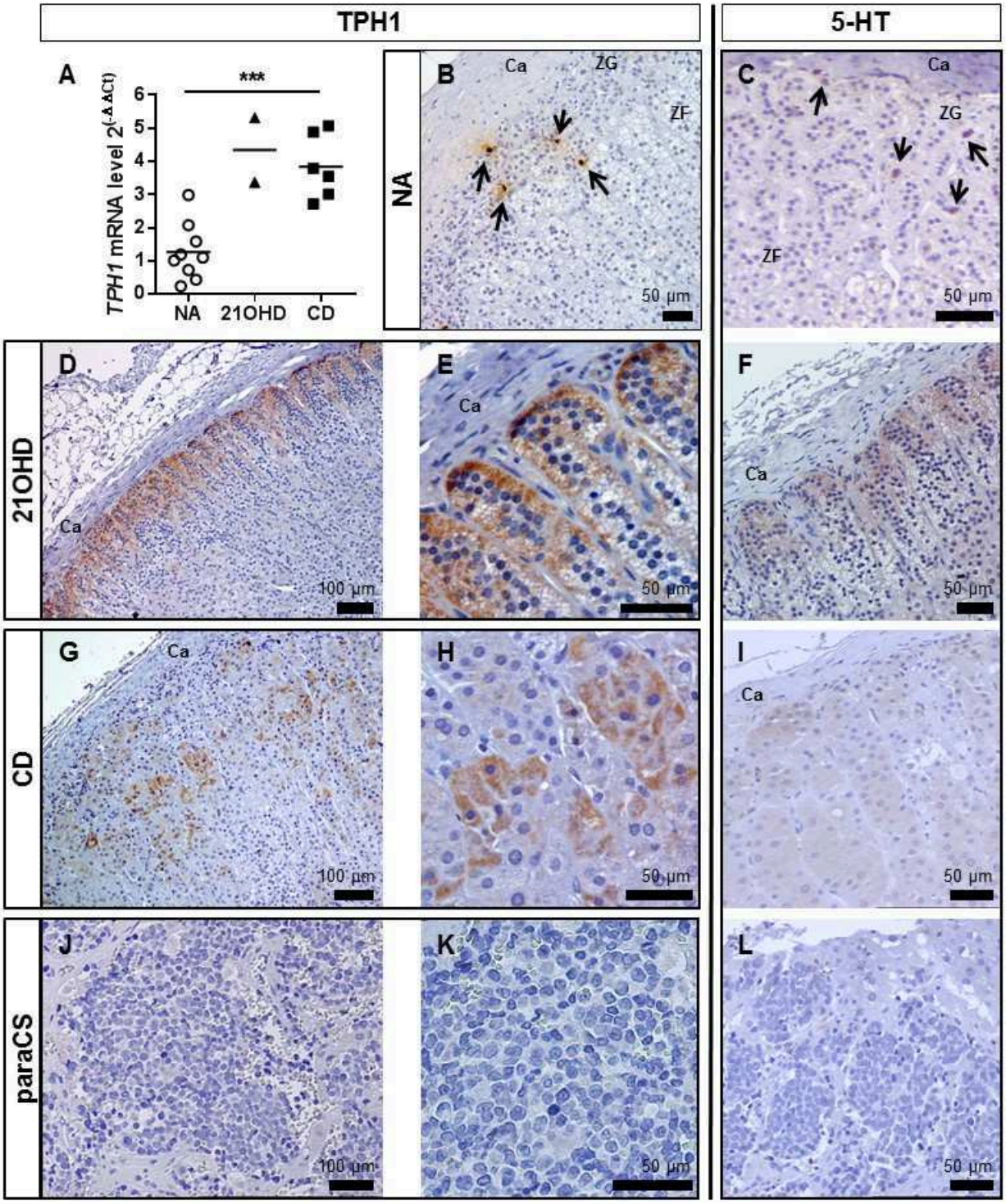


Figure 1. Expression of tryptophan hydroxylase type 1 and detection of 5-HT in the adrenal tissues. (A) Expression levels of *TPH1* mRNA in NA, 21-OHD and CD tissues. (B-L) Representative microphotographs showing the distributions of TPH1 and 5-HT immunoreactivities in NA (B,C), 21-OHD (D-F; patient 1), CD (G-I ; patient 6) and paraCS (J-L; patient 20) samples. Ca: capsule; ZG: *zona glomerulosa*; ZF: *zona fasciculata*. ***, p<0,001.

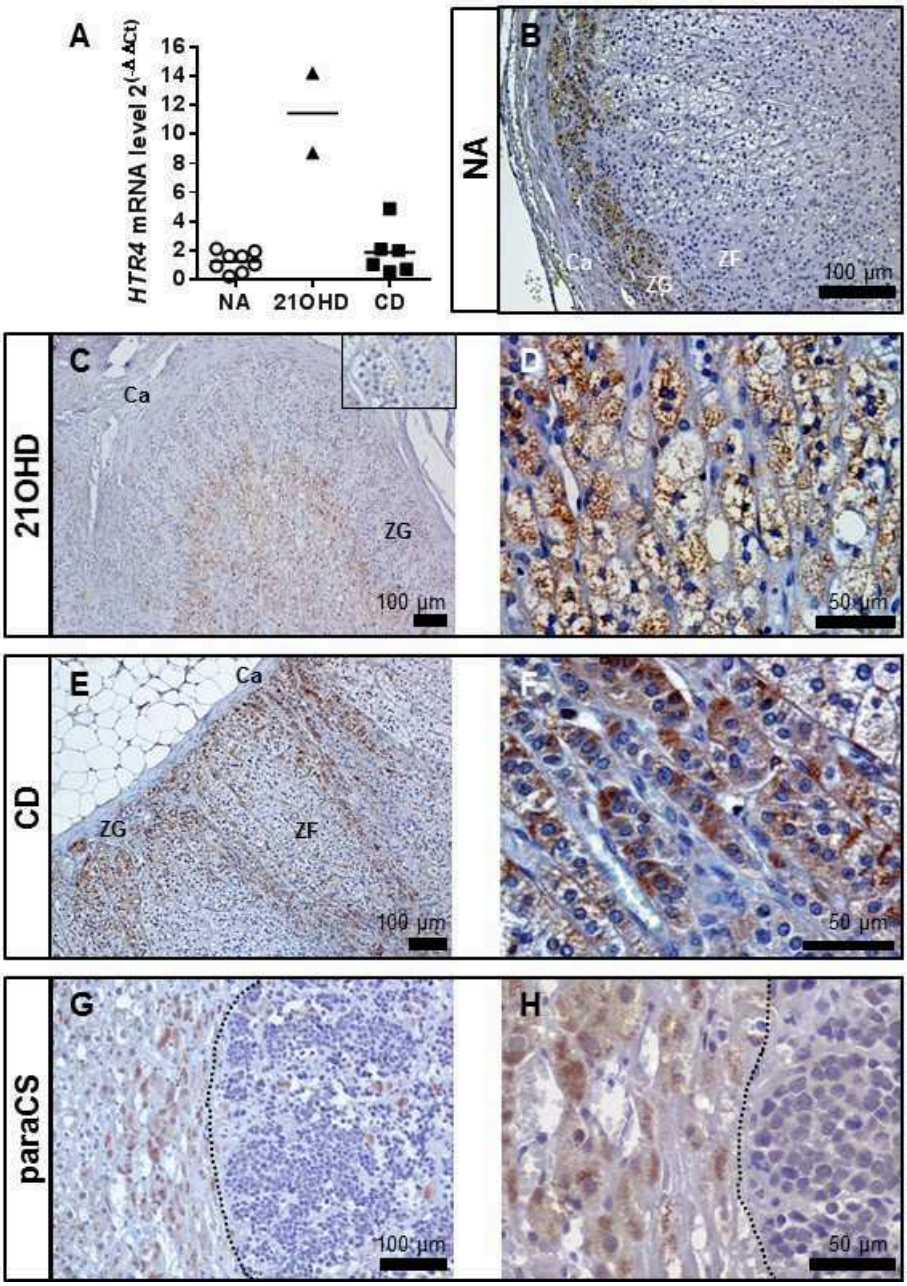


Figure 2. Expression of type 4 serotonergic receptor in the adrenal tissues. (A) Expression levels of *HTR4* mRNA in NA, 21-OHD and CD tissues. (B-H) Representative microphotographs showing the distributions of 5-HT4 immunoreactivities in NA (B), 21-OHD (C,D; patient 2), CD (E,F; patient 7) and paraCS (G,H; patient 20) samples. For all patients, immunostaining is principally visualized in spongiocytic cells, both at the cytoplasmic and membrane levels. Infiltration of the paraCS tissue by metastatic cells (G,H) is seen on the right side of the dotted line. Ca: capsule; ZG: *zona glomerulosa*; ZF: *zona fasciculata*.

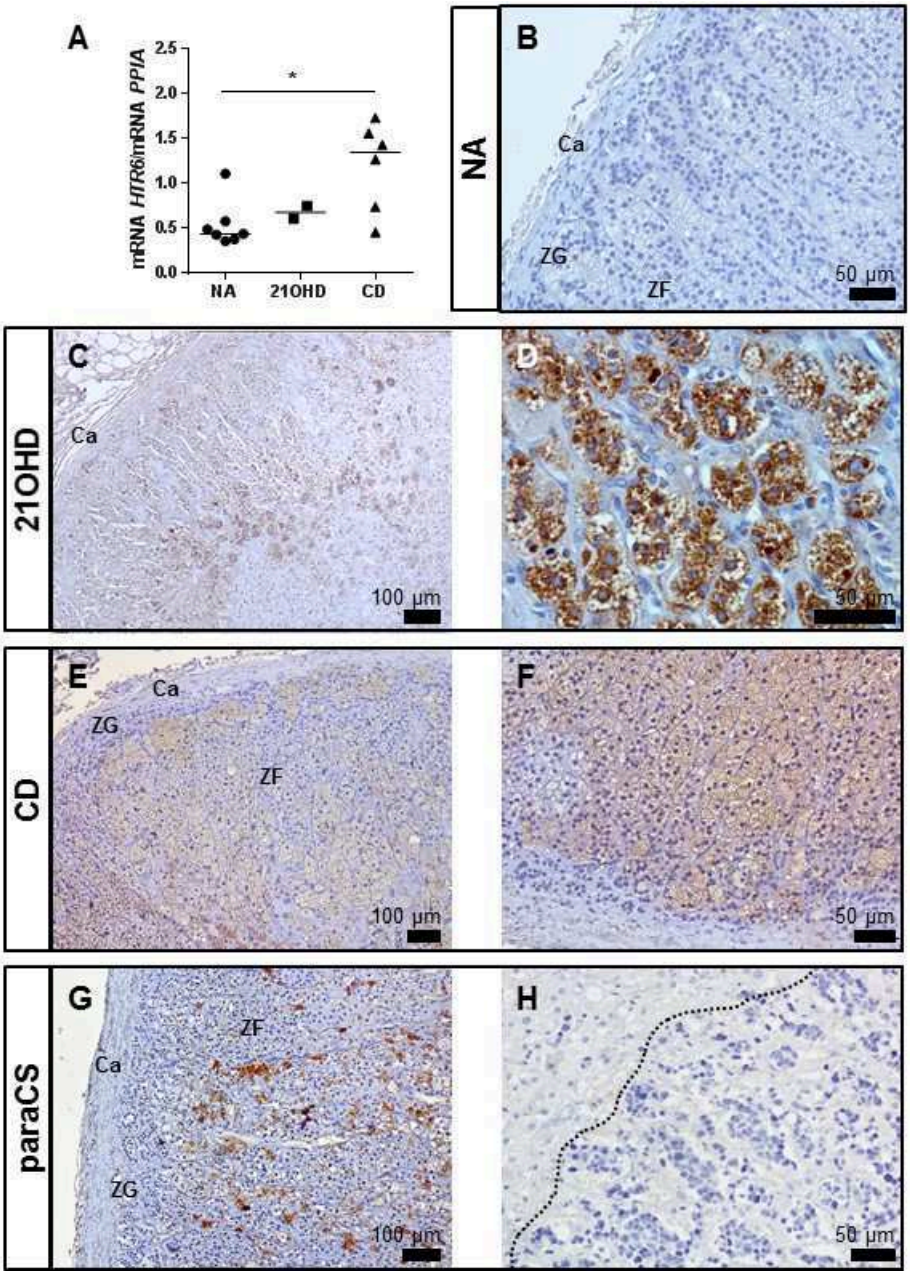


Figure 3. Expression of type 6 serotonergic receptor in the adrenal tissues. (A) Expression levels of *HTR6* mRNA in NA, 21-OHD and CD tissues. (B-H) Representative microphotographs showing the distributions of 5-HT6 immunoreactivities in NA (B), 21-OHD (C,D; patient 2), CD (E,F; patient 16) and paraCS (G, patient 19; H, patient 20) samples. For all patients, immunostaining is principally visualized in spongiocytic cells, both at the cytoplasmic and membrane levels. Infiltration of the paraCS tissue by metastatic cells (H) is seen on the right side of the dotted line. Ca: capsule; ZG: *zona glomerulosa*; ZF: *zona fasciculata*.*, $p<0,05$.

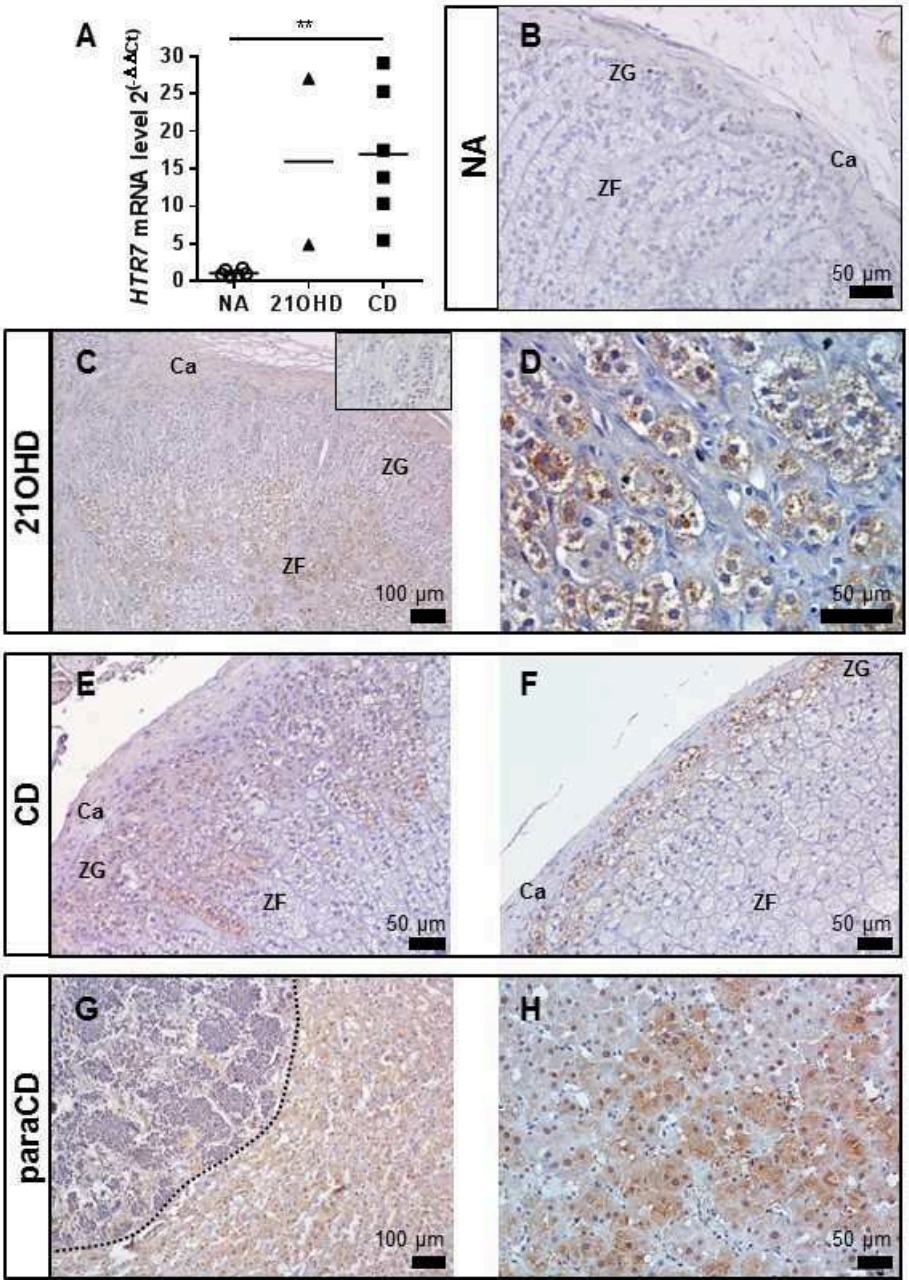


Figure 4. Expression of type 7 serotonergic receptor in the adrenal tissues. (A) Expression levels of *HTR7* mRNA in NA, 21-OHD and CD tissues. (B-H) Representative microphotographs showing the distributions of 5-HT7 immunoreactivities in NA (B), 21-OHD (C,D; patient 2), CD (E, patient 16 ; F, patient 11) and paraCS (G,H; patient 20) samples. For all patients, immunostaining is principally visualized in spongiocytic cells, both at the cytoplasmic and membrane levels. Infiltration of the paraCS tissue by metastatic cells (G) is seen on the left side of the dotted line. Ca: capsule; ZG: *zona glomerulosa*; ZF: *zona fasciculata*. **, p<0,01.

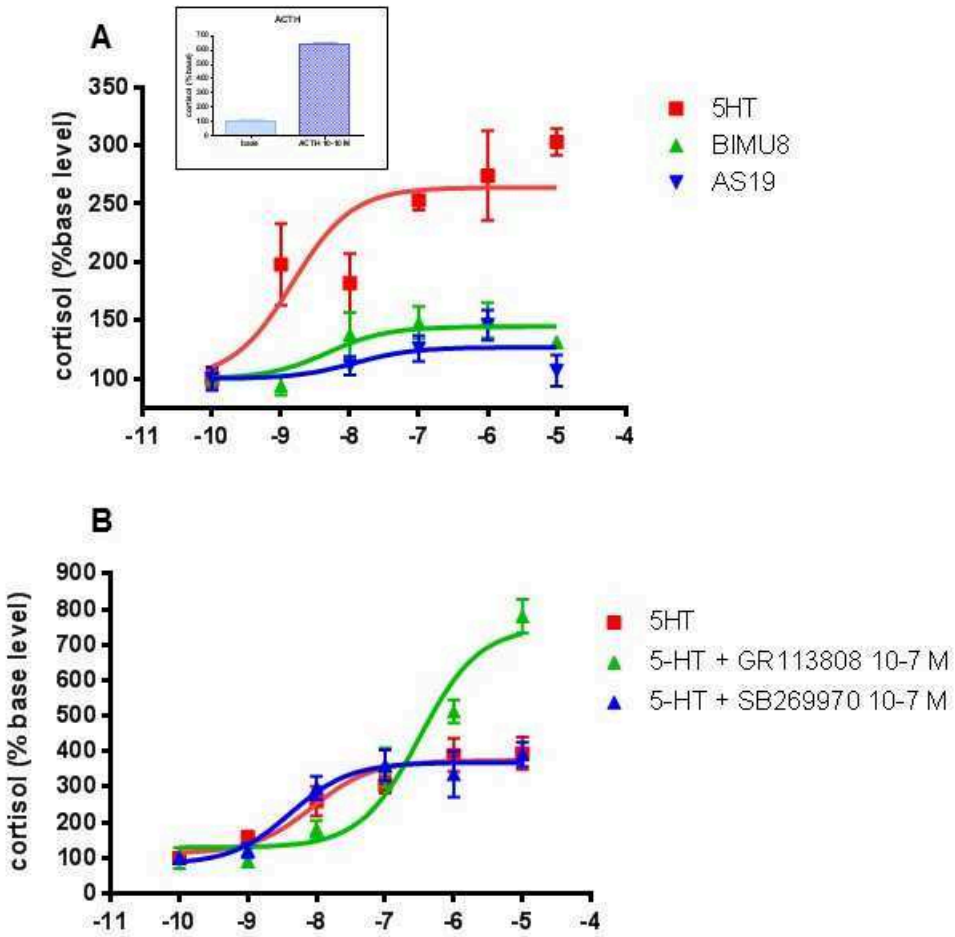


Figure 5. Effects of 5-HT and diverse synthetic 5-HT receptor ligands on cortisol production from a paraCS adrenal sample. (A) Cultured adrenocortical cells derived from patient 20 were incubated with increasing concentrations of 5-HT, the 5-HT4R agonist BIMU8 and the 5-HT7R agonist AS-19. Inset, cells were also incubated with ACTH (control). (B) In addition, the action of 5-HT was examined in the absence or presence of the 5-HT4R antagonists GR113808 and the 5-HT7R antagonist SB269970.

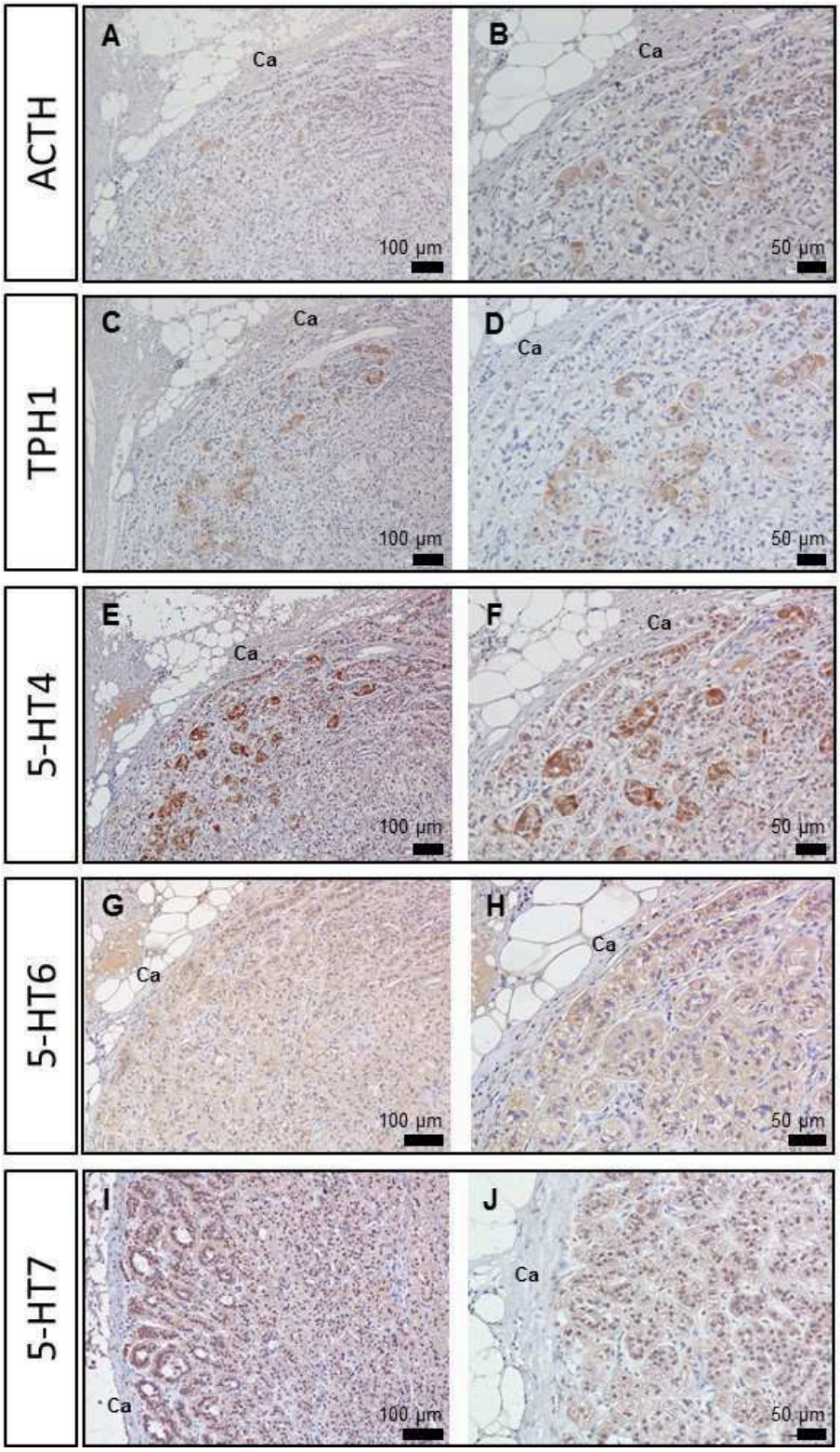


Figure 6. Immunohistochemical detection of ACTH and the 5-HT signaling pathway in BMAH tissues. Representative microphotographs showing the distribution of ACTH (A,B; patient 22), TPH1 (C,D; patient 22), 5-HT4R (E,F; patient 22), 5-HT6R (G,H; patient 22) and 5-HT7R (I, patient 25; J, patient 23) stainings in the BMAH tissues. Ca: capsule.

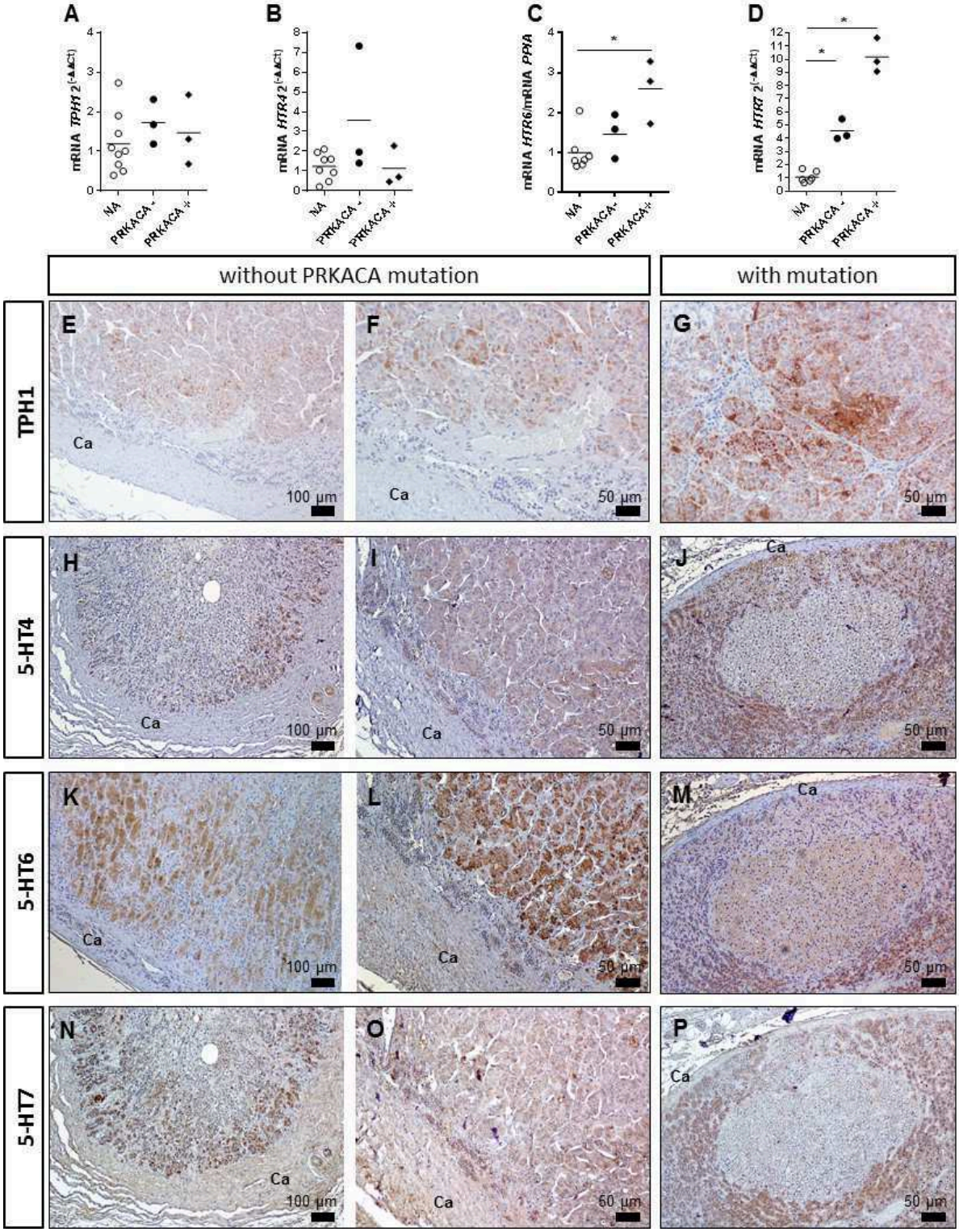


Figure 7. Expression of tryptophan hydroxylase type 1 and 5-HT4, 5-HT6 and 5-HT7 receptors in CPA tissues. Expression levels of *TPH1* (A), *HTR4* (B), *HTR6* (C) and *HTR7* (D) mRNA in NA, 21-OHD and CD tissues. (E-P) Representative microphotographs showing the distributions of TPH1 (E,F, patient 28; G, patient 34) and 5-HT4 (H, I, patient 28; J, patient 31), 5-HT6 (K, patient 27; L, patient 28; M, patient 31) and 5-HT7 (N,O, patient 28; P, patient 31) receptors in adrenocortisol-producing adenomas without or with *PRKACA* mutation. Ca: capsule. *, p<0,05.

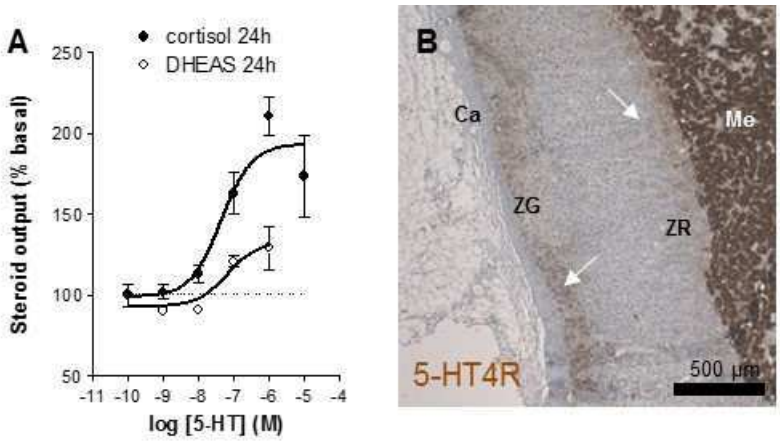


Figure 8. Effect of 5-HT on androgen secretion from the normal adrenal gland. (A) Action of increasing concentrations of 5-HT on DHEAS production from cultured normal adrenocortical cells. (B) Immunohistochemical detection of the 5-HT4R in NA. 5-HT4R immunoreactivity is visualized in both *zona glomerulosa* (ZG), *zona reticularis* (ZR) and the medulla (Me). Ca: capsule.

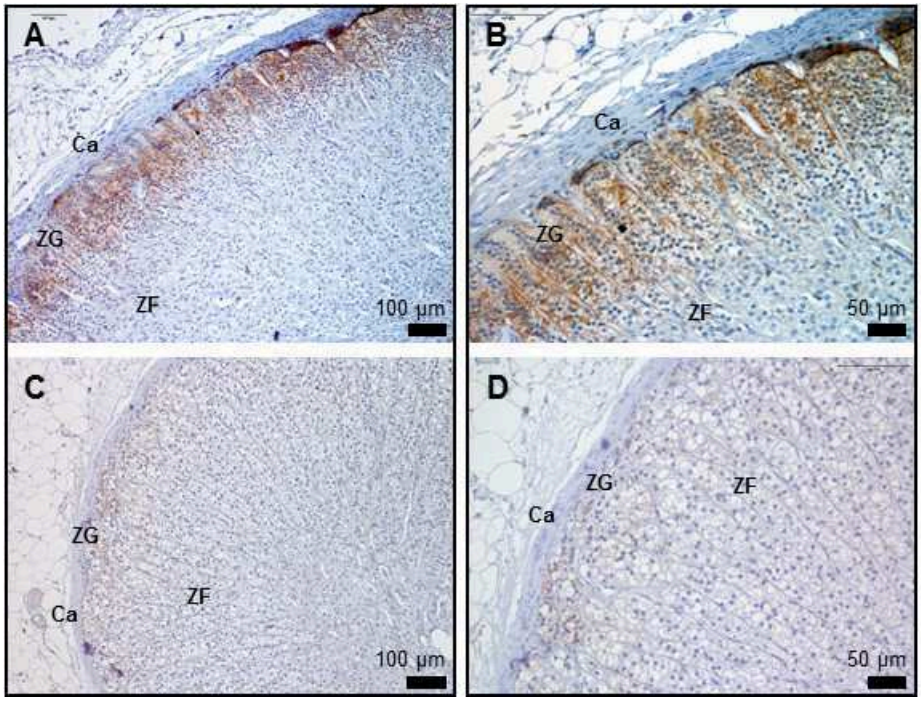


Figure S1. Immunohistochemical detection of the *zona glomerulosa* (ZG) marker DAB2 in the adrenocortical tissues removed from patient 1 with 21-OHD (A,B) and patient 17 with CD (C,D). Ca: capsule, ZG: *zona glomerulosa*, ZF: *zona fasciculata*.

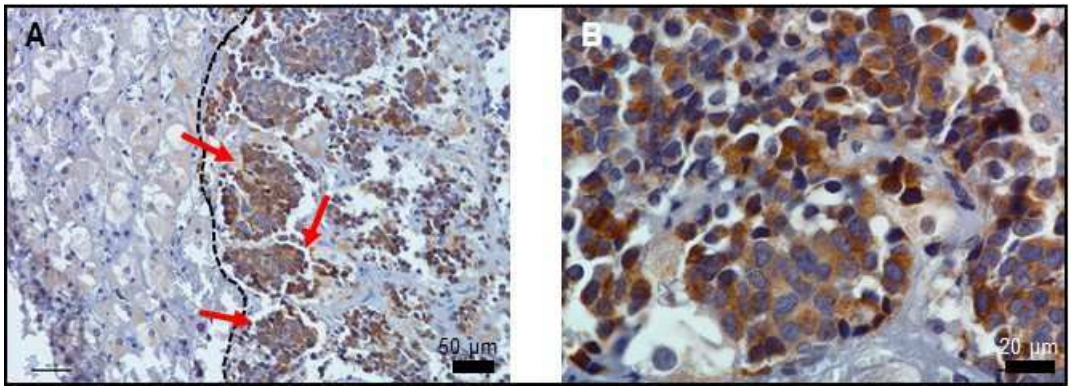


Figure S2. Distribution of ACTH immunoreactivity in the adrenocortical tissue of a patient with paraCS (patient 20). (A) The adrenal cortex is invaded by metastatic ACTH-positive cells (red arrows). (B) Higher magnification view of a cluster of ACTH-positive cells.

Patient	Sex	Age (date of surgery)	BMI	Clinical presentation : Classical (salt wasting, SW ; Simple Virilizing, SV), Non classical (NC)	Genotype	Plasma 17-OHP	Plasma Δ4-ad	Plasma testosterone	Plasma renin	Plasma ACTH	Hydrocortisone (mg/day)	Fludrocortisone (µg/day)	Adrenal size at CT-scan	Indication of adrenalectomy
1	F	7	23	SV	V281L (ISV2-13A/C->G intron 2). I172N dans exon 4	128 ng/ml (N<1)	3,4 ng/ml (N<0.45)	2,41 ng/ml (N<0.3)	12 ng/ml (N: 7-40)	13 pg/ml (N: 10-48)	20 puis Dectancyl 0,5 mg	50	L: 38x11 mm R:	Virilization, accelerated bone age
2	M	48	24	SV	p.Ile172Asn (c.515T>A) hémizygote	72 ng/ml (N<2)	n.d.	2,18 ng/ml (N: 3-9)	101 ng/ml (N: 7-40)	29 pg/ml (N: 10-48)	0	0	L: 15x **?** mm R: 55x48 mm	Large renal tumor requiring left expended nephrectomy. Suspicion of right adrenal metastasis
3	F	34	27	SW	I172/V281L/ L307H/I172N/ I236N/V237E/ M239K	118	9.7	2.1 ng/ml	35	17	30	50	4 left nodules 22x15, 14x12, 25x13, 16 mm 1 right nodule 32x37	Yes
4	M	43	31.2	SW	n.d.	8 am before hydrocortisone 505.9 nmol/L (N<8.5)	n.d.	8 am before hydrocortisone 18.2 nmol/L (N 8.2-34.6) (LH<0.3 mUI/l FSH<0.2 mUI/l)	Upright 8 am before hydrocortisone 93.2 ng/l (N 2-59)	8 am before hydrocortisone 201.3 pmol/L (N 2-13)	25	100	Left adrenal 90x38x51mm Right Adrenal : 46x62x22 mm	High density at CT scan without injection (30 UH) of left adrenal, suspect
5	M	39	29	SW		625.8 nmol/L (N: 1.1-6.9)	198.1 nmol/L (N: 2.89-5.93)	44.7 nmol/L (N: 12-32)	54.5 pg/ml (N: 3-33)	8 am: 666.8 pg/ml (N: 9-52)			left adrenal : 242 gr, nodules righ adrenal : 108 gr, nodules	

Table 1.1. Clinical, biological and genetic characteristics of the patients with 21-OHD. n.d.: no data.

Patient	Sex	Age (yr)	Plasma ACTH 0800h (pg/ml)	Plasma cortisol 0800h (µg/l) (N: 90-308)	Plasma cortisol 2000h or late night (µg/l)	Urinary cortisol (µg/d) (N<80)	ACTH-producing neoplasia	Size of adrenal glands at CT scan (cm) (left, right)	Plasma ACTH response to CRH testing (% from basal level)	Plasma cortisol response to CRH testing (% from basal level)	Plasma cortisol level after low dose dexamethasone suppression test (mg/l)	Cortisol response to high dose Dexamethasone suppression test (% from basal level)	Preoperative treatment of hypercortisolism	Antihypertensive treatment
6	M	79	100 pg/ml	745 nmol/l (N: 250-850)	750 nmol/l à minuit	1432 nmol/24h (n: 55-220)	pituitary	L: 29x24 mm R: 30x15 mm	79%	29%	P: 632 nmol/l CLU: 891 nmol/24h	n.d.	Mifepristone	atenolol, spironolactone, amlodipine, candésartan
7	F	54	25 pg/ml (N:7-63)	767 nmol/l	727 nmol/l	3439 nmol/24h (N: 100-380)	pituitary	L: 43x16 mm R: 38x14 mm	55%	55%	698 nmol/l (1 mg)	P: - 42% CLU: - 73%	Mitotane	propanolol, spironolactone, perindopril, rilménidine, amlodipine
8	F	41	91 pg/ml	778 mol/l (n: 250-850)	407 nmol/l	425 nmol/24h (N: 55-220)	pituitary	L: 21x24 mm R: 35x15mm	n.d.	n.d.	P: 172 nmol/l CLU: 86/24h	n.d.	Pasireotide	irbésartan
9	M	64	192 pg/ml (N: 10-48)	2122 nmol/l	2177 nmol/l	42500 nmol/24h (N<220)	pituitary	L: 36x26 mm R: 33x11 mm	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	KTCNZ	perindopril, spironolactone
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16	F	37	100	280	120	300	pituitary	L : 15x2 R : 15x2	120%	43%	PL 150 CLU 130	PL 115 CLU 100	mitotane	sotalol
17	F	16	40	220	180	336	pituitary	L : 20x6 R : 18x5	n.d.	n.d.	PL 180 CLU 95	PL 200 CLU 160	0	0
18	F	47	92	180	160	880	pituitary	normal size	n.d.	n.d.	PL 210 CLU 800	PL 180 CLU 400	cabergoline	0
19	M	25	310	460	250	1390	bronchial carcinoid	normal size	0%	0%	n.d.	PL 190 CLU 400	kétoconazole	0
20	M	18	73	844	757	18567	Carcinome NE pancréas	n.d.	103%	102%	n.d.	n.d.	Ketoconazole Métopirone	Aldactone, Loxen
21	M	66												

Table 1.2. Clinical, biological and genetic characteristics of the patients with CD (6-18) or paraCS (19-21). n.d.: no data.

Patient	Sex	Age (yr)	Plasma ACTH 0800h (pg/ml)	Plasma cortisol 0800h (µg/l) (N: 90-308)	Plasma cortisol 2000h or late night (µg/l)	Urinary cortisol (µg/d) (N<80)	Size of adrenal glands at CT scan (cm) (left, right)	Plasma ACTH response to CRH testing (% from basal level)	Plasma cortisol response to CRH testing (% from basal level)	Plasma cortisol level after low dose dexamethasone suppression test (mg/l)	Cortisol response to high dose dexamethasone suppression test (% from basal level)	Preoperative treatment of hypercortisolism	Antihypertensive treatment
22													
23													
24	M	73	<5		520	CLU 437,7 nmol/24h		<5				ketoconazole, hydrocortisone	amlodipine
25	F	50	9	685 nmol/l	233 nmol/l	CLU 109 nmol/24h (N<105)					242 nmol/l	no	amlodipine
26	F	44	<3	112 nmol/l	275 nmol/l	CLU 781 nmol/24h (N<180)	L: 65x3x25 mm R:			117 nmol/l			
27	F	33	<5	18 & 17. 9	18.3 & 19.6	283 & 262	L 22 x 18mm tumor R	<5	17.6 - >18.4=4.5%	n.d.	18->23.7= 31%	no	no
28	F	66	<5	13.4 & 13	14.4 & 14.7	130 & 150	L R- 2cm tumor	n.d.	n.d.	13	n.d.	no	no
29	F	52	<5 (pg/mL)	11.9 & 11.9 (mcg/dL)	11.7 & 13.4 (mcg/dL)	31.4 (mcg/24h)	L - 2.1cm tumor R	<5 <5 <5 <5 - 5.4	10.6->11.2=5.6%	n.d.	11.7-> 15.9 = 35% increase (mcg/dL)	no	no
30	F	62	<5	14.5 & 16.6	14.8 & 15.3	87.2	L 3.4 x 2.3 cm tumor R	n.d.	n.d.	Liddle's 9.5->10.8=13.6%	**8mg on DEX** 9.4 -> 9.8 = 4% increase **Liddle's –** 9.5->12 .9 = 36% increase	no	no
31	F	29	n.d.	18.1 & 18.8	19.6 & 21.3	371	L 2 x 3 cm R	n.d.	n.d.	Liddle's 18.1-> 22.3=23%	Liddle's 18.1-> 20.8=15%	no	no
32	F	41	6.2	6.5 (mcg/dl)	8.7(mcg/dl)	38.8 mcg/24 hr (8-77)	L (-) R 9 mm tumor	From 24 to 56	From 22 to 32	8.5	6.1	no	no
33	F	55	<5.0	16.3(mcg/dl)	15.1 (mcg/dl)	136 mcg/24 hr (8-77)	L 3.5 cm tumor R (-)	< 5.0 (remain the same during testing)	From 16.4 to 15.5	17.2	16.5	no	Amlodipine Lisinopril Hydrochlorothiazide
34	F	42	<5.0	6.8(mcg/dl)	6.9	9.7 (3.5 -45 mcg/24h)	L 2.5 cm tumor R (-)	From <5 to 23.6	From 7.8 to 11.5	8.2	9.1	no	no

Table 1.3. Clinical, biological and genetic characteristics of the patients with BMAH (22-26) or CPA (27-34). n.d.: no data.

patient	disease	IHC	RT-PCR	primary cell culture
1	21-OHD	x	x	
2	21-OHD	x	x	
3	21-OHD	x		
4	21-OHD	x		
5	21-OHD	x		
6	CD	x		
7	CD	x		
8	CD	x		
9	CD	x		
10	CD	x	x	
11	CD	x	x	
12	CD	x	x	
13	CD	x	x	
14	CD	x	x	
15	CD	x	x	
16	CD	x		
17	CD	x		
18	CD	x		
19	paraCS	x		
20	paraCS	x		x
21	paraCS	x		
22	BMAH	x		
23	BMAH	x		
24	BMAH	x		
25	BMAH	x		
26	BMAH	x		
27	CPA PRKACA -	x	x	
28	CPA PRKACA -	x		
29	CPA PRKACA -	x	x	
30	CPA PRKACA -	x	x	
31	CPA PRKACA +	x	x	
32	CPA PRKACA +	x	x	
33	CPA PRKACA +	x		
34	CPA PRKACA +	x	x	

Table 2. Experimental approaches carried out in adrenal tissues.

Gene	Primers	Sequence (5'- 3')	Accession number	Product size (bp)
PPIA	forward	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	NM_001300981.1 NM_021130.4	241
	reverse	TTGCCATTCCTGGACCCAAA		
HTR4	forward	CTGTGGTGGCCTTCTACATCCC	NM_000870.6 (b) NM_001286410.1 (c) NM_001040173.2 (i) NM_001040172.2 (d) NM_001040169.2 (a) NM_199453.3 (g)	199
	reverse	ATGCACAGGGTCTTGGCTGC		
HTR6	forward	GGGTGCCATATGCTTCACCT	NM_000871.2	150
	reverse	TCAGCAGACTCCACCCCTG		
HTR7	forward	AAAACATCTCCATCTTTAAGCGAGAA	NM_019860.3 (b) NM_019859.3 (d) NM_000872.4 (a)	70
	reverse	GTAAAGGCCCCGACGATGAT		
TPH1	forward	TGCAAAGGAGAAGATGAGAGAATTTAC	NM_004179.2	114
	reverse	CTGGTTATGCTCTTGGTGTCTTTC		
TPH2	forward	GCCTTTCCTCTGTGTTCATTAG	NM_173353.3	186
	reverse	TCATTCCAACTGCTGTGTTACC		

Table 3. Sequences and Genebank accession numbers of primers used for real-time RT-PCR

Antibodies	Abbreviation	Host	Type	Antigen retrieval	Dilution	Supplier
serotonin	5-HT	rabbit	polyclonal	citrate buffer	1/40	Serotec AHP522
human 5-hydroxytryptamine receptor 4	5-HT4	rabbit	polyclonal	citrate buffer	25 µg/ml	LS BIO LS-A2685
human 5-hydroxytryptamine receptor 4	5-HT4	rabbit	polyclonal	citrate buffer/ EDTA	1/250	Interchim bs-12054R
human 5-hydroxytryptamine receptor 6	5-HT6	rabbit	polyclonal	citrate buffer	1/1200	Abcam ab101911
human 5-hydroxytryptamine receptor 7	5-HT7	rabbit	polyclonal	no antigen retrieval	1/100	Sigma-Aldrich S0320
Human tryptophane hydroxylase 1	TPH1	rabbit	polyclonal	citrate buffer	1/50	Sigma-Aldrich HPA022483
human adrenocorticotropin hormone	ACTH	rabbit	polyclonal	citrate buffer	1/100	Acris AP15336PU
human disabled-2 protein	DAB2	rabbit	polyclonal	citrate buffer	1/200	Santa Cruz sc-13982

Table 4. Antibodies used for immunochemistry studies

patient	disease	TPH1	5-HT4	5-HT6	5-HT7
1	21-OHD	2	1	1	0
2	21-OHD	2	2	3	2
3	21-OHD	1	2	2	3
4	21-OHD	0	3	2	2
5	21-OHD	2	3	3	2
6	CD	2	2	1	1
7	CD	3	3	1	2
8	CD	2	2	1	2
9	CD	3	2	2	1
10	CD	3	2	0	3
11	CD	2	2	0	2
12	CD	2	3	1	2
13	CD	2	2	1	3
14	CD	2	3	2	3
15	CD	3	2	1	2
16	CD	2	1	2	2
17	CD	2	2	2	2
18	CD	0	3	2	2
19	paraCS	1	2	2	2
20	paraCS	0	3	0	2
21	paraCS	n.d.	2	n.d.	n.d.
22	BMAH	2	3	2	2
23	BMAH	2	3	2	3
24	BMAH	3	3	2	3
25	BMAH	2	3	2	3
26	BMAH	3	2	2	3
27	CPA PRKACA -	2	2	3	3
28	CPA PRKACA -	2	2	3	2
29	CPA PRKACA -	2	2	2	3
30	CPA PRKACA -	2	2	3	3
31	CPA PRKACA +	2	2	2	2
32	CPA PRKACA +	0	1	2	1
33	CPA PRKACA +	2	2	3	2
34	CPA PRKACA +	3	3	3	3

Table 5. Quantification of immunohistochemical stainings in adrenal tissues. 0: no staining, 1:weak, 2:moderate, 3:strong staining.

Article 2 : **L'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes favorise l'expression du récepteur à l'hormone lutéinisante.**

Julie Le Mestre, Michaël Thomas, Céline Duparc, Pierre Val, Clémence Bures, Jean-Jacques Tuech, Françoise Gobet, Stéphanie Baert-Desurmont, Hervé Lefebvre et Estelle Louiset.

Article en préparation

Résumé. Les adénomes et les hyperplasies cortisolo-sécrétrices expriment des récepteurs membranaires illégitimes tels que le récepteur de la LH/hCG (LH-R) ou les récepteurs sérotoninergiques de types 4 et 7 (5-$HT_{4/7}$). Dans la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (*primary pigmented nodular adrenocortical disease* ; PPNAD), l'activation de la voie de signalisation AMPc/protéine kinase A (PKA), déclenchée par des mutations génétiques, conduit à l'expression illicite de récepteurs sérotoninergiques (Bram *et al.*, 2016). Les mutations somatiques activatrices de la voie Wnt/β-caténine pourraient également favoriser l'expression de récepteurs illégitimes, comme le LH-R, dans les adénomes produisant de l'aldostérone (Teo *et al.*, 2015). Notre étude avait pour but de déterminer si l'activation de la voie Wnt/β-caténine pouvait être responsable de l'émergence de récepteurs illégitimes.

L'expression de récepteurs illégitimes a été étudiée dans une tumeur productrice de cortisol provenant d'un patient avec polypose adénomateuse familiale (*familial adenomatous polyposis* ; FAP) causée par une mutation du gène *APC* et dans deux modèles de cellules corticosurrénaliennes surexprimant la β-caténine ; des cellules corticosurrénaliennes humaines transfectées et des souris présentant une activation constitutive de la voie β-caténine dans le cortex surrénalien, par PCR quantitative, immunohistochimie et dosage de la sécrétion de cortisol par les cellules en culture.

L'expression illégitime de récepteurs de la LH/hCG, du peptide insulinotrope dépendant du glucose (*gastric-inhibitory peptide* ; GIP) et du 5-HT_7 a été observée dans la tumeur du patient. Par ailleurs, la stimulation avec l'hCG, le GIP et la 5-HT augmente la production de cortisol par les cellules de la tumeur en culture primaire. Enfin, une élévation de l'expression du gène codant le LH-R a été mise en évidence dans les cellules cortisurrénaliennes humaines et murines surexprimant la β-caténine.

Ces données suggèrent que l'activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine peut favoriser l'expression de récepteurs à la LH/hCG fonctionnels dans les adénomes produisant du cortisol.

Activation of the β-catenin pathway favors expression of the luteinizing hormone receptor in adrenocortical cells

Julie Le Mestre[1], Michaël Thomas[1], Céline Duparc[1], Pierre Val[2], Clémence Bures[3], Jean-Jacques Tuech[4], Françoise Gobet[5], Stéphanie Baert-Desurmont[6], Hervé Lefebvre[1,7] and Estelle Louiset[1].

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, F76000 Rouen, France. [2]CNRS, UMR 6293, GReD, Inserm U1103, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France. [3]Department of Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases, Groupe Hospitalier du Havre, Montivilliers, France. [4]Rouen University Hospital, Department of Digestive Surgery, [5]Rouen University Hospital, Department of Pathology, [6]Rouen University Hospital, Department of Genetics, and [7]Rouen University Hospital, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, F76000 Rouen, France.

Short title: Illicit expression of LH-R in adrenocortical cells

Keywords: Adrenal adenoma, Familial adenomatous polyposis, Wnt/*β*-catenin pathway, illegitimate membrane receptors, Cortisol, *APC* mutation

Address all correspondence and reprint requests to Dr. Hervé Lefebvre, INSERM U1239, Department of Endocrinology, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University Hospital of Rouen, 76031 Rouen cedex, France. Tel.: (33) 232 88 90 81; e-mail: herve.lefebvre@chu-rouen.fr

Acknowledgments:

The authors are truly grateful to the patient who offered his adrenal for study in the hope that doing so might benefit other patients in the future.

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1239, the Institute for Research and Innovation in Biomedicine, Rouen University Hospital, Société Française d'Endocrinologie and the Conseil Régional de Normandie.

Author contributions: M.T., P.V., H.L. and E.L., conceived and designed research; J.L.M., M.T., C.D., P.V., F.G., and E.L. performed the experiments; J.J.T. and M.L.R. facilitated sample collection; C.B., M.L.R., S.B.-D. and H.L. collected clinical, biological, histological and genetic data for the patient; S.B.-D. performed genetic typing of the patient; J.L.M., M.T., P.V., H.L., and E.L. analyzed data; H.L., E.L., J.L.M. and M.T. wrote the paper.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

Abstract

Context: Adrenal cortisol-producing hyperplasias and adenomas express illicit membrane receptors such as LH/hCG receptor (LH-R) or types 4 and 7 serotonin receptors (5-$HT_{4/7}$). In primary pigmented nodular adrenocortical disease, activation of the cAMP/protein kinase A (PKA) signaling pathway triggered by the causative genetic defects leads to expression of illicit serotonergic receptors. Somatic β-catenin activating mutations in two aldosterone-producing adenomas expressing LH-R have suggested that activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway may also favor expression of illicit receptors.

Objective: To test whether activation of the β-catenin signaling pathway causes expression of illicit receptors in adrenocortical cells.

Design: Illegitimate expression of receptors was investigated in an adrenocortical tumor removed from a patient with *APC* mutation, and two models of adrenocortical cells overexpressing β-catenin, human transfected adrenocortical cells and genetically modified mice, by using RT-qPCR, immunohistochemistry and measurement of cortisol secretion by cultured cells.

Results: Illegitimate expression of the LH/hCG, glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) and 5-HT_7 receptors was observed in the tumor tissue. In addition, hCG, GIP and 5-HT stimulated cortisol production from tumor cell in primary culture. LH-R mRNA was upregulated in human and mouse adrenocortical cells overexpressing β-catenin.

Conclusion: Our data demonstrated that activation of the β-catenin signaling pathway promotes illicit expression of functional LH/hCG receptors in adrenocortical cells but does not initiate synthesis of other receptors.

Introduction

Cortisol-producing adrenocortical neoplasms frequently overexpress membrane receptors whose activation stimulates cAMP formation and cortisol hypersecretion inducing plasma ACTH suppression. The most commonly reported of these so-called illegitimate receptors include those for vasopressin, serotonin (5-HT), LH/hCG and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) (1). The mechanisms underlying abnormal expression of membrane receptors are still a matter a debate. Chromosome 19 microduplications including the GIP receptor locus have been reported in two cases of adrenocortical lesions responsible for GIP-dependent hypercortisolism (2). Moreover, cortisol-producing adenomas have been shown to carry somatic mutations (*PRKACA*, *PRKACB, PDE11A* or *PDE8B*) enhancing the cAMP/protein kinase A signaling pathway which are involved in the pathogenesis of glucocorticoid hypersecretion (3,4). It can be speculated that these activating mutations may also favor expression of illegitimate receptors, as shown for the serotonergic receptors 5-HT4, 5-HT6 and 5-HT7 in *PRKAR1A*-mutated primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) (5), suggesting a causative link between mutational events and occurrence of illicit receptors.

The Wnt/β-catenin signaling pathway refers to the signal generated by Wnt ligand on frizzled receptors that leads to activation of β-catenin and therefore transcription of β-catenin target genes (6). In the absence of Wnt ligand, β-catenin is phosphorylated by GSK3-β bound to a scaffolding complex of axin and adenomatous polyposis coli (APC). Phosphorylated β-catenin is then degraded by the ubiquitin-proteasome system. Activation of frizzled receptors provokes inactivation of GSK3-β and subsequently accumulation of β-catenin in the cytoplasm and its translocation into nucleus. Alternatively, intense activation of this signaling pathway can result from mutations in *APC* in familial adenomatous polyposis (FAP), or mutations in *CTNNB1* (encoding β-catenin) preventing β-catenin phosphorylation (6–8). In both cases, nucleo-cytoplasmic accumulation of β-catenin induces constitutive expression of β-catenin target genes and formation of different types of tumors, including colonic and adrenocortical neoplasms (7–10). It has been recently suggested that the occurrence of somatic β-catenin activating mutations is associated with abnormal expression of LH and GnRH receptors in aldosterone-producing adenomas (APA) responsible for primary aldosteronism which appears during pregnancy and after menopause (11,12). However, these observations have not been confirmed in a retrospective study of a large series of APAs (13). Nevertheless, the possibility that germline and/or somatic genetic events inducing activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway may

favor abnormal expression of membrane receptors remains controversial. To address this issue, we have first looked for the presence of illegitimate receptors in an adrenocortical tumor harboring activation of β-catenin signaling pathway due to germline *APC* mutation and found abnormal expression of the GIP, LH and 5-HT type 7 (5-HT7) receptors. These findings encouraged us to investigate expression of these receptors in two models of constitutive stimulation of β-catenin: *i*) normal human adrenocortical cells transfected to overexpress *CTNNB1,* and *ii*) genetically-modified mice exhibiting targeted adrenocortical activation of the β-catenin pathway.

Subjects and Methods

Patient report

A 27-year old man with FAP due to mutation of *APC* gene (NM_000038.5) c.3183_3187del, p.(Gln1062*) was referred to our endocrine department for an incidentally discovered adrenal tumor. A recent colonoscopy had shown the presence of 20 rectal and around 100 colonic polyps prompting us to recommend preventive proctocolectomy. The manifestations of FAP also included hypertrophy of the retinal pigment epithelium. An abdominal CT-scan, performed as a preoperative exploration, revealed the presence of a 28-mm heterogeneous left adrenal mass exhibiting spontaneous densities ranging from 5 to 45 UH (Supplemental Fig. 1A). The right adrenal gland appeared normal without significant hypertrophy. Clinical investigation showed no sign of steroid or catecholamine excess (Supplemental Table 1). Owing to the heterogeneity of the adrenal mass which hampers further radiological characterization (14), the absence of bilateral adrenal hyperplasia and the previously reported occurrence of adrenocortical carcinoma (ACC) in the context of FAP (9), it was decided to perform left adrenalectomy at the same time as proctocolectomy. Macroscopically, the adrenocortical tumor presented as a unique nodule without any evidence of peripheral adrenal hyperplasia (Supplemental Fig. 1B). Histologically, the lesion contained compact cells and a weak proportion of spongiocytic cells (<25%; Supplemental Fig. 1C & D), and was classified as a benign adenoma on the basis of low Weiss and Ki67 scores (1 and 1%, respectively).

Human adrenal tissues processing

The patient's adrenal tumor and normal adrenal glands from 9 patients undergoing expanded nephrectomy for kidney cancer and 4 brain-dead organ donors were obtained at surgery and

immediately dissected by the pathologist. Adrenal explants were immersed in culture medium until cell dissociation, frozen for RT-PCR analysis, or fixed in formalin for histological study.

The protocol of collection of the tissues and the experimental procedures were approved by the French National Biomedicine Agency (Agence de Biomédecine) and the regional ethics committee. Written informed consents were obtained from all subjects or patients' closest relatives.

Human adrenocortical cell culture

Adrenocortical adenoma cells from the patient with *APC* mutation and normal adrenocortical cells from brain-dead organ donors were isolated as previously described (15). Dispersed cells were cultured at a density of 10^6 cells/ml in culture medium (50% DMEM, 50% Ham–F12; Gibco) supplemented with 1% antibiotic–antimycotic solution, 1% insulin–transferrin–selenium solution (Gibco) and 5% fetal calf serum (Sigma–Aldrich) at 37°C in a 5% CO_2–95% air atmosphere with 100% relative humidity. The culture medium was changed 24h after plating for reducing fetal calf serum to 1% and to remove non-adherent chromaffin cells.

Hormone secretion

Adenoma cells cultured on 24-well plates were incubated with fresh DMEM (control) or DMEM with adrenocorticotropic hormone (ACTH 1–24), 5-HT, BIMU8, GR113808, SB269970 (Sigma-Aldrich), as well as human chorionic gonadotrophin (hCG, Organon) or GIP (Bachem). Incubation experiments were conducted in quadruplicate at 37°C for 24h. Cell culture supernatants were collected and stored at -20°C until hormone assay. Cortisol concentration in culture supernatants was measured using radioimmunoassay procedure (RIA) using specific antibodies (16) and tritiated steroid hormones (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). RIA sensitivity was 150 pg/mL. Cross-reactivity of cortisol antibodies was <0.001% for aldosterone, <0.004% for progesterone and 17-hydroxyprogesterone, <0.01% for deoxycorticosterone, <0.3% for cortisosterone, and <5% for deoxycortisol.

Transfection of normal human adrenocortical cells

The *β-catenin*^{S37A} cDNA previously inserted in pcDNA3 (gift from Pr. S.W. Byers) (17) was subcloned into MoMLV derived vector pL (Clontech, Palo Alto, CA), downstream of the immediate early cytomegalovirus promoter. pL-β-catenin^{S37A} (resistant to puromycin) construct and the corresponding empty retroviral vector were used to transfect the amphotropic packaging cell line PT67 (Clontech) using the Effecten Transfection Reagent (Life Technologies

Invitrogen). The cells underwent selection with 1 µg/ml puromycin for 3 days. After 24h incubation, the viral supernatant was collected and purified through a 0.45 µm syringe filter to obtain cell-free viruses for adrenocortical infection.

Primary human adrenocortical cells were plated in 10-cm collagen I-coated culture dishes. When the cellular density reached 30-40% confluence, cells were infected by a single retroviral suspension, pL-β-catenin^{S37A} or pL empty vector for 72 hours and selected with 0.8 µg/ml puromycin for 3 days to generate stable human cell lines.

Mouse model

Mice with constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex (ΔCat) and control animals were generated as previously described (18). RNAs were extracted from adrenals of 6 wild-type (WT) and 6 ΔCat females aged 10 months.

Real-time RT-PCR

RNAs were extracted from adrenocortical adenoma tissue of the patient, normal human adrenals derived from expanded nephrectomy (control samples), human adrenocortical cell cultures, and mouse adrenals by using Tri Reagent (Sigma–Aldrich) and purified on Nucleospin RNAII (Macherey–Nagel, Hoerdt, France). Human adrenal, testis, small intestine, hypothalamus, pancreas polyA mRNAs (Clontech, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France) were also used as control specimen. RNAs were converted into cDNA by using ImProm-II RT System (Promega). Real-time PCR amplifications were performed with SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystems) in a QuantStudio 3 System (Applied Biosystems) with specific primers (Supplemental Tables 2 and 3). Samples were analyzed in duplicates. Quantification of cDNAs in each sample was normalized to *PPIA* (cyclophilin) cDNAs. For cell cultures, gene expression was normalized to *PPIA* by using the average ΔCt value of the basal culture condition (ΔΔCt). The final fold expression changes were calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were performed on formalin fixed and deparaffinized tissue sections. After antigen retrieval, sections were then treated with peroxidase blocking reagent (Dako Corporation, Les Ulis, France) and successively incubated for 1 hour at room temperature with primary antibodies diluted in Zymed (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) (Supplemental Table 4) and anti-immunoglobulin streptavidin–biotin complex coupled to peroxidase. Immunoreactivities were revealed with diaminobenzidine (Dako Corporation). The

tissue sections were counterstained with hematoxylin Sigma–Aldrich) and examined on an Eclipse E600D microscope (Nikon). All images were obtained on PRIMACEN, the Cell Imaging Platform of Normandie, University of Rouen Normandie.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Relative changes were described as percentages of basal level (BL). Data were analyzed using the Prism 4 program (GraphPad Software, Inc.). Statistical significance was assessed by non-parametric Mann Whitney test or Bonferroni test after one-way ANOVA. Statistical significance between dose-response curves were analyzed by Two-way ANOVA. P values less than 0.05 were considered significant.

Results

Steroidogenic potency and activation of the β-catenin pathway in the adrenocortical adenoma associated with germline *APC* mutation

Immunohistochemical studies revealed that tumor cells were immunopositive for 17α- and 11β-hydroxylases (17α-OH and 11β-OH), two enzymes involved in cortisol synthesis, but immunonegative for aldosterone-synthase (Supplemental Fig. 2). Consistent with the expression pattern of steroidogenic enzymes, cultured adenoma cells released cortisol spontaneously and in response to ACTH (Supplemental Fig. 2). Intense nuclear β-catenin immunoreactivity in steroidogenic cells, together with overexpression of the β-catenin target genes *LEF1* and *AXIN2*, witnessed activation of the β-catenin pathway in the adenoma tissue (Fig. 1).

Expression of illegitimate receptors in the adrenocortical adenoma associated with germline *APC* mutation

We have searched for expression of different illegitimate receptors in the adrenocortical adenoma associated with germline *APC* mutation. RT-PCR analysis revealed that levels of *HTR4* mRNA, encoding the 5-HT4 receptor (5-HT4R), were quite similar in the adenoma sample and normal adrenal tissues (Fig. 2A). 5-HT4R immunoreactivity was detected in the subcapsular region of peritumoral tissue, as in normal adrenals (19), and in some compact cells of the adenoma (Fig. 2B). *HTR6* mRNA, encoding the 5-HT6R, was not detected both in the adenoma and normal adrenal tissues (data not shown). By contrast, *HTR7* mRNAs were present at higher levels in the adenoma than in normal adrenals (Fig. 2C). In addition, 5-HT7R immunoreactivity was observed both in spongiocytic and compact cells (Fig. 2D). Globally,

the distribution of 5-HT4 and 5-HT7 receptors was heterogeneous within the tumor tissue. We have then investigated the responsiveness of adenoma cells to 5-HT. 5-HT (10^{-9} to 10^{-5} M) increased cortisol secretion by cultured adenoma cells with higher efficacy than in normal adrenal cells (Fig. 2E). BIMU8, a 5-HT4R agonist, exerted a modest stimulatory effect on glucocorticoid synthesis (Fig. 2F). In addition, the 5-HT-induced cortisol production was weakly reduced by the 5-HT4R antagonist GR113808 but strongly inhibited by the 5-HT7R antagonist SB269970 (Fig. 2G).

Expression of *GIPR* and *LHCGR* mRNAs in the adenoma sample was in the same range order than in normal adrenals (Fig. 3A, B). In addition, LH-R and GIP-R immunoreactivities were detected in the adenoma. Application of hCG (10^{-12} to 10^{-7} M) and GIP (10^{-9} to 10^{-5} M) to cultured adenoma cells abnormally stimulated cortisol secretion (Emax: 179±3% and 286±9%, respectively), indicating that the LH-R and GIP-R are functionally coupled to steroidogenesis.

Expression of illegitimate receptors in human adrenocortical cells overexpressing *CTNNB1*

In order to explore the impact of activation of the β-catenin pathway on expression of illegitimate membrane receptors, transcription of genes encoding 5-HT4R, 5-HT7R, LH-R and GIP-R was quantified in infected human adrenocortical cells overexpressing *CTNNB1* (pL-β-catenin^{S37A}). Compared with human adrenocortical cells infected with empty vector, cells infected with pL-β-catenin^{S37A} had higher *AXIN2* mRNA levels (Fig. 4A). Constitutive activation of the β-catenin pathway upregulated *LHCGR* (Fig. 4D) but did not influence expression of the *HTR4*, *HTR7* and *GIPR* genes (Fig. 4B, C, E).

Expression of illegitimate receptors in mouse adrenals with constitutive activation of β-catenin

Mice with constitutive activation of β-catenin in the adrenal cortex (ΔCat), attested by upregulation of the β-catenin pathway target genes *Lef1* and *Axin2* (Fig. 5A), had higher *Lhcgr* mRNA levels in adrenals than wild type animals (Fig. 5C), whereas expression of the *Htr4*, *Htr6, Htr7* and *Gipr* genes was in the same range order in both ΔCat and wild type animals (Fig. 5B, D).

Discussion

It is well established that activation of the Wnt/β-catenin pathway is present in majority of adrenocortical tumors which frequently harbor illegitimate membrane receptors. Whether activation of the β-catenin pathway is causative of abnormal expression of receptors remains to be established.

We have first searched for the presence of ectopic receptors in an adrenocortical tumor in a context of *APC* mutation, since, in most cases, germline *APC* mutation coexists with a somatic APC defect in adrenal tissue leading to biallelic inactivation of the gene and activation of the β-catenin pathway (9). Indeed, nuclear localization of β-catenin and overexpression of *AXIN2* and *LEF1*, two target genes of β-catenin, gave evidence for activation of the β-catenin pathway in adrenocortical tumor cells from the patient with *APC* mutation.

In the normal adrenal gland, 5-HT weakly stimulates cortisol secretion through activation of 5-HT4R, whereas hCG/LH and GIP have physiologically no influence on zona fasciculata cells (19). By contrast, some cortisol-producing lesions abnormally express 5-HT4, 5-HT7, LH or GIP receptors, leading to increased sensitivity of adrenocortical cells to the respective ligands (20). The tumor cells derived from the adrenal of the patient with an *APC* mutation displayed high responsiveness to 5-HT, which was explained by 5-HT7R overexpression. Cortisol secretion by tumor cells was also stimulated by hCG and GIP. Immunohistochemical studies showed that these ectopic receptors were heterogeneously distributed within the tissues, likely explaining why Q-PCR analyses performed on tumor biopsic fragments did not show any evidence of overexpression of mRNAs encoding LH and GIP receptors. On the basis of these data, occurrence of ectopic receptors in this adrenocortical tumor may be regarded as the consequence of activation of the β-catenin pathway. To clearly investigate the relationship between activation of the β-catenin pathway and expression of illegitimate receptors we have used two distinct experimental models, *i.e.* human transfected and mouse genetically modified adrenocortical cells. Upregulation of gene encoding axin2, observed in both adrenocortical cell models, was indicative of activation of β-catenin.

Our RT-Q-PCR experiments have demonstrated that genetic activation of β-catenin in human adrenocortical cells and mouse adrenal glands induced overexpression of the LH/hCG receptor, whereas expression rates of *GIPR*, *HTR4* and *HTR7* mRNAs remained unchanged. Thus, activation of the β-catenin pathway in adrenocortical cells favors illicit expression of the LH/hCG receptor, as previously reported in ovary granulosa cells (21). This process represents

a new mechanism by which fasciculata cells aberrantly express the LH/hCG receptor, in addition to transactivation of the receptor gene by GATA-4 in transgenic mouse models (22).

The mechanism responsible for expression of other illicit receptors in the tumor from the patient with *APC* mutation remains unknown. Synthesis of the GIP-R may result from microduplication of the *GIPR* gene, as recently reported (2). Overexpression of the 5-HT7R may be the consequence of activation of the cAMP/PKA pathway, as previously shown in PPNAD tissues (5). However, hyperactivity of PKA also triggers overexpression of the 5-HT4R (5), that was not observed in transfected cells overexpressing *CTNNB1*. The cause of 5-HT7R overexpression in the tumor of the patient with *APC* mutation thus appears unclear.

In conclusion, we have reported a case of FAP-associated cortisol-secreting adrenocortical tumor expressing multiple ectopic membrane receptors, including the LH/hCG receptor. Data obtained from in human transfected adrenocortical cells and in adrenals of transgenic mice give evidence for a causative link between activation of the β-catenin pathway and overexpression of the LH/hCG receptor in adrenocortical cells.

References

1. **Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A, Mazzuco TL, Tremblay J, Hamet P.** Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 2010;73(1):1–15.

2. **Lecoq A-L, Stratakis CA, Viengchareun S, Chaligné R, Tosca L, Deméocq V, Hage M, Berthon A, Faucz FR, Hanna P, Boyer H-G, Servant N, Salenave S, Tachdjian G, Adam C, Benhamo V, Clauser E, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M, Bourdeau I, Maiter D, Tabarin A, Bertherat J, Lefebvre H, de Herder W, Louiset E, Lacroix A, Chanson P, Bouligand J, Kamenický P.** Adrenal GIPR expression and chromosome 19q13 microduplications in GIP-dependent Cushing's syndrome. *JCI Insight* 2017;2(18). doi:10.1172/jci.insight.92184.

3. **Beuschlein F, Fassnacht M, Assié G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, Ronchi CL, Wieland T, Sbiera S, Faucz FR, Schaak K, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Barreau O, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Zabel U, Szarek E, Salpea P, Forlino A, Vetro A, Zuffardi O, Kisker C, Diener S, Meitinger T, Lohse MJ, Reincke M, Bertherat J, Strom TM, Allolio B.** Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2014;370(11):1019–1028.

4. **Hannah-Shmouni F, Faucz FR, Stratakis CA.** Alterations of Phosphodiesterases in Adrenocortical Tumors. *Front. Endocrinol.* 2016;7:111.

5. **Bram Z, Louiset E, Ragazzon B, Renouf S, Wils J, Duparc C, Boutelet I, Rizk-Rabin M, Libe R, Young J, Carson D, Vantyghem M-C, Szarek E, Martinez A, Stratakis CA, Bertherat J, Lefebvre H.** PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *J. Clin. Investig. Insight* 2016;1(15):e87958.

6. **Gao C, Wang Y, Broaddus R, Sun L, Xue F, Zhang W.** Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: a review. *Oncotarget* 2018;9(4):5492–5508.

7. **Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW.** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275(5307):1787–1790.

8. **Galiatsatos P, Foulkes WD.** Familial adenomatous polyposis. *Am. J. Gastroenterol.* 2006;101(2):385–398.

9. **Gaujoux S, Pinson S, Gimenez-Roqueplo A-P, Amar L, Ragazzon B, Launay P, Meatchi T, Libé R, Bertagna X, Audebourg A, Zucman-Rossi J, Tissier F, Bertherat J.** 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.* 2010;16(21):5133–5141.

10. **Faillot S, Assie G.** Endocrine tumours: The genomics of adrenocortical tumors. *Eur. J. Endocrinol.* 2016;174(6):R249-265.

11. **Teo AED, Garg S, Shaikh LH, Zhou J, Karet Frankl FE, Gurnell M, Happerfield L, Marker A, Bienz M, Azizan EAB, Brown MJ.** Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Adrenal CTNNB1 Mutations. *N. Engl. J. Med.* 2015;373(15):1429–1436.

12. **Wu V-C, Wang S-M, Chueh S-CJ, Yang S-Y, Huang K-H, Lin Y-H, Wang J-J, Connolly R, Hu Y-H, Gomez-Sanchez CE, Peng K-Y, Wu K-D.** The prevalence of CTNNB1 mutations in primary aldosteronism and consequences for clinical outcomes. *Sci. Rep.* 2017;7:39121.

13. **Gagnon N, Caceres K, Corbeil G, El Ghorayeb N, Ludwig N, Latour M, Lacroix A, Bourdeau I.** Genetic Characterization of GnRH/LH- Responsive Primary Aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2018. doi:10.1210/jc.2018-00087.

14. **Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, Tabarin A, Terzolo M, Tsagarakis S, Dekkers OM.** Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur. J. Endocrinol.* 2016;175(2):G1–G34.

15. **Tetsi Nomigni M, Ouzounian S, Benoit A, Vadrot J, Tissier F, Renouf S, Lefebvre H, Christin-Maitre S, Louiset E.** Steroidogenic enzyme profile in an androgen-secreting adrenocortical oncocytoma associated with hirsutism. *Endocr. Connect.* 2015;4(2):117–127.

16. **Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, Vaudry H.** Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience* 1992;47(4):999–1007.

17. **Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW.** Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 1997;272(40):24735–24738.

18. **Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A, Val P.** Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(8):1561–1576.

19. **Louiset E, Duparc C, Lenglet S, Gomez-Sanchez CE, Lefebvre H.** Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017;441:99–107.

20. **Lefebvre H, Duparc C, Prévost G, Zennaro M, Bertherat J, Louiset E.** Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol Cell Endocrinol* 2015;408:198–204.

21. **Law NC, Weck J, Kyriss B, Nilson JH, Hunzicker-Dunn M.** Lhcgr expression in granulosa cells: roles for PKA-phosphorylated β-catenin, TCF3, and FOXO1. *Mol. Endocrinol.* 2013;27(8):1295–1310.

22. **Vuorenoja S, Rivero-Muller A, Kiiveri S, Bielinska M, Heikinheimo M, Wilson DB, Huhtaniemi IT, Rahman NA.** Adrenocortical tumorigenesis, luteinizing hormone receptor and transcription factors GATA-4 and GATA-6. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007;269(1–2):38–45.

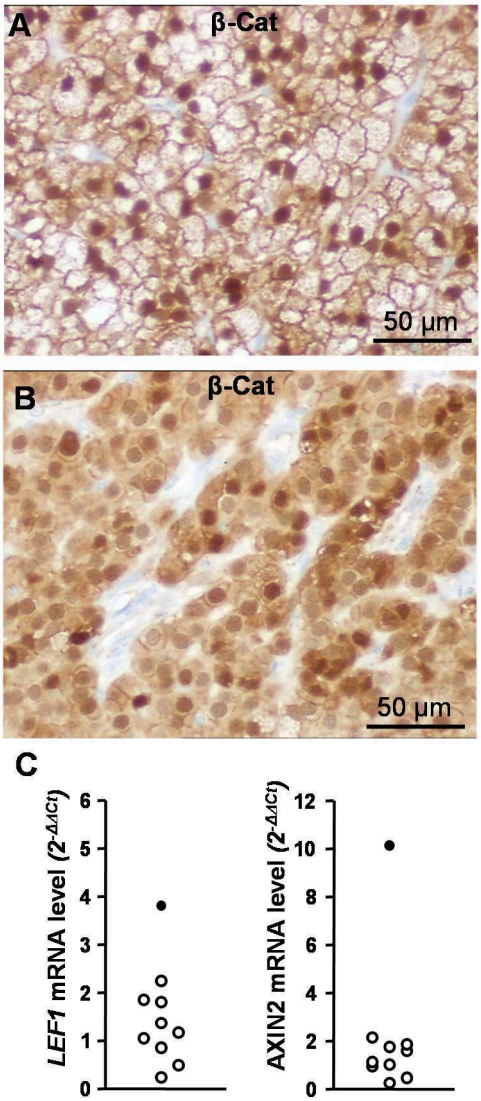


Figure 1. Activation of the β-catenin pathway in an adrenocortical tumor from a patient with *APC* mutation. A, B, Immunohistological localization of β-catenin (β-Cat) in the adrenocortical tumor. Nuclear immunostaining is indicative of activation of the β-catenin pathway in spongiocytic (A) and compact cells (B). C, RT-PCR quantification of mRNAs encoding the β-catenin pathway target genes *LEF1* and *AXIN2* in normal adrenals (○) and the tumor (●). *LEF1* and *AXIN2* mRNAs were overexpressed in the tumor. mRNA expression levels were normalized to PPIA.

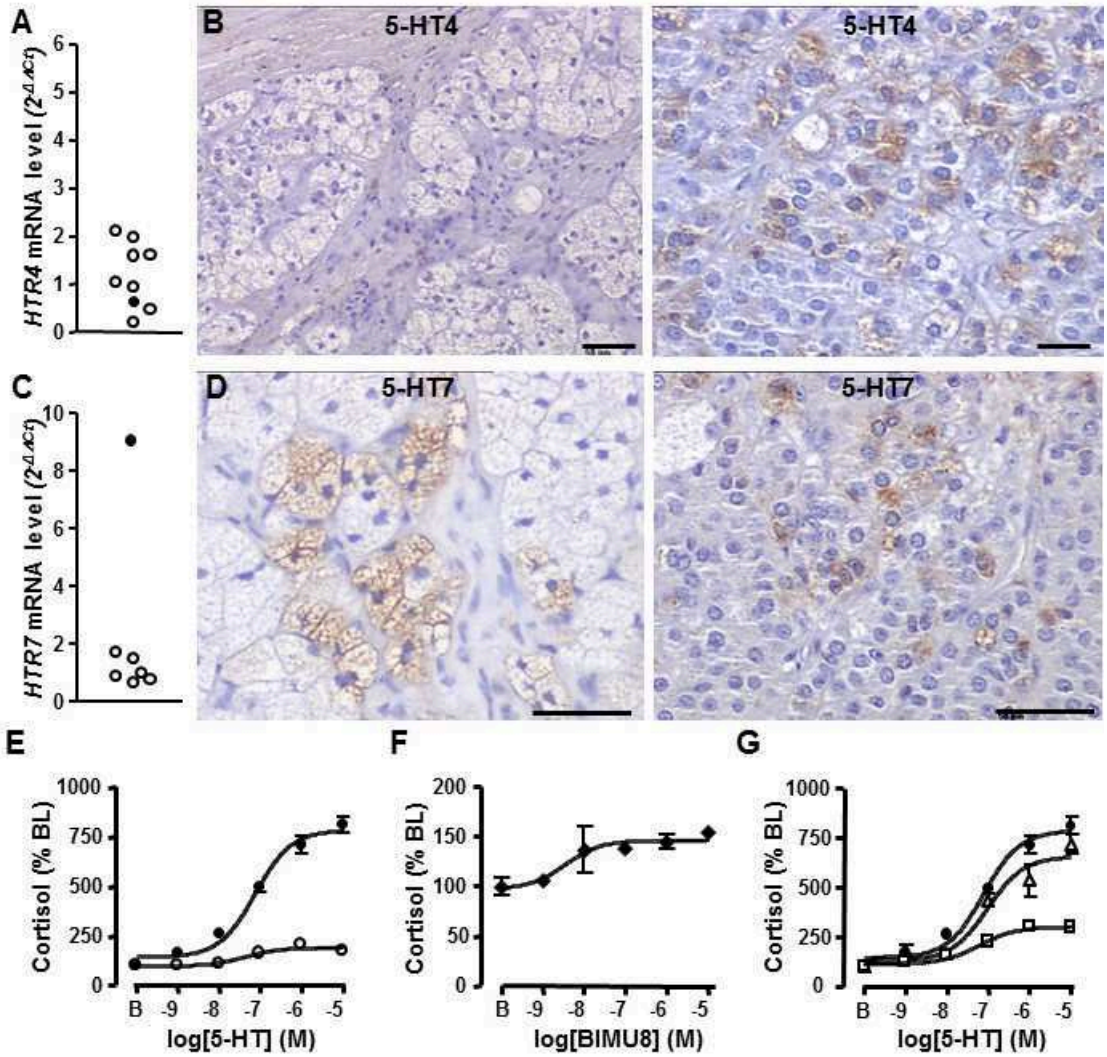


Figure 2. Abnormal expression of 5-HT receptors in an adrenocortical tumor from a patient with *APC* mutation. A-D, Expression of eutopic 5-HT4R and ectopic 5-HT7R. RT-PCR quantification of *HTR4* (A) and *HTR7* (C) mRNA levels in normal adrenals (○) and the tumor (●). Immunohistochemical localization of 5-HT4R (B) and 5-HT7R (D) in spongiocytic (left) and compact (right) cells in the adrenal tumor. E, Effect of 5-HT on cortisol secretion by normal (○) and tumor (●) cultured adrenocortical cells. F, G, Cortisol production induced by the 5-HT4R agonist BIMU8 (F) and 5-HT (G) in the absence (●) or presence of the 5-HT4R antagonist GR113808 (Δ) and the 5-HT7R antagonist SB269970 (□).

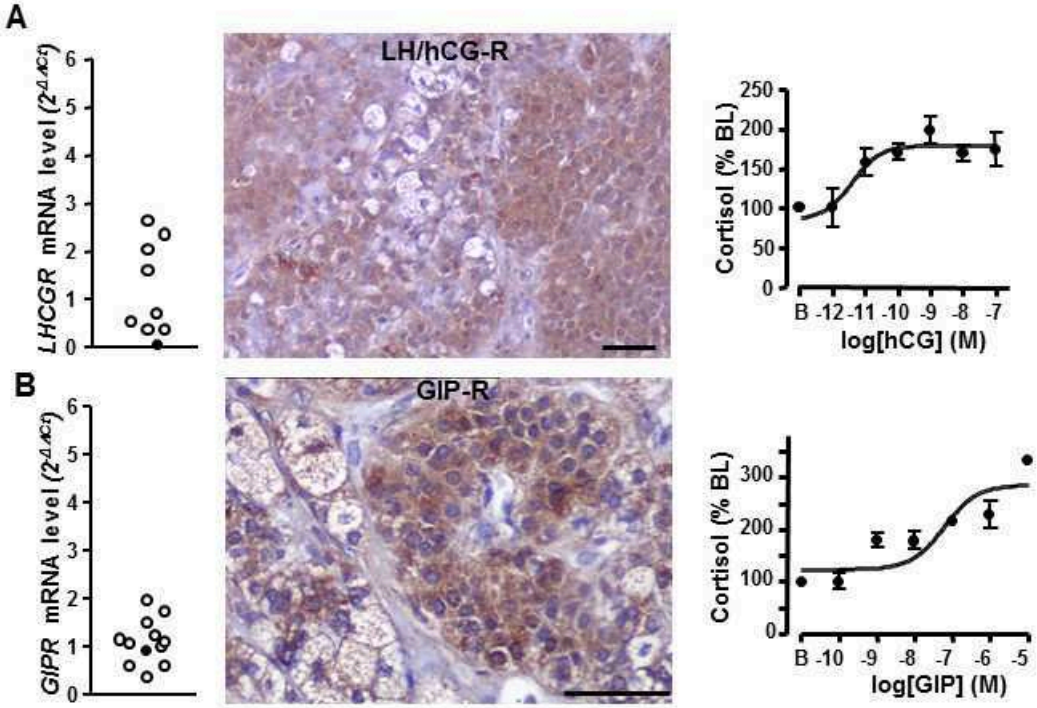


Figure 3. Abnormal expression of LH and GIP receptors in an adrenocortical tumor from a patient with *APC* mutation. A, B, RT-PCR quantification of *LHCGR* (A, left) and *GIPR* (B, left) mRNA levels in normal adrenals (○) and the tumor (●). Immunohistochemical localization of LH-R and GIP-R in the adrenal tumor (middle panels). Effect of hCG and GIP on cortisol secretion by cultured adrenocortical tumor cells (right panels). mRNA expression levels were normalized to *PPIA*. Scale bars, 50 µm. BL, basal level.

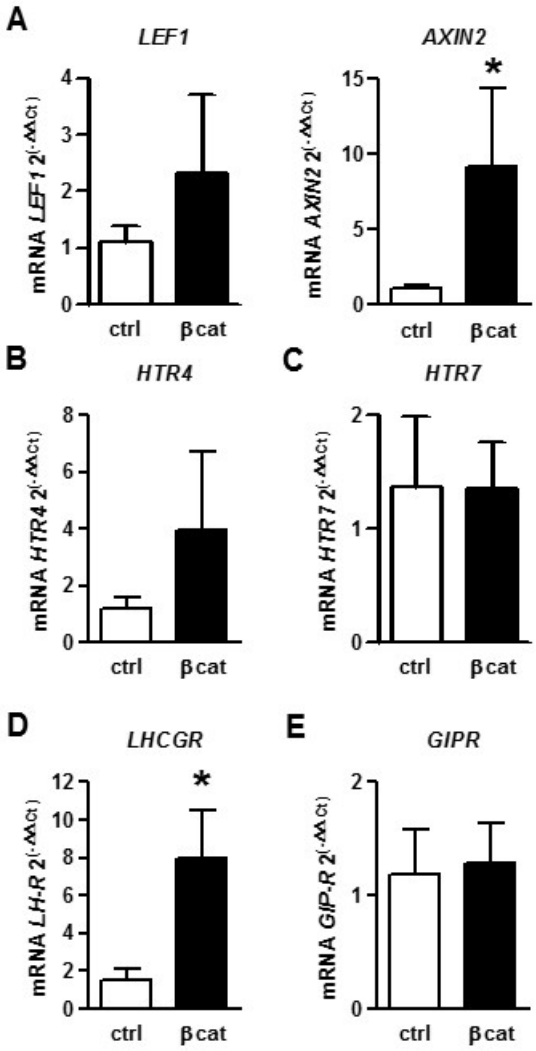


Figure 4. Effect of activation of the β-catenin pathway on expression of membrane receptors in human adrenocortical cells. Quantification of mRNAs encoding the β-catenin pathway target genes *LEF1* (A, left) and *AXIN2* (A, right panels), and 5-HT4R (B), 5-HT7R (C), LH-R (D) and GIP-R (E) in cultured human adrenocortical cells infected with pL empty (ctrl) or pL-β-catenin^{S37A} vector (βcat), mRNA expression levels were normalized to *PPIA*. Data were analyzed by using Mann-Whitney test. * P<0.05.

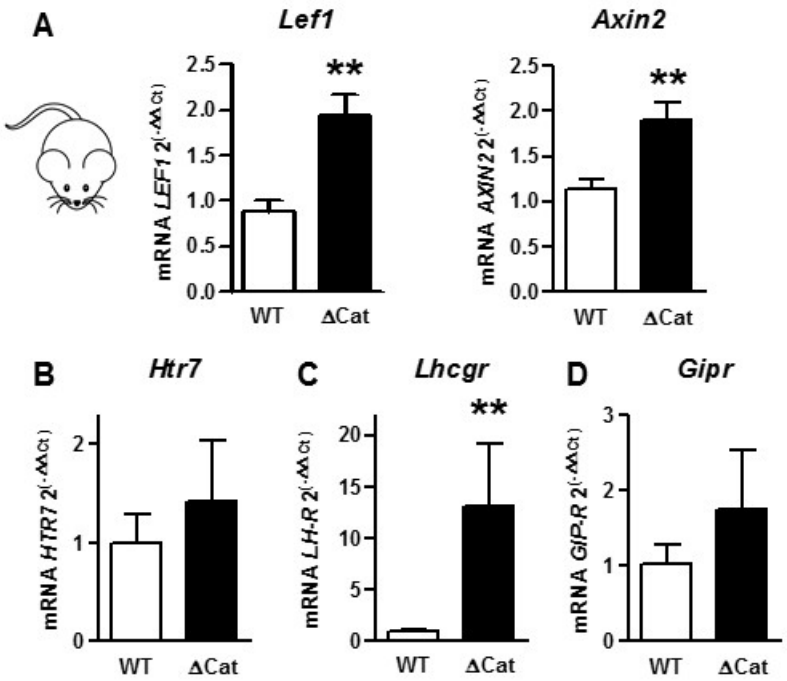
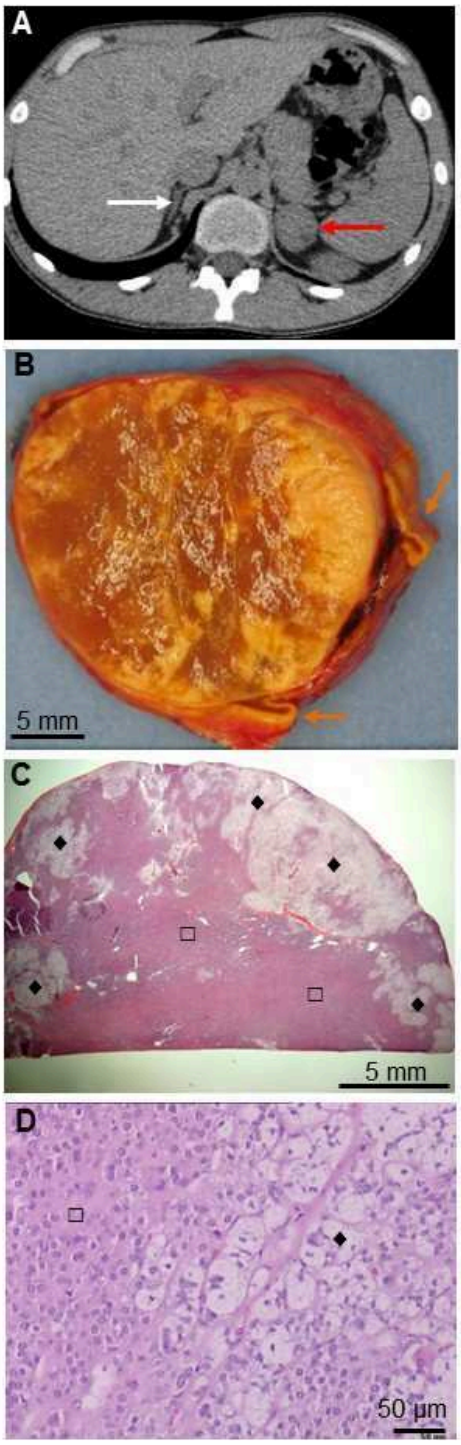
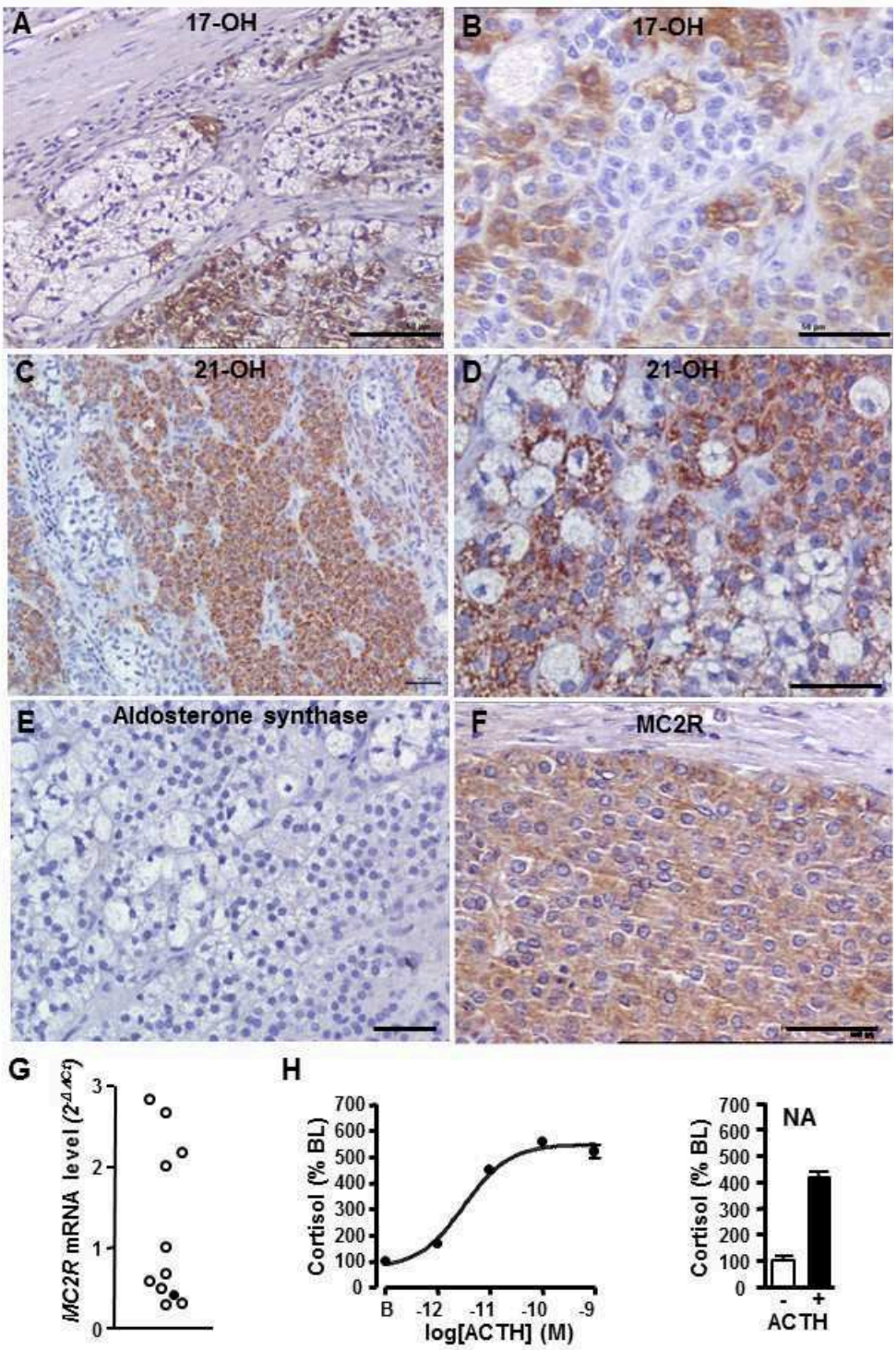


Figure 5. Effect of activation of the β-catenin pathway on expression of membrane receptors in mouse adrenocortical cells. Quantification of mRNAs encoding the β-catenin pathway target genes *Lef1* (A, left) and *Axin2* (A, right panels), and 5-HT7R (B), LH-R (C) and GIP-R (D) in mouse adrenals from wild type (WT) or genetically-modified animals overexpressing the β-catenin gene *CTNNB1* (ΔCat). Expression of *Htr4* was not detected in mouse adrenals.



Supplemental Fig. 1. Radiological and histological presentation of the adrenal tumor in the patient with an APC mutation. A, Abdominal CT scan showing the normal right adrenal (white arrow) and the left adrenal tumor (red arrows) reaching 28 mm in diameter. B, Macroscopic view showing the heterogeneous tumor and the peritumoral adrenal tissue (orange arrows). C, D, Microscopic views of the tumor tissue (HES coloration) at low (C) and high (D) magnifications showing the histological structure of the adrenal lesion mainly composed of compact cells (□) intermingled with lobules of spongiocytic cells (♦).



Supplemental Fig. 2. Cortisol production by the adrenal tumor. A-F, Immunohistological localization of 17-hydroxylase (A, B; 17-OH), 21-hydroxylase (C, D; 21-OH), two enzymes involved in cortisol synthesis, aldosterone synthase (E) and melanocortin type 2 receptor selective for ACTH (F, MC2R) in the adrenocortical tumor. Spongiocytic and compact cells were immunopositive for 17-OH and 21-OH, and immunonegative for aldosterone synthase. MC2R-immunoreactivity was not detected in spongiocytic cells but intensely observed in compact cells. G, Quantification of mRNAs encoding *MC2R* in normal adrenals (○) and the tumor (●). The lower MC2R expression level in the tumor than normal adrenals suggests that the

tumor sample used to extract mRNAs was essentially composed of spongiocytic cells. H, Cortisol secretion by cultured tumor adrenocortical cells in response to increasing concentrations of ACTH (10^{-12} to 10^{-9} M; left panel). Right panel, Cortisol produced by normal adrenocortical (NA) cells cultured in the absence or in presence of 10^{-10} M ACTH. The higher efficacy of ACTH to stimulate cortisol secretion by tumor than normal cells can be explained by the diffuse and intense distribution of MC2R among tumor compact cells.

Parameter	Value	Normal value
Plasma cortisol at 0h (nmol/l)	84	<210
Plasma cortisol after dexamethasone (1 mg orally) suppression test (nmol/l)	28	<50
Plasma ACTH (pg/ml)	14.7	4.7 - 48.8
Free urinary cortisol (nmol/24hr)	223	55 - 286
Plasma aldosterone/renin ratio (pmol/mU)	14.8	< 63
Urinary metanephrines (nmol/24hr)	590	< 1500

Supplemental Table 1: Plasma hormone concentrations at diagnosis.

Gene name	Accession number	Primer	Sequence primer	Product size (bp)
HTR4	NM_001040169.2 NM_000870.6 NM_001286410.1 NM_001040172.2 NM_199453.3 NM_001040173.2	Forward	5'-CTGTGGTGGCCTTCTACATCCC-3'	199
		Reverse	5'-ATGCACAGGGTCTTGGCTGC-3'	
HTR6	NM_000871.2	Forward	5'-GGGTGCCATATGCTTCACCT -3'	150
		Reverse	5'-TCAGCAGACTCCACCCCTG -3'	
HTR7	NM_000872.4 NM_019860.3 NM_019859.3	Forward	5'-AAAACATCTCCATCTTTAAGCGAGAA-3'	70
		Reverse	5'-GTAAAGGCCCCGACGATGAT-3'	
LHCGR	NM_000233.3	Forward	5'-CTGCCGAGCTATGGCCTAG-3'	165
		Reverse	5'-ATTCTGTTCTTTTGTTGGCAAGTT-3'	
GIPR	NM_000164.2 NM_001308418.1	Forward	5'-GTGATGGCCAATGGGGACTT-3'	109
		Reverse	5'-TACATGACCTGCAACCGCTC-3'	
LEF1	NM_016269.4 NM_001130713.2 NM_001130714.2	Forward	5'-CAGTCATCCCGAAGAGGAAG-3'	125
		Reverse	5'-AGGGCTCCTGAGAGGTTTGT-3'	
AXIN2	NM_004655.3	Forward	5'-AGTCAGCAGAGGGACAGGAA-3'	113
		Reverse	5'-ACACCTGCCAGTTTCTTTGG-3'	
MC2R	NM_000529.2	Forward	5′-GGACCGCTACATCACCATCT-3′	198
		Reverse	5′-AGGCACAGGATGAAGACCAG-3′	
PPIA	NM_001300981.1 NM_021130.4	Forward	5'-ATGGCACTGGTGGCAAGTCC-3'	241
		Reverse	5'-TTGCCATTCCTGGACCCAAA-3'	

Supplemental Table 2: Sequences and GenBank accession numbers of the primers used for Real-Time PCR studies in human samples

Gene name	Accession number	Primer	Sequence primer	Product size (bp)
Htr4	NM_008313.4	Forward	GGTGGCCGCAGCAATCTGCTAG	159
		Reverse	GTCCATTACAGGAAATGGGCATGAGG	
Htr6	XM_011250196.2	Forward	CAGTCGCCGGCAGCGGATCA	194
		Reverse	CGTGTGAGTACGCTTGATCACGAG	
Htr7	NM_008315.3 NM_001347442.2 NM_001360318.1 NM_001360300.1	Forward	CACCTGCTGAGCGGCTTCCC	248
		Reverse	GCCAGCGCCAGGGACACAAT	
Lhcgr	NM_013582.2	Forward	GCCATGCATTCAATGGGACG	137
		Reverse	GGCCTGCAATTTGGTGGAAG	
Gipr	NM_001080815.1	Forward	GCGTGCTCTACTGCTTCATCAAC	222
		Reverse	AACTTTCCAAGACCTCATCCCC	
Lef1	NM_010703.4 NM_001276402.1 NM_001276403.1	Forward	GACGAGCACTTTTCTCCGGG	144
		Reverse	TGGGGTGATCTGTCCAACGC	
Axin2	NM_015732.4	Forward	ATGGGGAGTAAGAAACAGCTCC	178
		Reverse	CCAGCTCCAGTTTCAGTTTCTC	
Ppib	NM_011149.2	Forward	GGAGATGGCACAGGAGGAA	76
		Reverse	GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	

Supplemental Table 3: Sequences and GenBank accession numbers of the primers used for Real-Time PCR studies in mice adrenals

Antibodies	Source	Host	Antigen retrieval	Dilution
5-HT4R	MBL (LS-A655)	Ployclonal rabbit	Citrate buffer pH=6 95°C – 20 min	1:100
5-HT6R	Abcam (ab101911)	Polyclonal rabbit	-	1:1200
5-HT7R	Sigma (S0320)	Polyclonal rabbit	Citrate buffer pH=6 95°C – 20 min	1:500
LH-R	Boster (PA1552)	Polyclonal rabbit	-	1 :100
GIP-R	Abcam (Clone EPR5827)	Rabbit monoclonal	Citrate buffer pH=6 95°C – 20 min	1:50
β-catenin	Roche-Ventana (760-4242)	Monoclonal mouse	Citrate buffer pH=6 95°C – 60 min	Ready to use
MC2R	Abgent (Clone EPR5827)	Rabbit monoclonal	-	1:50
17α-Hydroxylase (17-OH)	Drs. V. Luu the and G. Pelletier, Laval University Medical Center	Polyclonal rabbit	Citrate buffer pH=6 95°C – 20 min	1:2000

Supplemental Table 4: Antibodies used for immunohistochemical studies

Article 3 : **Désorganisation anatomique et fonctionnelle du cortex surrénalien au cours de la maladie de Cushing et du déficit en 21-OH.**

Julie Le Mestre, Céline Duparc, Yves Reznik, Jérôme Bertherat, Celso Gomez-Sanchez, Hervé Lefebvre et Estelle Louiset.

Communication rapide en préparation

Résumé. Dans le cortex surrénalien murin, la différenciation des cellules productrices d'aldostérone dans la zone glomérulée (ZG) est sous le contrôle de l'activation de la voie Wnt/β-caténine alors que l'activation de la voie AMPc/PKA par l'ACTH, *via* son récepteur positivement couplé à l'adénylate cyclase (récepteur de type 2 des mélanocortines) oriente la différenciation des cellules vers la synthèse de cortisol dans la zone fasciculée (ZF). Selon ce modèle, la suractivation de la voie AMPc/PKA due à une hypersécrétion d'ACTH pourrait perturber l'organisation anatomique et fonctionnelle du cortex surrénalien chez l'Homme.

Nous avons étudié l'histologie surrénalienne et l'expression des enzymes limitantes de la synthèse d'aldostérone (CYP11B2) et de cortisol (CYP11B1) chez des patients présentant une hypersécrétion d'ACTH liée à un bloc en 21-hydroxylase (21-OHD) ou une maladie de Cushing (CD). Dans les surrénales des patients avec 21-OHD, nos résultats montrent une organisation des cellules en faisceaux dans la zone sous-capsulaire, et non en amas arrondis comme dans la surrénale saine. Ces tissus présentent une large distribution du marquage immunohistochimique DAB2 (marqueur de ZG), témoignant d'une ZG étendue, associée à une immunopositivité très marquée CYP11B2, mutuellement exclusive avec le marquage CYP11B1. A contrario, le marquage DAB2 est restreint à quelques groupes de cellules dans les surrénales des patients avec CD. La réduction de la ZG est associée à une faible expression de CYP11B2 au niveau de l'ARNm et de la protéine, qui contraste avec une forte expression de CYP11B1.

Nos résultats suggèrent que l'antagonisme entre les effets respectifs de l'ACTH et de l'AngII sur la trophicité et la capacité sécrétoire de la ZG explique vraisemblablement les disparités entre les altérations architecturales et fonctionnelles du cortex surrénalien observées respectivement au cours du 21-OHD et de la CD.

Désorganisation anatomique et fonctionnelle du cortex surrénalien au cours de la maladie de Cushing et du bloc en 21-hydroxylase

Julie Le Mestre[1], Céline Duparc[1], Jérôme Bertherat[2], Yves Reznik[3], Celso E. Gomez-Sanchez[4], Hervé Lefebvre[1,5] et Estelle Louiset[1]

[1]Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Rouen, France.

[2]Service d'Endocrinologie et des Maladies Métaboliques, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Paris, France.

[3]Service d'Endocrinologie-Diabétologie, Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Caen, France.

[4]Centre Médical de l'Université du Mississipi, Jackson, Etats-Unis.

[5]Service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques, CHU de Rouen Normandie, Rouen, France

Mots clés : surrénale, cortex, remodelage, maladie de Cushing, déficit en 21-hydroxylase

Introduction

La glande surrénale humaine est composée de deux parties distinctes dont la plus externe, le cortex, est divisée en 3 zones concentriques : la zone glomérulée (ZG), la zone fasciculée (ZF) et la zone réticulée, de la périphérie vers le centre de la glande. Il est habituellement considéré que les cellules organisées en rosettes qui composent la ZG sont productrices d'aldostérone. Il a néanmoins été récemment montré qu'à l'âge adulte, l'immunoréactivité de type aldostérone-synthase se limite à des groupes de cellules de la zone sous-capsulaire, dénommés APCC pour *Aldosterone-Producing Cell Clusters* (1,2). D'autre part, les cellules productrices de cortisol sont classiquement organisées en faisceaux perpendiculaires à la capsule et forment la ZF. Dans le cortex surrénalien murin, la différenciation de la ZG est sous le contrôle de l'activation de la voie Wnt/β-caténine alors que la prééminence de l'effet de la voie AMPc/PKA oriente les cellules vers un phénotype typique de la zone fasciculée dans le cortex profond (3,4). Chez l'Homme, les rôles de ces deux voies de signalisation majeures ne sont pas encore clairement établis. L'hypothèse d'un contrôle positif de la voie AMPc/PKA sur la différenciation de la zone fasciculée est suggérée par le fait que l'activation constitutive de la voie AMPc/PKA dans le cortex surrénalien, liée à une mutation inactivatrice de *PRKAR1A* ou activatrice de *PRKACA* par exemple, favorise préférentiellement le développement de néoplasies cortisolosécrétrices (5). A cet égard, il a été montré que l'activation de la voie AMPc/PKA par l'ACTH provoque la stimulation de l'expression de CYP11B1, enzyme clé de la synthèse de cortisol (6). De plus, les patients souffrant de déficit familial en glucocorticoïdes, en particulier secondaire à une mutation inactivatrice du *MC2R*, possèdent de petites glandes surrénales dépourvues d'une ZF clairement délimitée (7). Par ailleurs, la diminution de la surface du marquage sous-capsulaire DAB2 observée dans nos échantillons de surrénales issues de maladie de Cushing suggère une régression partielle de la ZG sous l'influence des taux plasmatiques élevés d'ACTH comme cela a été précédemment montré dans des modèles animaux (4,8).

Des anomalies de l'histologie du cortex surrénalien ont été précédemment décrites dans le déficit en 21-OH et la maladie de Cushing (9). En revanche, aucune étude n'avait jusqu'à présent pu relier ces observations à d'éventuelles perturbations des capacités sécrétoires des différentes zones du cortex. Le but de notre étude était donc d'évaluer l'expression ainsi que la distribution de CYP11B2 (enzyme nécessaire à la production d'aldostérone) et CYP11B1, chez des patients présentant des taux élevés d'ACTH dans le cadre d'une maladie de Cushing (CD) ou d'un déficit en 21-hydroxylase (21-OHD).

Matériel et méthodes

Tissus

Les patients ont été recrutés à partir de 3 centres français (Rouen, Caen et Assistance Publique des Hôpitaux de Paris). Les tissus surrénaliens ont été collectés chez 13 patients présentant une maladie de Cushing (CD) et 2 patients avec déficit en 21-hydroxylase (21-OHD) immédiatement après la chirurgie. Pour 6 patients avec CD et les 2 patients avec 21-OHD, des fragments de surrénales ont pu être congelés extemporanément et conservés à -80°C pour extraction ultérieure des ARN et étude de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative. Pour tous les patients, les tissus ont été fixés dans du paraformaldéhyde pour l'étude histologique. Cinq surrénales normales (tissus contrôles ; NA) ont été obtenues à partir de pièces de néphrectomie élargie pour cancer du rein. Les protocoles de recueil des tissus et les procédures expérimentales ont été approuvés par le Comité d'Ethique Régional. Un consentement écrit et signé a été obtenu chez tous les patients de l'étude.

RT-PCR quantitative (QPCR)

Les ARN totaux ont été extraits de tissus frais ou congelés à -80°C et de cellules en culture, à l'aide de Tri Reagent (Sigma-Aldrich) puis purifiés sur des colonnes d'extraction Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). La qualité et la quantité des ARN sont respectivement évaluées sur bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France) et NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Villebon-Sur-Yvette, France). Les ARN purifiés ainsi que les ARN poly A de SHN (Takara, Saint-Germain-en-Laye, France) utilisés pour la validation des amorces sont convertis en ADNc grâce au système de rétro-transcription ImProm-II (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ADNc sont incubés en présence du mélange Master SYBR Green (Applied Biosystems, Villebon-Sur-Yvette, France) et des amorces spécifiques des gènes étudiés (Table 1).

L'amplification par PCR en temps-réel et la lecture des plaques sont réalisées à l'aide d'un appareil QuantStudio 3 (Applied Biosystems). La quantification des ARN d'intérêt est normalisée par l'utilisation du le gène *PPIA*, codant la cyclophiline, comme gène de référence. L'analyse des résultats est basée sur le calcul des ΔΔCt correspondant à la différence entre l'écart du nombre de cycles d'amplification entre le gène *PPIA* et le gène d'intérêt (ΔCt) et la moyenne de ces écarts. Les valeurs de variation d'expression des ARNm sont élevées à la puissance 2 ($2^{(-\Delta\Delta Ct)}$) pour obtenir l'expression relative des gènes dans les surrénales pathologiques comparée à celle des surrénales normales.

Immunohistochimie :

Les coupes de tissu surrénalien inclus en paraffine (5 µm) sont déparaffinées en présence de cyclohexane puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes. Pour certains anticorps, un démasquage antigénique à la chaleur est réalisé dans du tampon citrate (pH=6) ou Tris-EDTA (pH=9). Les péroxydases endogènes et les sites de liaison non spécifiques sont saturés à l'aide d'un inhibiteur enzymatique (Dako, Les Ulis, France) puis avec du sérum non-immun relatif à l'espèce produisant le second anticorps (*normal goat serum*). Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire, dilué dans du tampon Tris mélangé à de l'albumine de sérum bovin (TBS-BSA 2%), en chambre humide pendant 60 minutes à température ambiante ou sur la nuit à 4°C selon le protocole établi. Après lavage des coupes, celles-ci sont mises en présence de l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (*horse radish peroxydase*) pendant 30 minutes. Les anticorps primaires et secondaires utilisés sont répertoriés dans la Table 2. Les immunomarquages sont révélés après ajout de diaminobenzidine (Dako). Une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée avant la déshydratation des coupes de tissus dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes. Les tissus sont finalement montés entre lame et lamelle avec le baume d'inclusion Eukitt (Kindler GmbH and Co., Freibourg, Allemagne). Les colorations hématoxyline-éosine-safran (HES) ont été réalisées par le Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Rouen. Les acquisitions d'images sont réalisées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E600D (Nikon, les Ulis, France) sur la plateforme de recherche en imagerie cellulaire de Normandie (PRIMACEN, Université de Rouen). La quantification du marquage immunohistochimique a été réalisée à l'aide du logiciel libre Image J (développé par le *National Institutes of Health*, États-Unis).

Statistiques

Les données sont exploitées grâce au logiciel Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Etats-Unis) et analysées par l'utilisation de tests non paramétriques pour séries non-appariées (Test de Mann-Whitney). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (déviation standard à la moyenne) ou médiane ± interquartiles. Les valeurs de p inférieures à 0.05 sont considérées comme significatives.

Résultats

Remodelage du cortex chez les patients

La coloration HES du tissu surrénalien permet de retrouver les anomalies histologiques antérieurement décrites dans le cortex des patients avec 21-OHD ou CD (Fig. 1C, 1E) par comparaison avec la NA (Fig. 1A). Dans les tissus de 21-OHD, la zone sous capsulaire présente une organisation en faisceaux prenant une forme d'épingle à cheveux au contact de la capsule (Fig. 1C). Ces faisceaux sont composés de petites cellules compactes. Au cours de la CD, les cellules organisées en glomérules sont rares avec même une perte de totale de l'organisation glomérulée dans certains secteurs (Fig. 1E). Nous avons réalisé un marquage CD34, spécifique des cellules endothéliales, afin d'apprécier l'organisation du réseau vasculaire dans les tissus. Dans la NA, les vaisseaux entourent les glomérules sous-capsulaires avant de s'orienter perpendiculairement à la capsule et de cheminer entre les cordons cellulaires de la zone fasciculée (Fig. 1B). Dans les échantillons pathologiques, 21-OHD et CD, le marquage CD34 est présent entre les cordons cellulaires, de la capsule vers la profondeur de la glande (Fig. 1D, 1F).

Remodelage fonctionnel du cortex

La protéine DAB2 est spécifiquement exprimée dans la ZG (10). L'étude de la localisation de DAB2 chez les patients avec 21-OHD révèle un marquage intense tout au long de la capsule (Fig. 2D). La zone marquée apparaît beaucoup plus épaisse chez les patients avec 21-OHD que dans la surrénale normale même si le faible échantillon de patients avec 21-OHD ne permet pas de réaliser de test statistique (Fig. 2A). A l'inverse, l'immunomarquage DAB2 montre une ZG réduite, parfois absente chez les patients avec CD (Fig. 2G). L'estimation de la surface de la ZG par quantification du marquage DAB2 indique une réduction de la taille de la ZG dans les surrénales de patients avec CD par comparaison avec les surrénales normales à la limite de la significativité (p=0.557; Fig. 2J). L'analyse des données individuelles montre que 10 patients sur 13 présentent un amincissement de la ZG.

L'étude de l'expression de l'aldostérone synthase (CYP11B2), enzyme indispensable à la synthèse d'aldostérone montre un marquage sous-capsulaire discontinu dans les surrénales normales (Fig. 2B). Comme attendu, l'enzyme CYP11B1 est détectée dans le cortex profond au sein de la ZF (Fig. 2C). Chez les patients avec 21-OHD, le marquage CYP11B2 est parfaitement superposable au marquage DAB2 (Fig. 2E) et reste, comme dans la surrénale normale, mutuellement exclusif avec le marquage CYP11B1 qui est présent uniquement au

niveau des cellules du cortex profond (Fig. 2F). Dans le cortex des patients atteints de maladie de Cushing, la présence de l'enzyme CYP11B2 est rarement détectable. Elle est cependant parfois observée dans de petits groupes de cellules sous-capsulaires (Fig. 2H). Parallèlement, le marquage CYP11B1 s'étend de la capsule au cortex profond, suggérant une hypertrophie de la zone fasciculée avec extension vers la zone sous-capsulaire (Fig. 2I).
En comparaison à la NA, la mesure de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative révèle un taux élevé d'ARN *CYP11B2* pour l'un des 2 patients avec 21-OHD ainsi qu'une réduction non significative de l'expression de *CYP11B2* chez les patients avec CD (Fig. 2K). Il n'est pas retrouvé de variation de l'expression de *CYP11B1* chez les patients avec 21-OHD par rapport à la NA (Fig. 2L). En revanche, l'expression de *CYP11B1* est significativement augmentée dans les surrénales de patients avec CD ($p<0.05$).

Discussion

Il est intéressant de noter que l'hyperstimulation des tissus surrénaliens par l'ACTH n'entraîne pas des modifications histologiques et fonctionnelles similaires chez les patients avec 21-OHD et les patients avec CD. Notamment, la ZG est hypertrophique au cours du 21-OHD alors qu'elle est réduite dans la CD.

Ces présentations histofonctionnelles différentes peuvent résulter de plusieurs phénomènes. D'une part, la mutation affectant le gène *CYP21A2* chez les patients avec 21-OHD perturbe la stéroïdogenèse et favorise l'élévation de l'ACTH dès la vie fœtale alors que l'excès de corticotrophine survient à l'âge adulte dans la maladie de Cushing. D'autre part, le déficit en aldostérone qui découle du bloc en 21-hydroxylase va entraîner une forte activation réactionnelle du système rénine-angiotensine plasmatique qui est un stimulant important de la trophicité de la zone glomérulée et de la sécrétion d'aldostérone *via* l'expression de l'aldostérone synthase. Il est donc très vraisemblable que l'hypertrophie de la zone glomérulée observée au cours du déficit en 21-OH soit liée à l'augmentation du taux d'angiotensine II circulant qui paraît capable de s'opposer à l'action inhibitrice de l'ACTH mise en évidence dans les tissus de CD. L'hypertrophie de la ZG et la surexpression de CYP11B2 peuvent être considérées comme des mécanismes compensatoires ayant pour but de contrecarrer le déficit en aldostérone (9). Ainsi, il a été montré qu'à la suite d'un régime pauvre en sel chez le rat, l'expression de CYP11B2 était visible tout au long de la zone sous-capsulaire par opposition au régime normosodé associée à une expression de CYP11B2 restreinte à quelques groupes de

cellules (11). Dans la même étude, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération de la ZG et la synthèse d'aldostérone.

En revanche, il est possible, au cours du 21-OHD, que la perte de l'organisation en rosettes au profit d'une organisation en « épingles à cheveux » formées par des travées sous-capsulaires de cellules compactes, puisse s'expliquer par une perturbation du développement de la glande surrénale en relation avec l'excès d'ACTH présent dès la vie fœtale. Une architecture similaire du cortex surrénalien est d'ailleurs observable chez le fœtus humain âgé de 32 semaines de grossesse (12). Il est concevable que la sur-stimulation du cortex immature par l'ACTH puisse perturber la mise en place histologique et fonctionnelle du cortex surrénalien en maintenir l'organisation histologique notée peu avant la naissance.

Chez les patients avec CD, les taux plasmatiques d'ACTH semblent favoriser l'extension de la ZF ainsi qu'une surexpression de CYP11B1 parallèlement à une réduction de la ZG chez 10 des 13 patients étudiés et une diminution de l'expression de CYP11B2 en immunohistochimie. Cette réduction de la ZG pourrait s'expliquer par l'effet minéralocorticoïde des glucocorticoïdes à l'origine d'une inhibition du système rénine-angiotensine (13). Ce mécanisme pourrait notamment contribuer fortement à la diminution de l'expression de CYP11B2 dans les tissus. A l'image des travaux menés chez la souris, il est également possible que l'ACTH puisse réprimer le phénotype «de zone glomérulée » des cellules (4). L'hypertrophie de la ZF, constituée de cellules productrices de cortisol d'après les immunomarquages réalisés, peut s'expliquer par les effets stimulants de l'ACTH sur la croissance cellulaire et la prolifération, bien documentés chez les rongeurs ayant subi un stress prolongé ou un traitement chronique par l'ACTH (8,14). Par ailleurs, l'augmentation de l'expression surrénalienne de CYP11B1 chez les patients avec CD peut être rapportée à l'excès d'ACTH, comme décrit antérieurement dans les cellules corticosurrénaliennes humaines (6).
En conclusion, nous avons montré que les surrénales de patients souffrant de CD ou de 21-OHD présentent un remodelage cortical histologique et fonctionnel sous l'effet des taux plasmatiques élevés d'ACTH. Dans la CD, ces anomalies se traduisent par une régression de la ZG sur le plan histologique et fonctionnel associée à une extension de la ZF vers la capsule sous l'effet de l'élévation de l'ACTH circulante. Dans le 21-OHD, l'activation du système rénine-angiotensine paraît s'opposer efficacement à l'effet répresseur de l'ACTH en favorisant une hypertrophie de la ZG associée à une forte expression de CYP11B2 tout au long de la zone sous-capsulaire.

Références

1. **Omata K, Anand SK, Hovelson DH, Liu C-J, Yamazaki Y, Nakamura Y, Ito S, Satoh F, Sasano H, Rainey WE, Tomlins SA.** Aldosterone-Producing Cell Clusters Frequently Harbor Somatic Mutations and Accumulate With Age in Normal Adrenals. *J Endocr Soc* 2017;1(7):787–799.

2. **Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, Kosaka T, Oya M, Mikami S, Shibata H, Itoh H, Mitani F, Yamazaki T, Ogishima T, Suematsu M, Mukai K.** Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2010;95(5):2296–2305.

3. **Sahut-Barnola I, Joussineau C de, Val P, Lambert-Langlais S, Damon C, Lefrançois-Martinez A-M, Pointud J-C, Marceau G, Sapin V, Tissier F, Ragazzon B, Bertherat J, Kirschner LS, Stratakis CA, Martinez A.** Cushing's Syndrome and Fetal Features Resurgence in Adrenal Cortex–Specific Prkar1a Knockout Mice. *PLOS Genetics* 2010;6(6):e1000980.

4. **Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Tabbal H, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Pointud J-C, Gomez-Sanchez CE, Vainio S, Shan J, Sacco S, Schedl A, Stratakis CA, Martinez A, Val P.** PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun* 2016;7. doi:10.1038/ncomms12751.

5. **Bonnet-Serrano F, Bertherat J.** Genetics of tumors of the adrenal cortex. *Endocr. Relat. Cancer* 2018;25(3):R131–R152.

6. **Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE.** Adrenocorticotrophic hormone is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol* 2010;45(1):59–68.

7. **Clark AJ, Weber A.** Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr. Rev.* 1998;19(6):828–843.

8. **Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP.** Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006;291(5):E965–E973.

9. **Neville AM, Mackay AM.** The structure of the human adrenal cortex in health and disease. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 1972;1(2):361–395.

10. **Romero DG, Yanes LL, de Rodriguez AF, Plonczynski MW, Welsh BL, Reckelhoff JF, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CE.** Disabled-2 is expressed in adrenal zona glomerulosa and is involved in aldosterone secretion. *Endocrinology* 2007;148(6):2644–2652.

11. **Nishimoto K, Harris RBS, Rainey WE, Seki T.** Sodium deficiency regulates rat adrenal zona glomerulosa gene expression. *Endocrinology* 2014;155(4):1363–1372.

12. **Naccache A, Louiset E, Duparc C, Laquerrière A, Patrier S, Renouf S, Gomez-Sanchez CE, Mukai K, Lefebvre H, Castanet M.** Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016;434:69–80.

13. **Hunter RW, Ivy JR, Bailey MA.** Glucocorticoids and renal Na+ transport: implications for hypertension and salt sensitivity. *J. Physiol. (Lond.)* 2014;592(8):1731–1744.

14. **Menzies RI, Zhao X, Mullins LJ, Mullins JJ, Cairns C, Wrobel N, Dunbar DR, Bailey MA, Kenyon CJ.** Transcription controls growth, cell kinetics and cholesterol supply to sustain ACTH responses. *Endocr Connect* 2017;6(7):446–457.

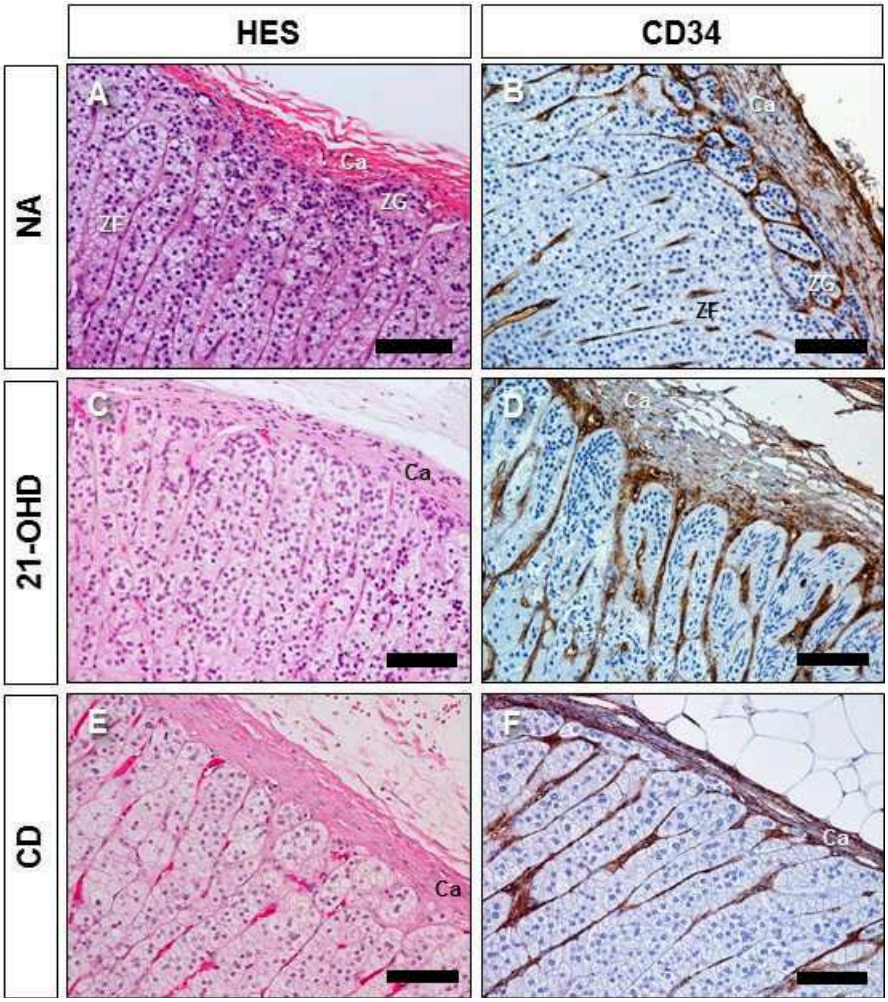


Figure 1. Remodelage histologique du cortex surrénalien chez les patients avec déficit en 21-hydroxylase (21-OHD) ou maladie de Cushing (CD). Images de microscopie optique montrant la coloration HES & l'immunomarquage CD34 dans la surrénale normale (NA ; A, B) en comparaison avec des surrénales de patients avec 21-OHD (C, D) ou CD (E, F). Ca: capsule; ZG: *zona glomerulosa*; ZF: *zona fasciculata*. Barres d'échelle = 50 µm.

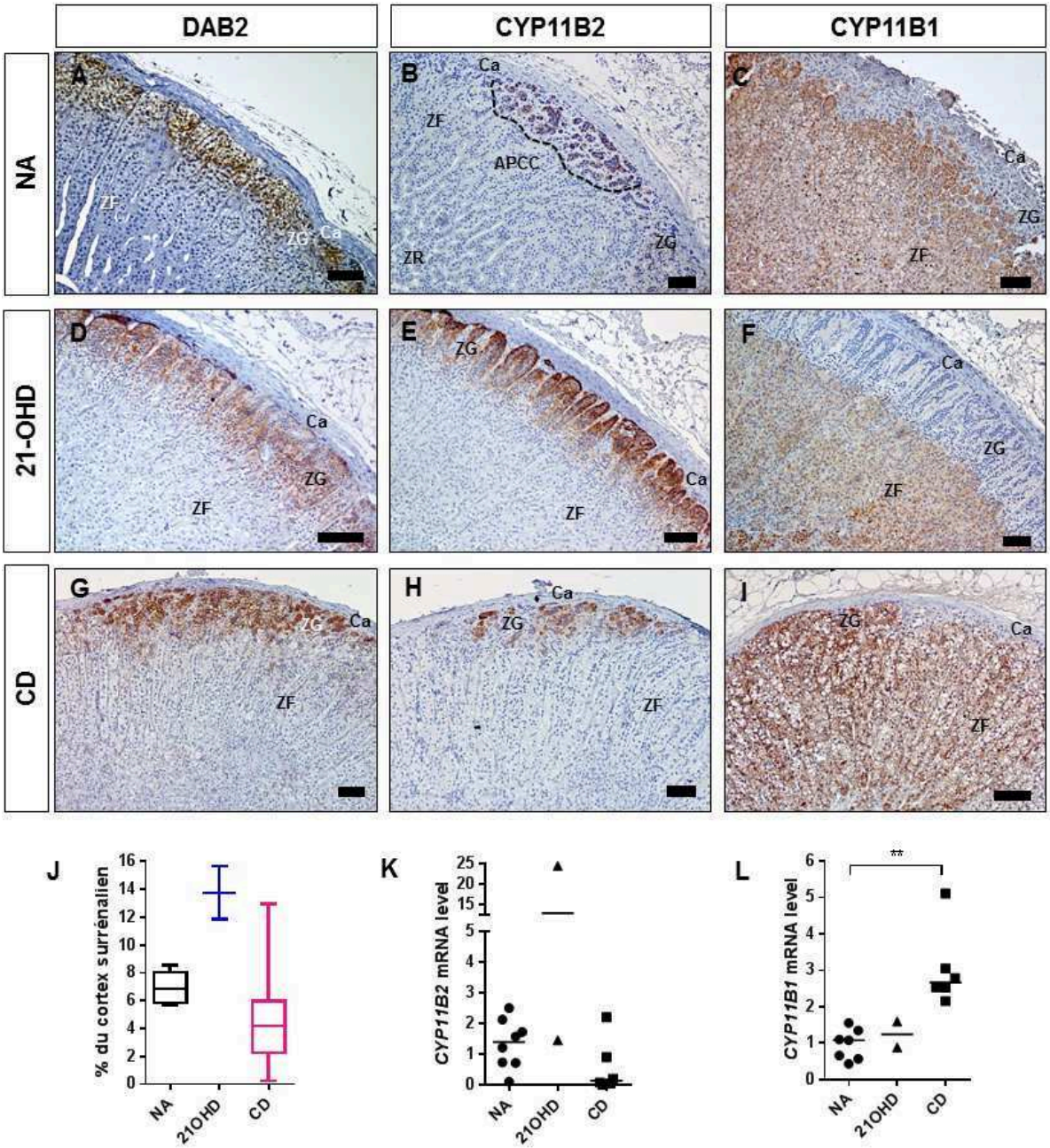


Figure 2. Distribution et expression de DAB2, CYP11B2 et CYP11B1 dans le cortex surrénalien des patients souffrant de déficit en 21-hydroxylase (21-OHD) ou de maladie de Cushing (CD). (A-I) Images de microscopie optique montrant l'expression de DAB2, CYP11B2 et CYP11B1 dans la surrénale normale (NA ; A-C) en comparaison avec des surrénales de patients avec 21-OHD (D-F) ou CD (G-I). (J) Surface du marquage DAB2 exprimée en % du cortex surrénalien dans la NA, le 21-OHD et la CD. (K,L) Niveaux d'expression des ARNm CYP11B2 (K) et CYP11B1 (L) dans la NA, le 21-OHD et la CD. Ca: capsule; ZG: zone glomérulée ; ZF: zone fasciculée. **, $p<0.05$. Barres d'échelle = 100 µm.

Gène	Séquence 5'-3'		N° Accession GenBank	Taille amplicon (pb)
	Amorce sens	Amorce antisens		
CYP11B1	AGGAGACCTTGCGGCTCTACC	GAACACGCGCACCAATGTC	NM_000497.3 NM_000498.3	110
CYP11B2	TCCAGGTGTGTTCAGTAGTTCC	GAAGCCATCTCTGAGGTCTGTG	NM_000498.3	146
PPIA	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	TTGCCATTCCTGGACCCAAA	NM_021130.4 NM_001300981.1	241

Table 1. Amorces utilisées en RT-PCR quantitative.

Cible	Espèce hôte	Démasquage antigénique	Dilution	Référence	Fournisseur
CD34	souris	pH6 / 95°C / 20 min	1/50	M7165 M078	Dako
CYP11B1	rat	pH9 / 95°C / 20 min	1/200	Dr C. Gomez-Sanchez, États-Unis	
CYP11B2	souris	pH9 / 95°C / 20 min	1/500		
DAB2	lapin	pH6 / 95°C / 30 min	1/200	sc-13982	Santa Cruz

Table 2. Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie.

Discussion et Perspectives

Discussion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier le rôle des voies de signalisation AMPc/PKA et Wnt/β-caténine dans l'émergence de systèmes de régulation aberrants au sein de la corticosurrénale.

I. Effets de la stimulation chronique par l'ACTH

A. Voie de signalisation sérotoninergique

Dans la surrénale humaine normale, la source exclusive de 5-HT est le mastocyte. Chez l'Homme, les signaux stimulant la libération de 5-HT par les mastocytes sont mal connus. Des travaux réalisés par notre équipe ont montré que les mastocytes sous-capsulaires établissent des contacts directs avec des fibres nerveuses intra-surrénaliennes, indiquant que leur activité sécrétoire pourrait être contrôlée par le système nerveux végétatif. Les travaux réalisés dans des modèles animaux permettent d'entrevoir l'existence d'autres systèmes de régulation. Chez la souris, notre équipe a montré que le régime désodé induisait une activation des mastocytes vraisemblablement *via* l'AngII circulante (Boyer *et al.*, 2017), comme le suggère l'expression du récepteur à l'AngII AT2 observée au niveau mastocytaire chez le rat (Carvalho *et al.*, 2006). De la même manière, il est possible que la dégranulation des mastocytes soit contrôlée par l'AngII chez l'Homme. Ce mécanisme pourrait constituer un système d'amplification de l'action de l'AngII sur la sécrétion d'aldostérone au cours de la restriction sodée et de l'hypovolémie.

En conditions physiologiques, la 5-HT exerce essentiellement un effet stimulant sur la sécrétion des minéralocorticoïdes mais influence peu la production de cortisol. Ce concept ne semble cependant pas s'appliquer à la physiopathologie. Ainsi, notre équipe a pu mettre en évidence un renforcement de la voie de signalisation sérotoninergique dans des pathologiques surrénaliennes responsables d'un hypercortisolisme, telles que les adénomes et les hyperplasies macro- et micronodulaires, au cours desquelles la sécrétion de cortisol apparaît contrôlée par la 5-HT par le biais d'un mécanisme paracrine impliquant à la fois une synthèse aberrante de l'amine par les cellules corticosurrénaliennes et la surexpression de récepteurs sérotoninergiques. En outre, dans les hyperplasies micronodulaires (PPNAD), l'activation du système sérotoninergique surrénalien apparaît secondaire à la stimulation de la PKA par les mutations du gène *PRKAR1A* à l'origine de l'affection (Bram *et al.*, 2016).

Ces données nous ont incités à étudier les effets de la stimulation chronique de la voie AMPc/PKA par l'ACTH, *via* son récepteur le MC2-R, sur l'expression des acteurs de la boucle intrasurrénalienne, notamment la TPH ainsi que les récepteurs sérotoninergiques couplés positivement à l'adénylate cyclase 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7. Dans cette optique, nous avons particulièrement examiné les tissus surrénaliens issus de patients présentant des taux plasmatiques et/ou intrasurrénaliens élevés d'ACTH (maladie de Cushing, syndrome de Cushing paranéoplasique, déficit en 21-OH et HMBS produisant de l'ACTH). Nous avons également analysé quelques adénomes corticosurrénaliens cortisolosécréteurs mutés ou non pour le gène *PRKACA*.

Dans un premier temps, nous avons globalement observé une expression ectopique de TPH1 dans les cellules stéroïdogènes des tissus corticosurrénaliens étudiés, suggérant une synthèse illicite de 5-HT dans ces cellules, l'expression de la décarboxylase des acides aminés aromatiques, nécessaire à la conversion de 5-hydroxytryptophane en 5-HT, ayant antérieurement été montrée dans le tissu surrénalien (Chang *et al.*, 1996). De façon attendue, nous avons noté en immunohistochimie que les cellules TPH1-positives contenaient également des quantités détectables de 5-HT. Il n'existait cependant pas toujours de superposition parfaite entre les immunomarquages ciblant la 5-HT et la TPH1. Notamment, certaines cellules immunopositives pour la 5-HT étaient négatives pour le marquage TPH1. De tels résultats soulèvent inévitablement la question de la sensibilité de la technique immunohistochimique utilisée pour visualiser TPH1 dans les cellules surrénaliennes. Il est néanmoins possible que la présence de 5-HT dans certaines cellules stéroïdogènes témoigne d'un processus de recapture de l'amine circulante et/ou produite par les cellules surrénaliennes voisines, *via* le transporteur SERT. En accord avec cette hypothèse, des résultats antérieurs obtenus par notre équipe avaient clairement montré l'expression du SERT dans les cellules corticosurrénaliennes normales et de PPNAD (Bram *et al.*, 2016). Contrairement à ce qui avait été constaté dans les tissus de PPNAD, nous n'avons pas observé d'expression de TPH2 dans nos tissus. L'expression préférentielle de TPH2 semble donc être caractéristique du PPNAD où elle témoigne de la forte différenciation neuroendocrine de ces tissus, précédemment décrite par le groupe du Dr Constantine A. Stratakis (Stratakis *et al.*, 1999). Dans ces tissus, elle apparaît être la conséquence de l'activation de la voie de la PKA comme le montre l'inhibition par le H89 de l'induction de TPH2 par les shRNA *PRKAR1A* dans la lignée H295R (Bram *et al.*, 2016). Par ailleurs, il a été montré dans différents modèles cellulaires, que la traduction des ARNm *TPH2* et la stabilité de l'enzyme de type 2, qui sont plus faibles que pour l'autre isoforme, sont

fortement augmentées par activation de la PKA (Murphy *et al.*, 2008). Ces données suggèrent que l'absence de TPH2 dans les tissus surrénaliens provenant des patients présentant des taux élevés d'ACTH résulterait d'une moindre activation de la PKA par rapport aux sujets porteurs d'une mutation *PRKAR1A*.

Le lien reliant l'activation du MC2-R à l'expression de la TPH1 dans les échantillons étudiés au cours de ce travail reste en revanche à déterminer dans la mesure où l'activation de la voie de la PKA dans les cellules H295R n'induit pas la synthèse de l'ARN codant cette enzyme. L'expression anormale de la TPH1 pourrait résulter d'un mécanisme indirect mettant en jeu un facteur produit en réponse à l'activation du MC2R. Notamment, certains auteurs ont montré que la 5-HT promeut la prolifération des cellules de cancer mammaire *via* le récepteur 5-HT_7 couplé aux voies AMPc/PKA, Src/ERK et PI3K/Akt et que l'expression de TPH1 peut être contrôlée par la voie PI3K/Akt, suggérant une activation de l'expression de TPH1 par la 5-HT *via* le récepteur 5-HT_7 (Gautam *et al.*, 2016) (**Figure 27**). La 5-HT pourrait donc stimuler sa propre synthèse dans les tissus surrénaliens exprimant ce récepteur. L'intervention d'autres mécanismes régulant positivement la voie PI3K/Akt n'est pas exclue.

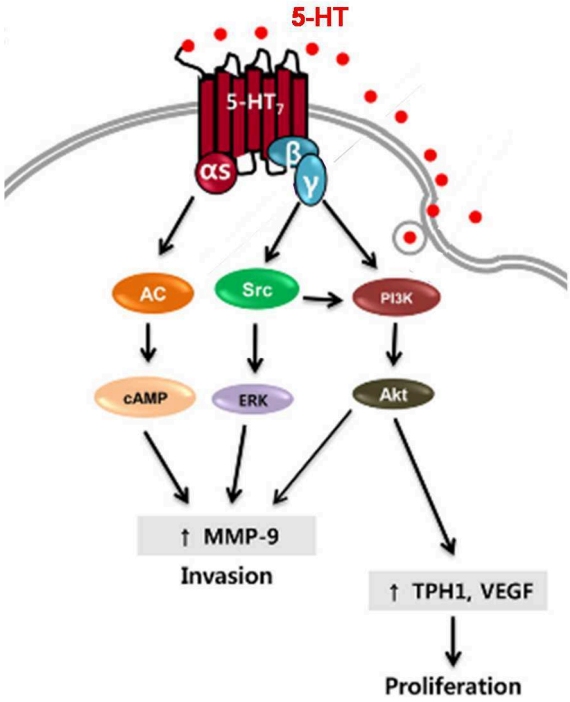


Figure 27 : Schéma montrant le couplage du récepteur 5-HT_7 dans la lignée cellulaire de cancer mammaire MDA-MB-231. Adapté d'après Gautam *et al.*, 2016.

Dans la surrénale humaine normale, le récepteur eutopique 5-HT_4 est fortement exprimé dans la zone sous-capsulaire au niveau à la fois des cellules CYP11B2- et CYP11B1-positives, mais n'est que peu présent dans la ZF (Cartier *et al.*, 2005; Kuc *et al.*, 2005; Duparc *et al.*, 2015). Il est couplé positivement à la voie AMPc/PKA et à un influx calcique *via* les canaux de type T (Contesse *et al.*, 1996; Louiset *et al.*, 2017). Dans les tissus surrénaliens soumis à des taux plasmatiques et/ou tissulaires élevés d'ACTH, nous montrons par immunohistochimie la présence de récepteurs illégitimes 5-HT_4 dans le cortex profond des patients, associée à une augmentation de l'expression de l'ARNm *HTR4* dans les déficits en 21-OH. Chez les patients souffrant de maladie de Cushing, l'absence d'augmentation de l'expression du gène *HTR4* s'explique vraisemblablement par la redistribution du récepteur au sein du cortex, comme le montrent les données immunohistochimiques. En effet, le récepteur 5-HT_4 est certes clairement surexprimé dans la ZF mais le marquage apparaît moins étendu voire absent dans la zone sous-capsulaire, ce qui peut donc permettre d'expliquer que la quantité globale d'ARN *HTR4* dans les tissus corticosurrénaliens reste comparable à celle du cortex normal. L'étude de la surface de la ZG estimée dans les tissus à l'aide du marquage DAB2, montre que la réduction de l'expression subcapsulaire du récepteur 5-HT_4 chez les patients avec maladie de Cushing est probablement la conséquence de la régression partielle de la ZG sous l'effet de l'action des taux élevés d'ACTH, comme observé dans les modèles animaux (Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Menzies *et al.*, 2017).

Le récepteur 5-HT_6 n'est pas exprimé dans la surrénale humaine normale et semble d'ailleurs exclusivement présent dans le SNC. Dans le cadre de nos travaux, nous avons mis en lumière une expression ectopique du récepteur 5-HT_6 chez des patients avec déficit en 21-OH, maladie de Cushing et HMBS mais semble-t-il de façon plus inconstante dans les tissus des patients avec syndrome de Cushing paranéoplasique. Ce récepteur, couplé positivement à la voie AMPc/PKA est également capable de recruter mTOR (Meffre *et al.*, 2012). Dans la mesure où mTOR paraît jouer un rôle majeur dans la résistance à l'apoptose des cellules corticosurrénaliennes, ces données suggèrent que l'expression ectopique du récepteur 5-HT_6 dans le cortex surrénalien pourrait fortement contribuer à la genèse des hyperplasies micronodulaires (de Joussineau *et al.*, 2014). Des études ont également révélé que le récepteur 5-HT_6 présentait une activité constitutive intrinsèque significative (Kohen *et al.*, 2001). Nous pouvons donc supposer que le récepteur 5-HT_6 puisse jouer un rôle non négligeable dans la physiopathologie des pathologies surrénaliennes étudiées indépendamment de son activation par la 5-HT.

Physiologiquement localisé au niveau des vaisseaux sanguins, le récepteur 5-HT_7 est également retrouvé au niveau de cellules de la ZF chez certains patients avec déficit en 21-OH, maladie de Cushing, syndrome de Cushing paranéoplasique ou HMBS. Ce récepteur possède, en plus de son couplage positif à la voie AMPc/PKA, une activité intrinsèque due notamment à la pré-association avec une protéine Gs en l'absence de ligand (Krobert and Levy, 2002; Andressen *et al.*, 2018). Cette propriété suggère que le récepteur 5-HT_7, comme le récepteur 5-HT_6, pourrait être actif au sein des tissus surrénaliens en dehors de toute stimulation par la 5-HT. Son expression dans les HMBS ne semble pas dépendre de la présence locale d'ACTH. Il est probable que son expression anormale dans ces tissus soit plutôt un reflet de la différenciation gonadique des cellules surrénaliennes mise en évidence par notre équipe (Louiset *et al.*, 2013). L'expression physiologique du récepteur 5-HT_7 dans les gonades a en effet été bien établie (Graveleau *et al.*, 2000; Krobert *et al.*, 2001).

L'expression du système sérotoninergique est observée dans tous les adénomes cortisolosécréteurs étudiés, qu'ils soient ou non porteurs d'une mutation somatiques du gène *PRKACA*. Il est donc possible que l'activation de la voie sérotoninergique dans les adénomes non mutés relève d'un mécanisme indépendant de la PKA. Il faut malgré tout souligner que les récentes études de génomique ont montré que ce type de tumeur présente globalement une signature moléculaire d'activation de la voie AMPc/PKA, l'hyperactivité de la PKA pouvant être liée, dans les tumeurs indemnes de toute mutation de *PRKACA*, à des anomalies génétiques touchant d'autres protéines de cette voie de signalisation (Faillot and Assie, 2016). Enfin, d'autres types de récepteurs sérotoninergiques que les types 4, 6 et 7, tels que les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} sont retrouvés surexprimés dans les études transcriptomiques relatives aux adénomes de Conn ou aux HMBS (Lampron *et al.*, 2006; Itcho *et al.*, 2018) mais aucun argument fonctionnel n'est venu soutenir ces résultats.

Les effets de l'activation chronique du MC2-R par l'ACTH dans les pathologies étudiées sont à rapprocher de l'impact du stress chronique sur la glande surrénale chez le rat. En effet, il a été montré dans cette espèce que l'application d'un stress prolongé de contention élevait le contenu intrasurrénalien de 5-HT. De plus, le stress d'immobilisation entraînait également une augmentation de l'expression anormale du récepteur eutopique 5-HT_7 dans le cortex surrénalien profond. Ce mécanisme semble donc constituer une voie de secours dont la finalité est vraisemblablement d'augmenter la réponse des glucocorticoïdes au stress en venant renforcer l'effet de l'ACTH (García-Iglesias *et al.*, 2013). De façon similaire, il a été observé chez l'homme, une extension de l'expression du récepteur 5-HT_4 des oreillettes aux ventricules

cardiaques en cas d'insuffisance cardiaque (Brattelid *et al.*, 2004). Le récepteur 5-HT_4 relayant physiologiquement les actions inotrope et chronotrope de la 5-HT, cette observation suggère que la surexpression du récepteur 5-HT_4 dans les ventricules peut avoir pour but de mobiliser des forces inotropes supplémentaires dans un contexte de défaillance cardiaque. On peut également évoquer dans le cadre de ce concept physiologique, l'uprégulation d'une boucle sérotoninergique dans les cellules β-langerhansiennes chez la souris gestante aboutissant à une augmentation de la masse cellulaire β et à une stimulation de la sécrétion d'insuline (Kim *et al.*, 2010). Ce mécanisme d'adaptation à l'insulinorésistance de la grossesse est activé par la prolactine et l'hormone lactogène placentaire.

L'ensemble de ces données laisse penser que la stimulation de la voie de signalisation sérotoninergique dans la surrénale humaine pourrait représenter un phénomène physiologique activé en pathologie par une sécrétion excessive ou ectopique d'ACTH ou par une mutation somatique impactant positivement la voie de la PKA. Il est également intéressant de constater que des boucles de régulation sérotoninergiques contrôlant la sécrétion des glucocorticoïdes ont également été décrites chez des espèces aussi éloignées de l'Homme que la grenouille (Delarue *et al.*, 1988; Idres *et al.*, 1989) ou le poisson rouge (Lim *et al.*, 2013). La conservation de ce système au cours de l'évolution suggère l'importance de la régulation sérotoninergique en physiologie.

B. Modifications histologiques et fonctionnelles

Dans le cortex surrénalien murin, la différenciation de la ZG est sous le contrôle de l'activation de la voie Wnt/β-caténine alors que la prééminence de l'effet de la voie AMPc/PKA oriente les cellules vers un phénotype typique de la zone fasciculée dans le cortex profond (Sahut-Barnola *et al.*, 2010; Drelon *et al.*, 2016). Chez l'Homme, le rôle de ces deux voies de signalisation majeures pour l'établissement de la zonation fonctionnelle n'est pas encore clairement établi. Alors que le rôle trophique *in vivo* de l'ACTH sur la ZF *via* l'activation de la voie AMPc/PKA est établi, notamment dans la CD et le 21-OHD, aucune étude n'a pu jusqu'à présent corréler les modifications histologiques des tissus à la fonctionnalité cellulaire. Nous avons donc évalué l'expression ainsi que la distribution de CYP11B2 (enzyme nécessaire à la production d'aldostérone) et CYP11B1 (enzyme clé de la synthèse de cortisol), chez des patients souffrant de CD ou de 21-OHD. En premier lieu, nos observations retrouvent les anomalies histologiques surrénaliennes classiquement décrites dans la CD et le 21-OHD (Neville and Mackay, 1972). Elles se traduisent dans les deux cas par une hypertrophie de la ZF. En revanche, la ZG apparaît hypertrophique formant des travées en « épingles à cheveux »

perpendiculaires à la capsule au cours du 21-OHD alors qu'elle est réduite dans la CD. Au niveau fonctionnel, les études immunohistochimiques ont révélé un marquage CYP11B2 sous-capsulaire continu dans le 21-OHD par opposition à une perte du marquage CYP11B2 et une extension du marquage CYP11B1 vers la capsule dans les CD.

Chez les patients avec CD, il est possible que l'ACTH, *via* l'activation de la voie AMPc/PKA, réprime le phénotype de type « zone glomérulée » dans les cellules corticosurrénaliennes, à l'image de ce qui a été montré chez la souris (Drelon *et al.*, 2016). Cette réduction de la ZG pourrait également s'expliquer par l'effet minéralocorticoïde des glucocorticoïdes à l'origine d'une inhibition du système rénine-angiotensine (Hunter *et al.*, 2014). De plus, les taux plasmatiques élevés d'ACTH favorisant une hypertrophie de la ZF, l'amincissement de la ZG pourrait éventuellement résulter d'un simple effet mécanique. Cette influence de l'ACTH sur la répression de la ZG et l'extension de la ZF a par ailleurs été décrite dans différents modèles animaux ayant subi un stress prolongé ou un traitement par l'ACTH (Ulrich-Lai *et al.*, 2006; Menzies *et al.*, 2017). Cette perturbation architecturale est associée à une augmentation de l'expression de CYP11B1, en accord avec la capacité de l'ACTH à favoriser l'expression de cette enzyme (Xing *et al.*, 2010).

Chez les patients avec 21-OHD, l'excès d'ACTH plasmatique, qui est présent dès la vie intra-utérine, explique vraisemblablement le remodelage histologique du cortex. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'architecture tissulaire observée est similaire à celle du cortex fœtal humain à 32 semaines de grossesse (Naccache *et al.*, 2016). L'importante stimulation des cellules de la ZG par l'élévation de l'AngII circulante, qui résulte du déficit en aldostérone, peut expliquer l'expression accrue de l'aldostérone synthase mais également l'hypertrophie compensatoire de la ZG visualisée par le marquage DAB2 (Aguilar *et al.*, 2004). De façon similaire chez le rat, une extension de l'expression de l'aldostérone synthase en réponse à un régime hyposodé a été décrite, par comparaison à la distribution de l'enzyme en régime normosodé (Nishimoto *et al.*, 2014). Il est important de souligner que les taux accrus d'AngII paraissent capables de s'opposer à l'action répressive de l'ACTH sur la ZG au cours du 21-OHD, ce qui suggère que l'activation de la voie du calcium peut contrebalancer efficacement la voie AMPc/PKA dans les cellules productrices d'aldostérone. Il serait intéressant d'évaluer également l'activité de la voie Wnt/β-caténine dans la ZG de ces tissus.

En conclusion, l'hyperstimulation des tissus surrénaliens par l'ACTH entraîne des modifications histologiques et fonctionnelles différentes chez les patients avec 21-OHD et les

patients avec CD. Ces disparités témoignent vraisemblablement des influences relatives de l'AngII et de l'ACTH sur le remodelage tissulaire et les capacités stéroïdogènes du cortex.

II. Impact de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression de récepteurs illégitimes

Le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans l'émergence de récepteurs illégitimes surrénaliens n'est pas connu. Une étude publiée par une équipe britannique a récemment alimenté le débat. Les auteurs présentaient le cas de 3 patientes souffrant d'hyperaldostéronisme lié à la présence d'un adénome de Conn, révélé durant la grossesse ou la ménopause, en relation avec une expression illégitime des récepteurs à la LH et à la GnRH dans les cellules corticosurrénaliennes (Teo *et al.*, 2015). Dans la mesure où les adénomes étaient porteurs d'une mutation gain-de-fonction du gène *CTNNB1*, les auteurs ont proposé que l'expression illicite des récepteurs de la LH et de la GnRH puisse témoigner d'une différenciation gonadique des tissus résultant d'une activation de la voie de la β-caténine par l'anomalie génétique. Un tel lien de causalité a cependant été mis en doute par la suite par d'autres équipes en montrant l'absence de corrélation entre ces deux anomalies moléculaires dans de plus larges séries (Gagnon *et al.*, 2018). Cette controverse nous a incités à évaluer de façon plus large, l'impact d'une activation de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des récepteurs illégitimes dans les cellules corticosurrénaliennes selon une démarche voisine de celle que nous avions employée pour l'étude des conséquences de l'activation de la voie AMPc/PKA sur le système sérotoninergique dans le PPNAD (Bram *et al.*, 2016). Nous nous sommes intéressés en premier lieu à un cas d'adénome surrénalien muté pour le gène *APC* dans le cadre d'une polypose familiale colique (FAP en anglais pour *familial adenomatous polyposis*), puis nous avons étudié l'effet de l'activation ou l'inhibition de la voie Wnt/ β-caténine dans différents modèles.

A. Récepteurs illégitimes dans un cas d'adénome surrénalien muté pour le gène *APC*

La FAP est liée à des mutations germinales inactivatrices hétérozygotes du gène *APC*. Lorsqu'intervient un second évènement génétique somatique sur l'allèle sain, les patients développent des tumeurs présentant une activation de la voie Wnt/β-caténine. Dans le cas que nous avons étudié, l'étude immunohistochimique a révélé une localisation nucléaire de la β-caténine dans les cellules stéroïdogènes tumorales. De plus, les analyses de PCR semi-quantitative ont montré que les taux d'ARNm *LEF1* et *AXIN2* étaient augmentés dans la tumeur du patient en comparaison à la surrénale normale, confirmant l'activation de la voie Wnt/β-caténine consécutive à une inactivation complète d'APC chez ce patient atteint de FAP. Bien

que le patient ne présentait aucun signe clinique ou biologique d'hypercortisolisme, l'étude des enzymes de la stéroïdogenèse a permis de détecter l'expression de la 17-hydroxylase et de la 11-hydroxylase dans la tumeur, deux enzymes de la voie de synthèse du cortisol. En accord avec ces observations, nous avons observé que les cellules tumorales en culture libéraient du cortisol de façon spontanée et en réponse à l'ACTH *via* l'activation du récepteur MC2-R fortement exprimé par la tumeur. L'absence de syndrome de Cushing clinique ou biologique chez le patient indique que la sécrétion de cortisol par la tumeur *in vivo* était insuffisante pour entraîner un hypercortisolisme significatif. La sensibilité des cellules tumorales à l'ACTH peut en outre expliquer la freination correcte de la cortisolémie par la dexaméthasone.

Nos résultats montrent par ailleurs que la tumeur du patient exprime différents récepteurs membranaires illégitimes conférant une sensibilité anormale du tissu à la 5-HT, l'hCG et le GIP. La susceptibilité excessive des cellules tumorales en culture à la 5-HT était liée à l'expression illicite du récepteur 5-HT_7, comme précédemment observé dans différents types de lésions corticosurrénaliennes (Louiset *et al.*, 2006; Bram *et al.*, 2016). Nos études immunohistochimiques ont en outre révélé l'expression anormale des récepteurs de la LH et du GIP bien corrélée avec les données issues des études fonctionnelles. Ces observations contrastent avec la mise en évidence, dans la tumeur, de taux bas d'ARNm codant ces récepteurs, similaires à ceux de la surrénale normale. La distribution très hétérogène des récepteurs dans le tissu tumoral, bien visualisée par l'immunohistochimie, permet d'expliquer cette discordance, les taux d'ARNm mesurés et les réponses sécrétoires des cellules en culture étant de ce fait très dépendants des sites des biopsies effectuées respectivement au sein de la tumeur pour les études fonctionnelles et les études de RT-PCR.

La présence de récepteurs membranaires illégitimes dans une tumeur présentant une activation de la voie Wnt/β-caténine d'origine génétique suggérait que la stimulation de cette voie de signalisation intracellulaire pouvait effectivement favoriser l'émergence de systèmes de régulation anormaux, comme proposé dans l'adénome de Conn (Teo *et al.*, 2015). Néanmoins, cette étude purement descriptive, menée en outre sur une unique tumeur, ne permettait pas d'affirmer un éventuel lien de causalité entre ces deux évènements. Nous avons donc décidé d'évaluer l'expression des récepteurs de la 5-HT de type 4 et 7, de la LH/hCG et du GIP dans différents modèles d'activation de la voie Wnt/β-caténine dans le tissu corticosurrénalien, incluant deux modèles de cellules corticosurrénaliennes (lignée H295R : résultats non présentés dans les articles en préparation, et cellules humaines normales en culture primaire) et dans un modèle murin génétiquement modifié.

B. Étude de l'effet de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des récepteurs illégitimes corticosurrénaliens

1. Expression des récepteurs illégitimes dans la lignée de cellules corticosurrénaliennes humaines H295R : impact de l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine

Les cellules H295R présentent une activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine causée par une mutation (S45P) dans l'exon 3 du gène *CTNNB1* (Tissier *et al.*, 2005). Par deux approches différentes, nous avons réprimé la voie Wnt/β-caténine dans ces cellules pour déterminer si l'inhibition de cette voie était ou non capable de réduire l'expression des gènes codant des récepteurs illégitimes. Dans un premier temps, nous avons bloqué la voie Wnt/β-caténine à l'aide de quatre inhibiteurs pharmacologiques, incluant deux molécules (JW74 et XAV939) inhibant la tankyrase, activateur de la voie Wnt/β-caténine qui interagit avec AXIN1 et AXIN2, et deux composés (iCRT14 et PKF118-310) qui préviennent la liaison entre TCF4 et la β-caténine au niveau nucléaire. La molécule iCRT14 s'est révélée être l'inhibiteur de la voie Wnt/β-caténine le plus efficace, et c'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'expression des récepteurs d'intérêt dans les cellules traitées avec cet agent pharmacologique (**Figure 28**).

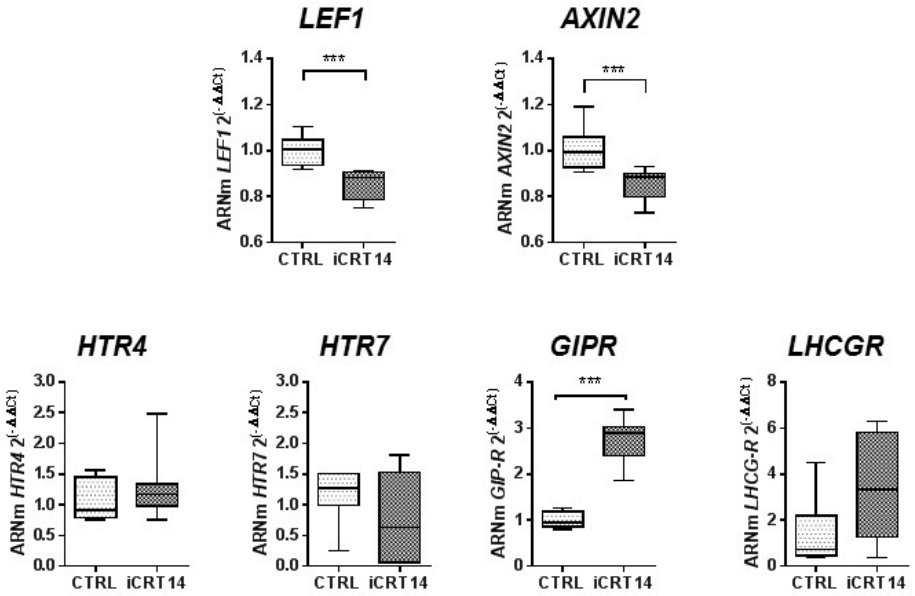
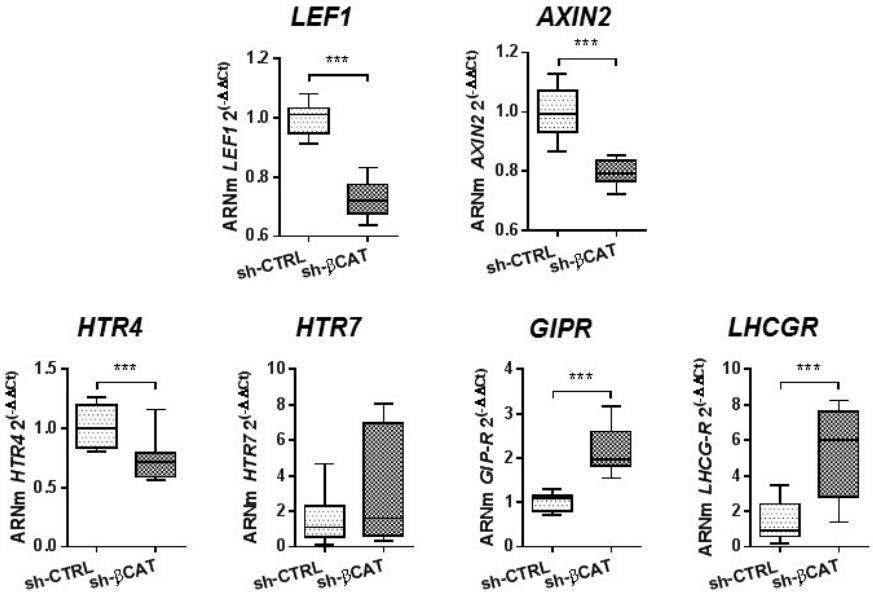


Figure 28 : Effets de l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des ARNm codant LEF1, AXIN2 et les récepteurs 5-HT$_4$, 5-HT$_7$, GIP-R et LH-R dans les cellules H295R. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec l'iCRT14 (10 µM ; n=8 lots de cellules pour chaque condition, test de Mann-Whitney, *** : ρ<0.001)

La spécificité des molécules de synthèse inhibant la voie Wnt/β-caténine étant imparfaite, nous avons également cherché à bloquer la voie dans les cellules H295R en

transfectant les cellules avec un sh-RNA (ARNm en « épingle à cheveux ») ciblant la β-caténine (sh-βCAT) (**Figure 29**).



<u>Figure 29</u> : Effets de l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine sur l'expression des ARNm codant LEF1, AXIN2 et les récepteurs 5-HT$_4$, 5-HT$_7$, GIP-R et LH-R dans les cellules transfectées H295R. Les cellules ont été transfectées avec des sh-RNA βCAT ou un sh-RNA contrôle (sh-CTRL ; n=12 lots de cellules pour chaque condition, test de Mann-Whitney, *** : ρ<0.001).

Les résultats obtenus dans les deux modèles d'inhibition étaient cohérents. L'expression des gènes *LEF1* et *AXIN2*, témoins de l'activité de la voie Wnt/β-caténine, était significativement diminuée, confirmant l'inhibition de la voie par les approches utilisées. En parallèle, nous avons observé une augmentation significative de l'expression du *GIPR* et du *LHCGR* dans les deux modèles, s'avérant significative dans les cellules H295R transfectées avec les sh-RNA β-caténine. Nous en avons conclu qu'une diminution de l'activité β-caténine dans les cellules H295R était responsable d'une élévation de l'expression des récepteurs du GIP et de la LH/hCG, ce qui n'était guère cohérent avec à la fois les observations effectuées dans la tumeur du patient muté pour le gène *APC* et les données de la littérature. En outre, les résultats des études menées sur les cellules H295R apparaissent difficiles à interpréter, ces cellules issues d'une tumeur maligne présentant de multiples anomalies moléculaires impactant diverses voies de signalisation et systèmes de transduction (Groussin *et al.*, 2000; Tissier *et al.*, 2005; Guimier *et al.*, 2013). Nous avons de ce fait considéré que le modèle des cellules H295R n'était pas adapté à notre démonstration et nous avons jugé indispensable de poursuivre nos études en activant la voie dans des cellules corticosurrénaliennes normales. Ce modèle

physiopathologique apparaît en effet le plus proche de la tumeur corticosurrénalienne du patient avec FAP, tumeur dont les caractéristiques étaient celles d'une tumeur bénigne.

2. *Activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes humaines et dans le cortex surrénalien dans le modèle murin génétiquement modifié ΔCat : impact sur l'expression des récepteurs illégitimes surrénaliens*

Nous avons par la suite activé constitutivement la voie Wnt/β-caténine dans des cellules corticosurrénaliennes humaines normales en culture primaire. Parallèlement, nous avons pu bénéficier du modèle murin développé par l'équipe du Dr Pierre Val de l'Université de Clermont-Ferrand, présentant une activation constitutive ciblée de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien. Le gène *AXIN2* (*Axin2* chez la souris) était significativement plus exprimé dans les deux modèles, témoignant de l'activation de la voie Wnt/β-caténine. Aucune variation significative de l'expression de *HTR7Htr7* n'a été observée dans les cellules humaines transfectées ou chez la souris. De même, l'expression du gène *HTR4* n'était pas significativement impactée par l'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules humaines. Son expression n'a pas été étudiée dans le modèle murin qui n'exprime pas le récepteur 5-HT_4 au niveau surrénalien.

La surexpression de la β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes humaines a montré une augmentation significative de l'expression du récepteur à la LH/hCG. Ces résultats sont cohérents avec les données issues de la tumeur du patient. Il est intéressant de noter que des résultats similaires ont été obtenus dans le modèle murin bien que ce dernier ne reproduise pas parfaitement les anomalies moléculaires rencontrées en pathologie humaine. En effet, la délétion de la totalité de l'exon 3 du gène *CTNNB1* dans le cortex surrénalien de ces souris entraîne la perte de la totalité des sites de phosphorylation de la β-caténine. Cette élimination drastique des sites de régulation contrôlant la dégradation de la β-caténine diffère des anomalies génétiques ponctuelles pouvant être rencontrées chez l'Homme, anomalies qui ne touchent généralement qu'un site de régulation.

C. Synthèse

Nous avons montré pour la première fois que l'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes humaines et murines favorise l'expression du LH-R. Chez le patient souffrant de FAP, ces résultats permettent d'expliquer l'expression du LH-R dans les cellules productrices de cortisol. A cet égard, il est intéressant de noter que la β-

caténine est nécessaire à l'expression du LH-R dans les cellules ovariennes de la granulosa (Law *et al.*, 2013). L'utilisation d'un modèle murin a permis à une équipe finlandaise d'établir un possible lien entre l'expression du LH-R et celle du facteur de transcription GATA4 dans les pathologies surrénaliennes (Vuorenoja *et al.*, 2007). Le facteur GATA4 jouant un rôle majeur dans l'acquisition d'un phénotype gonadique par les cellules stéroïdogènes (She and Yang, 2014), ces résultats indiquent que l'expression anormale du récepteur LH/hCG dans le cortex surrénalien murin est le reflet d'une différenciation gonadique. Néanmoins, l'étude de l'expression de *GATA4* par PCR quantitative dans les cellules corticosurrénaliennes humaines transfectées n'a pas montré de différence significative entre les cellules contrôles et les cellules sh-βCAT (**Figure 30**).

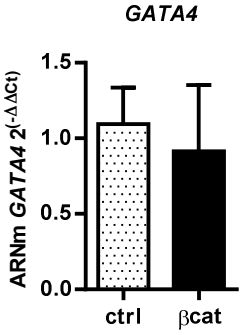


Figure 30 : Expression du facteur de transcription GATA4 dans les cellules corticosurrénaliennes humaines transfectées étudiées par RT-PCR quantitative. Les cellules ont été transfectées avec des shRNA βCAT ou un shRNA contrôle (sh-CTRL ; n=4 surrénales pour chaque condition).

Nos observations laissent donc penser que l'activation de la voie Wnt/β-caténine dans les cellules corticosurrénaliennes pourrait être capable d'induire l'expression du récepteur LH/hCG indépendamment d'une différenciation gonadique des tissus, contrairement au mécanisme proposé par l'équipe du Dr Morris Brown dans les adénomes de Conn (Teo *et al.*, 2015). A cet égard, le rôle des mutations somatiques du gène *CTNNB1* dans l'induction du récepteur LH/hCG dans les adénomes de Conn est maintenant très débattu. Il est en effet établi que tous les adénomes de Conn mutés pour le gène *CTNNB1* n'expriment pas le LH-R (Gagnon *et al.*, 2018). D'autre part, si seule une faible fraction des adénomes de Conn est mutée pour *CTNNB1*, la quasi-totalité d'entre eux présente une activation de la β-caténine, qui semble donc alors relever d'un autre mécanisme restant à identifier (Berthon *et al.*, 2014; Fernandes-Rosa *et al.*, 2017), alors même que l'expression du récepteur LH/hCG ne concerne qu'une fraction des tumeurs (Zwermann *et al.*, 2009; St-Jean *et al.*, 2018). Il apparaît par conséquent que

l'activation de la voie Wnt/β-caténine est probablement nécessaire mais pas suffisante pour déclencher l'expression illégitime de récepteurs à la LH couplés à une synthèse de stéroïdes dans les cellules productrices d'aldostérone.

Les discordances entre nos données et celles de l'équipe britannique pourraient également relever de la nature différente des tumeurs étudiées : dans l'adénome de Conn, le LH-R est couplé à une synthèse d'aldostérone tandis que chez notre patient, le LH-R était associé à une sécrétion de cortisol. Il faut d'ailleurs souligner que les adénomes mutés pour le gène *CTNNB1* correspondent généralement à des tumeurs peu actives au niveau de la sécrétion de cortisol (Ronchi *et al.*, 2016), ce qui est en accord avec l'absence d'anomalie sécrétoire patente chez le patient. En outre, les cellules corticosurrénaliennes humaines transfectées correspondaient pour leur grande majorité à des cellules cortisolosécrétrices, les cellules productrices d'aldostérone ne représentant qu'une très faible proportion des cellules du cortex surrénalien.

Les données issues des modèles cellulaires humain et murin permettent de conclure que la surexpression du récepteur 5-HT_7 dans la tumeur du patient ne peut en revanche être rattachée à l'activation de la voie Wnt/β-caténine. Une activation de la voie AMPc/PKA pourrait être en cause mais un tel mécanisme entraînerait également une surexpression du récepteur 5-HT_4 (Bram *et al.*, 2016), ce qui n'est pas le cas. L'expression du récepteur du GIP ne semble pas elle aussi influencée par la stimulation de la β-caténine. Sa détection dans la tumeur du patient semble donc être la conséquence d'une autre anomalie génétique somatique, telle qu'une microduplication du gène du récepteur par exemple (Lecoq *et al.*, 2017).

III. Conclusion et perspectives

A. Perspectives expérimentales

Les mécanismes moléculaires qui relient les anomalies génétiques aux boucles de régulation illégitimes demeurent mal connus. Diverses pistes de travail s'offrent à nous, et notamment l'étude de la différenciation gonadique et de la méthylation des promoteurs des gènes codant des récepteurs anormalement exprimés à la surface des cellules stéroïdogènes.

Dans les HMBS, l'expression du récepteur de la LH ou du 5-HT_7 dans certaines populations de cellules semble plutôt relever d'une anomalie de la différenciation surrénalienne, de type gonadique, comme cela a été montré par notre équipe dans les HMBS *via* la mise en évidence du marqueur gonadique INSL3 dans une sous-population de cellules

stéroïdogènes exprimant l'ACTH (Louiset *et al.*, 2013). Il est possible que certaines cellules au destin gonadique se soient localisées dans le tissu surrénalien à l'issue d'une séparation imparfaite des deux composantes du primordium adrénogonadique. Sous l'influence d'un stimulus tel que des taux plasmatiques d'hCG élevés, ces cellules gonadiques en sommeil pourraient exprimer des récepteurs de type LH-R, couplés à une synthèse de corticostéroïdes, selon un processus partiellement cohérent avec l'hypothèse émise par l'équipe du Dr Morris Brown (Teo *et al.*, 2015). Ce mécanisme pourrait constituer l'image en miroir des inclusions surrénaliennes intra-testiculaires (TART en anglais pour *testicular adrenal rest tumor*) ou intra-ovariennes (*ovarian adrenal rest*) observées au cours des blocs enzymatiques en 21-hydroxylase. Ces tissus ectopiques sont composés de cellules au destin surrénalien enclavées dans le tissu testiculaire ou ovarien mais qui, sous l'influence de taux plasmatiques d'ACTH élevés, peuvent générer des pseudo-tumeurs impactant la fertilité (Claahsen-van der Grinten *et al.*, 2009). Les cellules de ces lésions intra-gonadiques présentent des anomalies de la différenciation possiblement favorisées par une expression anormale des facteurs GATA3, GATA4 et GATA6 (Engels *et al.*, 2017). Notre équipe va donc maintenant chercher à préciser le phénotype des cellules pseudo-gonadiques des HMBS, en étudiant notamment l'expression d'autres marqueurs gonadiques incluant certains facteurs transcriptionnels.

A côté des anomalies génétiques somatiques, des modifications épigénétiques pourraient également favoriser l'expression anormale de récepteurs illégitimes. Ainsi, des perturbations de la méthylation (incluant hypo- et hyperméthylation) de promoteurs de gènes ont été bien décrites dans plusieurs types de lésions surrénaliennes (Garinet *et al.*, 2017). En particulier, une hypométhylation du promoteur du gène *HTR4* a été montrée dans les adénomes de Conn susceptible d'expliquer l'hyperexpression du récepteur 5-HT_4 dans ce type de tumeur corticosurrénalienne (Itcho *et al.*, 2018). Il sera donc intéressant d'étudier ce mécanisme dans les HMBS pour différents récepteurs illégitimes dont le récepteur 5-HT_4 et les récepteurs du GIP et de la LH.

B. Perspectives cliniques et thérapeutiques

Nos résultats suggèrent que la voie de signalisation 5-HT intrasurrénalienne est impliquée dans l'hypersécrétion de corticostéroïdes associée à diverses pathologies incluant la maladie de Cushing et le syndrome de Cushing paranéoplasique, le bloc en 21-hydroxylase, l'HMBS et l'adénome corticosurrénalien cortisolosécréteur. Le recours à des inhibiteurs sélectifs de la tryptophane hydroxylase ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, comme le télotristat, pourrait donc permettre de réduire l'excès de stéroïdes chez les patients

atteints de ces affections. Le télotristat est en effet d'ores et déjà utilisé dans le traitement des troubles digestifs du syndrome carcinoïde avec une bonne efficacité sur la diarrhée et une tolérance satisfaisante (Loughrey *et al.*, 2018). Le télotristat pourrait se montrer particulièrement intéressant chez les patients atteint d'adénome cortisolosécréteur à titre de préparation à la chirurgie et chez les patientes avec déficit en 21-hydroxylase gardant des taux élevés d'androgènes malgré l'administration de doses freinatrices de glucocorticoïdes. Il semble en revanche douteux que l'inhibition de la synthèse surrénalienne de 5-HT par le télotristat puisse réduire significativement l'hypercortisolisme associé à la maladie de Cushing et à la sécrétion ectopique d'ACTH, eu égard au rôle stimulant prédominant de l'ACTH sur la production de cortisol. On peut simplement souligner que nos résultats incitent à proscrire l'emploi des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT dans le cadre de la prise en charge thérapeutique du syndrome dépressif des patients atteints de maladie de Cushing (Santos *et al.*, 2017).

Conclusion générale

Notre travail de thèse démontre l'existence de liens fonctionnels entre l'activation des voies de signalisation intracellulaire et l'émergence de systèmes de régulation aberrants rencontrées dans les néoplasies corticosurrénaliennes. Au-delà de leur intérêt physiopathologique, nos résultats permettent d'envisager des perspectives thérapeutiques nouvelles ciblant notamment la synthèse intrasurrénalienne de sérotonine. La confrontation de nos données avec celles de la littérature suggère d'ailleurs que la boucle de régulation sérotoninergique surrénalienne correspond en fait à un mécanisme physiologique inductible lors du stress par l'ACTH plasmatique et activé de façon illicite dans certaines pathologies surrénaliennes associées à l'activation de la voie AMPc/PKA dans les cellules corticosurrénaliennes.

Références

Références

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, and Krieger M (1996) Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* **271**:518–520.

Aguilar F, Lo M, Claustrat B, Saez JM, Sassard J, and Li JY (2004) Hypersensitivity of the adrenal cortex to trophic and secretory effects of angiotensin II in Lyon genetically-hypertensive rats. *Hypertens Dallas Tex 1979* **43**:87–93.

Ahmed AH, Calvird M, Gordon RD, Taylor PJ, Ward G, Pimenta E, Young R, and Stowasser M (2011) Effects of two selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants, sertraline and escitalopram, on aldosterone/renin ratio in normotensive depressed male patients. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:1039–1045.

Aiba M, Iri H, Suzuki H, Kageyama K, Kawai T, Abe O, Murai M, Tazaki H, and Saruta T (1985) Numerous mast cells in an 11-deoxycorticosterone-producing adrenocortical tumor. Histologic evaluation of benignancy and comparison with mast cell distribution in adrenal glands and neoplastic counterparts of 67 surgical specimens. *Arch Pathol Lab Med* **109**:357–360.

Åkerström T, Maharjan R, Sven Willenberg H, Cupisti K, Ip J, Moser A, Stålberg P, Robinson B, Alexander Iwen K, Dralle H, Walz MK, Lehnert H, Sidhu S, Gomez-Sanchez C, Hellman P, and Björklund P (2016) Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep* **6**.

Albani Adriana, Theodoropoulou Marily, and Reincke Martin (2017) Genetics of Cushing's disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* **88**:3–12.

Albiger NM, Sartorato P, Mariniello B, Iacobone M, Finco I, Fassina A, and Mantero F (2011) A case of primary aldosteronism in pregnancy: do LH and GNRH receptors have a potential role in regulating aldosterone secretion? *Eur J Endocrinol* **164**:405–412.

Aldrich TB (1901) A preliminary report on the active principle of the suprarenal gland. *Am J Physiol-Leg Content* **5**:457–461.

Al-Dujaili EA, Boscaro M, and Edwards CR (1982) An in vitro stimulatory effect of indoleamines on aldosterone biosynthesis in the rat. *J Steroid Biochem* **17**:351–355.

Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BM de P, Almeida MQ, Tremblay J, Hamet P, Bourdeau I, Zerbini MCN, Pereira MAA, Gomes GC, Rocha M de S, Chambo JL, Lacroix A, Mendonca BB, and Fragoso MCBV (2014) ARMC5 mutations are a frequent cause of primary macronodular adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:E1501-1509.

Almeida MQ, Azevedo MF, Xekouki P, Bimpaki EI, Horvath A, Collins MT, Karaviti LP, Jeha GS, Bhattacharyya N, Cheadle C, Watkins T, Bourdeau I, Nesterova M, and Stratakis CA (2012) Activation of Cyclic AMP Signaling Leads to Different Pathway Alterations in Lesions of the Adrenal Cortex Caused by Germline PRKAR1A Defects versus Those due to Somatic GNAS Mutations. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:E687–E693.

Almeida MQ, and Stratakis CA (2010) Carney complex and other conditions associated with micronodular adrenal hyperplasias. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **24**:907–914.

Amin AH, Crawford TB, and Gaddum JH (1954) The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol* **126**:596–618.

Andressen KW, Ulsund AH, Krobert KA, Lohse MJ, Bünemann M, and Levy FO (2018) Related GPCRs couple differently to Gs: preassociation between G protein and 5-HT7 serotonin receptor reveals movement of Gαs upon receptor activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **32**:1059–1069.

Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, and Strauss JF (1997) Phosphorylation of Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) Modulates Its Steroidogenic Activity. *J Biol Chem* **272**:32656–32662.

Arlt W, and Stewart PM (2005) Adrenal Corticosteroid Biosynthesis, Metabolism, and Action. *Endocrinol Metab Clin North Am* **34**:293–313.

Arnold J (1866) Ein beitrag zu der feineren structur und dem chemismus der nebennieren. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* **39**:64–117.

Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, Barreau O, Lefèvre L, Sibony M, Guignat L, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Letourneur F, Trabulsi B, Poussier A, Chabbert-Buffet N, Borson-Chazot F, Groussin L, Bertagna X, Stratakis CA, Ragazzon B, and Bertherat J (2013) ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med* **369**:2105–2114.

Assie G, Louiset E, Sturm N, René-Corail F, Groussin L, Bertherat J, Thomas M, Lefebvre H, Feige J-J, Clauser E, Chabre O, and 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**:E253-262.

Azhar S, and Reaven E (2002) Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **195**:1–26.

Ballav C, Naziat A, Mihai R, Karavitaki N, Ansorge O, and Grossman AB (2012) Mini-review: pheochromocytomas causing the ectopic ACTH syndrome. *Endocrine* **42**:69–73.

Bandiera R, Vidal VPI, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, Pu WT, Hohenstein P, Martinez A, and Schedl A (2013) WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell* **27**:5–18.

Bardin CW, Chen CL, Morris PL, Gerendai I, Boitani C, Liotta AS, Margioris A, and Krieger DT (1987) Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. *Recent Prog Horm Res* **43**:1–28.

Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, and Rivarola MA (2009) Genetic and Clinical Spectrum of Aromatase Deficiency in Infancy, Childhood and Adolescence. *Horm Res Paediatr* **72**:321–330.

Ben-David S, Zuckerman-Levin N, Epelman M, Shen-Orr Z, Levin M, Sujov P, and Hochberg Z (2007) Parturition Itself Is the Basis for Fetal Adrenal Involution. *J Clin Endocrinol Metab* **92**:93–97.

Berger M, Gray JA, and Roth BL (2009) The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* **60**:355–366.

Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn J-M, Vaudry H, and Lefebvre H (2005) In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's

syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:1302–1310.

Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, and Stratakis CA (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.

Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, and Stratakis CA (2009) Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* **94**:2085–2091.

Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro M-C, Plouin P-F, Skah S, Plateroti M, Lefèbvre H, Sahut-Barnola I, Batisse-Lignier M, Assié G, Lefrançois-Martinez A-M, Bertherat J, Martinez A, and Val P (2014) WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet* **23**:889–905.

Berthon Annabel, Faucz F, Bertherat J, and Stratakis CA (2017) Analysis of ARMC5 expression in human tissues. *Mol Cell Endocrinol* **441**:140–145.

Berthon A., Faucz FR, Espiard S, Drougat L, Bertherat J, and Stratakis CA (2017) Age-dependent effects of Armc5 haploinsufficiency on adrenocortical function. *Hum Mol Genet* **26**:3495–3507.

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 MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A, and Val P (2010) Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* **19**:1561–1576.

Betancourt-Calle S, Calle RA, Isales CM, White S, Rasmussen H, and Bollag WB (2001) Differential effects of agonists of aldosterone secretion on steroidogenic acute regulatory phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol* **173**:87–94.

Beuschlein F, Fassnacht M, Assié G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, Ronchi CL, Wieland T, Sbiera S, Faucz FR, Schaak K, Schmittfull A, Schwarzmayr T, Barreau O, Vezzosi D, Rizk-Rabin M, Zabel U, Szarek E, Salpea P, Forlino A, Vetro A, Zuffardi O, Kisker C, Diener S, Meitinger T, Lohse MJ, Reincke M, Bertherat J, Strom TM, and Allolio B (2014) Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* **370**:1019–1028.

Beyer HS, Matta SG, and Sharp BM (1988) Regulation of the Messenger Ribonucleic Acid for Corticotropin-Releasing Factor in the Paraventricular Nucleus and Other Brain Sites of the Rat. *Endocrinology* **123**:2117–2123.

Bing RF, and Schulster D (1977) Steroidogenesis in isolated rat adrenal glomerulosa cells: response to physiological concentrations of angiotensin II and effects of potassium, serotonin and [Sar1,Ala8]-angiotensin II. *J Endocrinol* **74**:261–272.

Bockaert J, Claeysen S, Compan V, and Dumuis A (2011) 5-HT(4) receptors, a place in the sun: act two. *Curr Opin Pharmacol* **11**:87–93.

Bollag WB (2014) Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol* **4**:1017–1055.

Bolt RJ, van Weissenbruch MM, Lafeber HN, and Delemarre-van de Waal HA (2001) Glucocorticoids and lung development in the fetus and preterm infant. *Pediatr Pulmonol* **32**:76–91.

Boonen E, Bornstein SR, and Van den Berghe G (2015) New insights into the controversy of adrenal function during critical illness. *Lancet Diabetes Endocrinol* **3**:805–815.

Boonen E, Vervenne H, Meersseman P, Andrew R, Mortier L, Declercq PE, Vanwijngaerden Y-M, Spriet I, Wouters PJ, Vander Perre S, Langouche L, Vanhorebeek I, Walker BR, and Van den Berghe G (2013) Reduced cortisol metabolism during critical illness. *N Engl J Med* **368**:1477–1488.

Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, and Herman JP (2008) Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab TEM* **19**:175–180.

Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, and Scherbaum WA (1994) Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* **78**:225–232.

Bornstein SR, Rutkowski H, and Vrezas I (2004) Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **215**:135–141.

Böse J, Grotewold L, and Rüther U (2002) Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Hum Mol Genet* **11**:1129–1135.

Boston BA, Mandel S, LaFranchi S, and Bliziotes M (1994) Activating mutation in the stimulatory guanine nucleotide-binding protein in an infant with Cushing's syndrome and nodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **79**:890–893.

Boulkroun S, Samson-Couterie B, Golib-Dzib J-F, Amar L, Plouin P-F, Sibony M, Lefebvre H, Louiset E, Jeunemaitre X, Meatchi T, Benecke A, Lalli E, and Zennaro M-C (2011) Aldosterone-Producing Adenoma Formation in the Adrenal Cortex Involves Expression of Stem/Progenitor Cell Markers. *Endocrinology* **152**:4753–4763.

Bourdeau I, D'Amour P, Hamet P, Boutin JM, and Lacroix A (2001) Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:5534–5540.

Bourdeau I, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Sandrini F, Boikos S, and Stratakis CA (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.

Boyer H-G, Wils J, Renouf S, Arabo A, Duparc C, Boutelet I, Lefebvre H, and Louiset E (2017) Dysregulation of Aldosterone Secretion in Mast Cell-Deficient Mice. *Hypertens Dallas Tex 1979* **70**:1256–1263.

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, and Saxena PR (1986) Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* **25**:563–576.

Bram Z, Louiset E, Ragazzon B, Renouf S, Wils J, Duparc C, Boutelet I, Rizk-Rabin M, Libé R, Young J, Carson D, Vantyghem M-C, Szarek E, Martinez A, Stratakis CA, Bertherat J, and Lefebvre H (2016) PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight* **1**.

Brattelid T, Qvigstad E, Lynham JA, Molenaar P, Aass H, Geiran O, Skomedal T, Osnes J-B, Levy FO, and Kaumann AJ (2004) Functional serotonin 5-HT4 receptors in porcine and human ventricular myocardium with increased 5-HT4 mRNA in heart failure. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **370**:157–166.

Breault L, Lehoux J-G, and Gallo-Payet N (1996) The angiotensin AT2 receptor is present in the human fetal adrenal gland throughout the second trimester of gestation. *J Clin Endocrinoloy Metab* **81**:3914–22.

Brodie BB, and Shore PA (1957) A concept for a role of serotonin and norepinephrine as chemical mediators in the brain. *Ann N Y Acad Sci* **66**:631–642.

Brooks AN, Hagan DM, and Howe DC (1996) Neuroendocrine regulation of pituitary-adrenal function during fetal life. *Eur J Endocrinol* **135**:153–165.

Brown-Séquard CE (1893) On a New Therapeutic Method Consisting in the Use of Organic Liquids Extracted from Glands and Other Organs. *Br Med J* **1**:1212–1214.

Burns M, and Rebeck GW (2010) Intracellular cholesterol homeostasis and amyloid precursor protein processing. *Biochim Biophys Acta* **1801**:853–859.

Busada JT, and Cidlowski JA (2017) Chapter Five - Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development, in *Current Topics in Developmental Biology* (Forrest D, and Tsai S eds) pp 147–170, Academic Press.

Cain DW, and Cidlowski JA (2017) Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* **17**:233–247.

Calebiro D, Dalmazi GD, Bathon K, Ronchi CL, and Beuschlein F (2015) cAMP signaling in cortisol-producing adrenal adenoma. *Eur J Endocrinol* **173**:M99–M106.

Carlson LA, Ekelund LG, and Orö L (1967) Metabolic and cardio-vascular effects of serotonin. *Life Sci* **6**:261–271.

Carrasco GA, and Van de Kar LD (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* **463**:235–272.

Cartier D, Jégou S, Parmentier F, Lihrmann I, Louiset E, Kuhn J-M, Bastard C, Plouin P-F, Godin M, Vaudry H, and Lefebvre H (2005) Expression profile of serotonin4 (5-HT4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* **153**:939–947.

Cartier D, Lihrmann I, Parmentier F, Bastard C, Bertherat J, Caron P, Kuhn J-M, Lacroix A, Tabarin A, Young J, Vaudry H, and Lefebvre H (2003) Overexpression of serotonin4 receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:248–254.

Carvalho RF, Ribeiro RA, Falcão RA, Lima RC, Leitão RFC, Alcantara C, Souza MHLP, Cunha FQ, and Brito GAC (2006) Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation. *Eur J Pharmacol* **540**:175–182.

Cavalcante IP, Clauser E, Vaczlavik A, Drougat L, Lotfi C, Fragoso M, Rizk-Rabin M, Bertherat J, and Ragazzon B (2018) Cullin 3 is a partner of Armadillo repeat containing 5 (ARMC5), the product of the gene responsible for primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *Ann Endocrinol* **79**:184–185.

Cavalcante IP, Nishi M, Zerbini MCN, Almeida MQ, Brondani VB, Botelho MLA de A, Tanno FY, Srougi V, Chambo JL, Mendonca BB, Bertherat J, Lotfi CFP, and Fragoso MCBV (2018) The role of ARMC5 in human cell cultures from nodules of primary macronodular adrenocortical hyperplasia (PMAH). *Mol Cell Endocrinol* **460**:36–46.

Ceccato F, and Boscaro M (2016) Cushing's Syndrome: Screening and Diagnosis. *High Blood Press Cardiovasc Prev Off J Ital Soc Hypertens* **23**:209–215.

Cerrito F, Lazzaro MP, Gaudio E, Arminio P, and Aloisi G (1993) 5HT2-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. *Life Sci* **53**:209–215.

Chabre O (2014) [Cushing syndrome: Physiopathology, etiology and principles of therapy]. *Presse Médicale Paris Fr 1983* **43**:376–392.

Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, and Newnham J (2001) The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* **185**:135–144.

Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ, and Vahouny GV (1982) Sterol carrier protein2. Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem* **257**:8928–8934.

Chang YT, Mues G, and Hyland K (1996) Alternative splicing in the coding region of human aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA. *Neurosci Lett* **202**:157–160.

Chhajlani V, Muceniece R, and Wikberg JES (1993) Molecular Cloning of a Novel Human Melanocortin Receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **195**:866–873.

Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, and Iwakura Y (2007) Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18205–18210.

Ching S, and Vilain E (2009) Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *genesis* **47**:628–637.

Chung S, Son GH, and Kim K (2011) Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: Its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1812**:581–591.

Claahsen-van der Grinten HL, Otten BJ, Stikkelbroeck MML, Sweep FCGJ, and Hermus ARMM (2009) Testicular adrenal rest tumours in congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **23**:209–220.

Clark AJ, and Weber A (1998) Adrenocorticotropin insensitivity syndromes. *Endocr Rev* **19**:828–843.

Clark BJ, Wells J, King SR, and Stocco DM (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* **269**:28314–28322.

Clem BF, Hudson EA, and Clark BJ (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.

Conconi MT, Spinazzi R, and Nussdorfer GG (2006) Endogenous ligands of PACAP/VIP receptors in the autocrine-paracrine regulation of the adrenal gland. *Int Rev Cytol* **249**:1–51.

Contesse V, Hamel C, Lefebvre H, Dumuis A, Vaudry H, and Delarue C (1996) Activation of 5-hydroxytryptamine4 receptors causes calcium influx in adrenocortical cells: involvement of calcium in 5-hydroxytryptamine-induced steroid secretion. *Mol Pharmacol* **49**:481–493.

Contesse V, Lefebvre H, Lenglet S, Kuhn JM, Delarue C, and Vaudry H (2000) Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells. *Can J Physiol Pharmacol* **78**:967–983.

Contesse V, Reznik Y, Louiset E, Duparc C, Cartier D, Sicard F, Laquerriere A, Parmentier F, Kuhn J-M, Vaudry H, and Lefebvre H (2005) Abnormal sensitivity of cortisol-producing adrenocortical adenomas to serotonin: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* **90**:2843–2850.

Crane JD, Palanivel R, Mottillo EP, Bujak AL, Wang H, Ford RJ, Collins A, Blümer RM, Fullerton MD, Yabut JM, Kim JJ, Ghia J-E, Hamza SM, Morrison KM, Schertzer JD, Dyck JRB, Khan WI, and Steinberg GR (2015) Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat Med* **21**:166–172.

Crowder RE (1957) The development of the adrenal gland in man, with special reference to origin and ultimate location of cell types and evidence in favor of the "cell migration" theory, in *Contributions to Embryology* pp 193–210, Carnegie Institute of Washington.

Crowell MD (2004) Role of serotonin in the pathophysiology of the irritable bowel syndrome. *Br J Pharmacol* **141**:1285–1293.

Da Prada M, and Picotti GB (1979) Content and subcellular localization of catecholamines and 5-hydroxytryptamine in human and animal blood platelets: monoamine distribution between platelets and plasma. *Br J Pharmacol* **65**:653–662.

Dahlstroem A, and Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand Suppl* SUPPL 232:1-55.

Daidoh H, Morita H, Mune T, Murayama M, Hanafusa J, Ni H, Shibata H, and Yasuda K (1995) Responses of plasma adrenocortical steroids to low dose ACTH in normal subjects. *Clin Endocrinol (Oxf)* **43**:311–315.

Davenport AP, Hoskins SL, Kuc RE, and Plumpton C (1996) Differential distribution of endothelin peptides and receptors in human adrenal gland. *Histochem J* **28**:779–789.

de Joussineau C, Sahut-Barnola I, Levy I, Saloustros E, Val P, Stratakis CA, and Martinez A (2012) The cAMP pathway and the control of adrenocortical development and growth. *Mol Cell Endocrinol* **351**:28–36.

de Joussineau C, Sahut-Barnola I, Tissier F, Dumontet T, Drelon C, Batisse-Lignier M, Tauveron I, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M, Stratakis CA, Bertherat J, Val P, and Martinez A (2014) mTOR pathway is activated by PKA in adrenocortical cells and participates in vivo to apoptosis resistance in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). *Hum Mol Genet* **23**:5418–5428.

De Marchis ML, Tonelli F, Quaresmini D, Lovero D, Della-Morte D, Silvestris F, Guadagni F, and Palmirotta R (2017) Desmoid Tumors in Familial Adenomatous Polyposis. *Anticancer Res* **37**:3357–3366.

Degawa-Yamauchi M, Moss KA, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, Vidal-Puig A, Jones R, and Considine RV (2005) Regulation of adiponectin expression in human adipocytes: effects of adiposity, glucocorticoids, and tumor necrosis factor alpha. *Obes Res* **13**:662–669.

Deiraldi AP, Zieher LM, and Derobertis E (1963) The 5-hydroxytryptamine content and synthesis of normal and denervated pineal gland. *Life Sci 1962* **9**:691–696.

Delarue C, Conlon JM, Remy-Jouet I, Fournier A, and Vaudry H (2004) Endothelins as local activators of adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* **32**:1–7.

Delarue C, Lefebvre H, Idres S, Leboulenger F, Homo-Delarche G, Lihrmann I, Feuilloley M, and Vaudry H (1988) Serotonin stimulates corticosteroid secretion by frog adrenocortical tissue in vitro. *J Steroid Biochem* **29**:519–525.

Di Dalmazi G, Kisker C, Calebiro D, Mannelli M, Canu L, Arnaldi G, Quinkler M, Rayes N, Tabarin A, Laure Jullié M, Mantero F, Rubin B, Waldmann J, Bartsch DK, Pasquali R, Lohse M, Allolio B, Fassnacht M, Beuschlein F, and Reincke M (2014) Novel Somatic Mutations in the Catalytic Subunit of the Protein Kinase A as a Cause of Adrenal Cushing's Syndrome: A European Multicentric Study. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:E2093–E2100.

Dinh Cat AN, Friederich-Persson M, White A, and Touyz RM (2016) Adipocytes, aldosterone and obesity-related hypertension. *J Mol Endocrinol* **57**:F7–F21.

Doi Y, Atarashi K, Franco-Saenz R, and Mulrow PJ (1984) Effect of changes in sodium or potassium balance, and nephrectomy, on adrenal renin and aldosterone concentrations. *Hypertens Dallas Tex 1979* **6**:I124-129.

Dörner J, Martinez Rodriguez V, Ziegler R, Röhrig T, Cochran RS, Götz RM, Levin MD, Pihlajoki M, Heikinheimo M, and Wilson DB (2017) GLI1+ progenitor cells in the adrenal capsule of the adult mouse give rise to heterotopic gonadal-like tissue. *Mol Cell Endocrinol* **441**:164–175.

Doroszko M, Chrusciel M, Stelmaszewska J, Slezak T, Rivero-Muller A, Padzik A, Anisimowicz S, Wolczynski S, Huhtaniemi I, Toppari J, and Rahman NA (2017) Luteinizing Hormone and GATA4 Action in the Adrenocortical Tumorigenesis of Gonadectomized Female Mice. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* **43**:1064–1076.

Dostert A, and Heinzel T (2004) Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* **10**:2807–2816.

Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Tabbal H, Tauveron I, Lefrançois-Martinez A-M, Pointud J-C, Gomez-Sanchez CE, Vainio S, Shan J, Sacco S, Schedl A, Stratakis CA, Martinez A, and Val P (2016) PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. *Nat Commun* **7**.

Drougat L, Espiard S, and Bertherat J (2015) Genetics of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia: a model for early diagnosis of Cushing's syndrome? *Eur J Endocrinol* **173**:M121-131.

Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, Cory R, and Bockaert J (1988) A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol* **34**:880–887.

Dunn JCY, Chu Y, Qin HH, and Zupekan T (2009) Transplantation of Adrenal Cortical Progenitor Cells Enriched by Nile Red. *J Surg Res* **156**:317–324.

Duparc C, Moreau L, Dzib JFG, Boyer H-G, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Boulkroun S, Mukai K, Benecke AG, Amar L, Gobet F, Meatchi T, Plouin P-F, Zennaro M-C, Louiset E, and Lefebvre H (2015) Mast Cell Hyperplasia Is Associated With Aldosterone Hypersecretion in a Subset of Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **100**:E550–E560.

Eglen RM, Wong EH, Dumuis A, and Bockaert J (1995) Central 5-HT4 receptors. *Trends Pharmacol Sci* **16**:391–398.

Ehrhart-Bornstein M, Haidan A, Alesci S, and Bornstein SR (2000) Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocr Res* **26**:833–842.

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, and Vinson GP (1998) Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocr Rev* **19**:101–143.

Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, Hauner H, McCann SM, Scherbaum WA, and Bornstein SR (2003) Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:14211–14216.

El Ghorayeb N, Bourdeau I, and Lacroix A (2016) Role of ACTH and Other Hormones in the Regulation of Aldosterone Production in Primary Aldosteronism. *Front Endocrinol* **7**:72.

El Wakil A, and Lalli E (2011) The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol* **332**:32–37.

Elbelt U, Trovato A, Kloth M, Gentz E, Finke R, Spranger J, Galas D, Weber S, Wolf C, König K, Arlt W, Büttner R, May P, Allolio B, and Schneider JG (2015) Molecular and clinical evidence for an ARMC5 tumor syndrome: concurrent inactivating germline and somatic mutations are associated with both primary macronodular adrenal hyperplasia and meningioma. *J Clin Endocrinol Metab* **100**:E119-128.

El-Merahbi R, Löffler M, Mayer A, and Sumara G (2015) The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Lett* **589**:1728–1734.

Elustondo P, Martin LA, and Karten B (2017) Mitochondrial cholesterol import. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids* **1862**:90–101.

Engels M, Span PN, Mitchell RT, Heuvel JJTM, Marijnissen-van Zanten MA, van Herwaarden AE, Hulsbergen-van de Kaa CA, Oosterwijk E, Stikkelbroeck NM, Smith LB, Sweep FCGJ, and Claahsen-van der Grinten HL (2017) GATA transcription factors in testicular adrenal rest tumours. *Endocr Connect* **6**:866–875.

Erspamer V, and Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* **169**:800–801.

Espiard S, Drougat L, Libé R, Assié G, Perlemoine K, Guignat L, Barrande G, Brucker-Davis F, Doullay F, Lopez S, Sonnet E, Torremocha F, Pinsard D, Chabbert-Buffet N, Raffin-Sanson M-L, Groussin L, Borson-Chazot F, Coste J, Bertagna X, Stratakis CA, Beuschlein F, Ragazzon B,

and Bertherat J (2015) ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. *J Clin Endocrinol Metab* **100**:E926–E935.

Espiard S, Knape MJ, Bathon K, Assié G, Rizk-Rabin M, Faillot S, Luscap-Rondof W, Abid D, Guignat L, Calebiro D, Herberg FW, Stratakis CA, and Bertherat J (2018) Activating PRKACB somatic mutation in cortisol-producing adenomas. *JCI Insight* **3**.

Faillot S, and Assie G (2016) ENDOCRINE TUMOURS: The genomics of adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* **174**:R249–R265.

Falhammar H, and Nordenström A (2015) Nonclassic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: clinical presentation, diagnosis, treatment, and outcome. *Endocrine* **50**:32–50.

Feige JJ, and Baird A (1991) Growth factor regulation of adrenal cortex growth and function. *Prog Growth Factor Res* **3**:103–113.

Fernandes-Rosa FL, Boulkroun S, and Zennaro M-C (2017) Somatic and inherited mutations in primary aldosteronism. *J Mol Endocrinol* **59**:R47–R63.

Ferrari P (2010) The role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1802**:1178–1187.

Freedman BD, Kempna PB, Carlone DL, Shah M, Guagliardo NA, Barrett PQ, Gomez-Sanchez CE, Majzoub JA, and Breault DT (2013) Adrenocortical zonation results from lineage conversion of differentiated zona glomerulosa cells. *Dev Cell* **26**:666–673.

Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, Young WF, and Montori VM (2008) Case Detection, Diagnosis, and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **93**:3266–3281.

Gagnon N, Caceres K, Corbeil G, El Ghorayeb N, Ludwig N, Latour M, Lacroix A, and Bourdeau I (2018) Genetic Characterization of GnRH/LH- Responsive Primary Aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*, doi: 10.1210/jc.2018-00087.

Gallo-Payet N (2016) Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J Mol Endocrinol*, doi: 10.1530/JME-15-0257.

Gallo-Payet N, Pothier P, and Isler H (1987) On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell* **65**:588–592.

García-Iglesias BB, Mendoza-Garrido ME, Gutiérrez-Ospina G, Rangel-Barajas C, Noyola-Díaz M, and Terrón JA (2013) Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT_7 receptors. *Neuropharmacology* **71**:216–227.

Garinet S, Néou M, de La Villéon B, Faillot S, Sakat J, Da Fonseca JP, Jouinot A, Le Tourneau C, Kamal M, Luscap-Rondof W, Boeva V, Gaujoux S, Vidaud M, Pasmant E, Letourneur F, Bertherat J, and Assié G (2017) Calling Chromosome Alterations, DNA Methylation Statuses, and Mutations in Tumors by Simple Targeted Next-Generation Sequencing: A Solution for Transferring Integrated Pangenomic Studies into Routine Practice? *J Mol Diagn JMD* **19**:776–787.

Gaujoux S, Pinson S, Gimenez-Roqueplo A-P, Amar L, Ragazzon B, Launay P, Meatchi T, Libé R, Bertagna X, Audebourg A, Zucman-Rossi J, Tissier F, and 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, Tissier F, Groussin L, Libé 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.

Gautam J, Banskota S, Regmi SC, Ahn S, Jeon YH, Jeong H, Kim SJ, Nam T-G, Jeong B-S, and Kim J-A (2016) Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT7 receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling. *Mol Cancer* **15**:75.

Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, and La Rocca RV (1990) Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* **50**:5488–5496.

Glasow A, and Bornstein SR (2000) Leptin and the adrenal gland. *Eur J Clin Invest* **30 Suppl 3**:39–45.

Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, and Bornstein SR (1998) Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:4459–4466.

Goh G, Scholl UI, Healy JM, Choi M, Prasad ML, Nelson-Williams C, Kunstman JW, Korah R, Suttorp A-C, Dietrich D, Haase M, Willenberg HS, Stålberg P, Hellman P, Åkerström G, Björklund P, Carling T, and Lifton RP (2014) Recurrent activating mutation in PRKACA in cortisol-producing adrenal tumors. *Nat Genet* **46**:613–617.

Gomes DC, Leal LF, Mermejo LM, Scrideli CA, Martinelli CE, Fragoso MCBV, Latronico AC, Tone LG, Tucci S, Yunes JA, Cardinalli IA, Mastellaro MJ, Brandalise SR, Ramalho F, Moreira AC, Ramalho LN, de Castro M, and Antonini SRR (2014) Sonic Hedgehog Signaling Is Active in Human Adrenal Cortex Development and Deregulated in Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **99**:E1209–E1216.

Gomez RA (2017) Fate of Renin Cells During Development and Disease. *Hypertens Dallas Tex 1979* **69**:387–395.

González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G, and Scherbaum WA (1995) IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol* **99**:137–141.

Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Jirikowski G, and Scherbaum WA (1994) Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* **79**:1492–1497.

González-Hernández JA, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Scherbaum WA, and Bornstein SR (1996) Human adrenal cells express tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:807–813.

Gottschau M (1883) Struktur und embryonale Entwicklung der Nebennieren bei Säugetieren. *Arch Anat Physiol Lpz* 412–458.

Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D, and Mukhopadhyay AK (2000) Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:1277–1286.

Greep RO, and Deane HW (1949) Histological, cytochemical and physiological observations on the regeneration of the rat's adrenal gland following enucleation. *Endocrinology* **45**:42–56.

Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, Enting RH, Vries J de, Kleibeuker JH, Witjes MJH, Links TP, and Beek AP van (2008) Extra-Intestinal Manifestations of Familial Adenomatous Polyposis. *Ann Surg Oncol* **15**:2439–2450.

Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, Zacharieva S, Pignatelli D, Carney JA, Luton JP, Bertagna X, Stratakis CA, and 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, Massias JF, Bertagna X, and Bertherat J (2000) Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J Clin Endocrinol Metab* **85**:345–354.

Guasti L, Paul A, Laufer E, and King P (2011) Localization of Sonic Hedgehog secreting and receiving cells in the developing and adult rat adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* **336**:117–122.

Guimier A, Ragazzon B, Assié G, Tissier F, Dousset B, Bertherat J, and Gaujoux S (2013) AXIN genetic analysis in adrenocortical carcinomas updated. *J Endocrinol Invest* **36**:1000–1003.

Güse-Behling H, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Waterman MR, Scherbaum WA, and Adler G (1992) Regulation of adrenal steroidogenesis by adrenaline: expression of cytochrome P450 genes. *J Endocrinol* **135**:229–237.

Haase M, Willenberg HS, and Bornstein SR (2011) Update on the Corticomedullary Interaction in the Adrenal Gland. *Pediatr Adrenal Dis* **20**:28–37.

Haidan A, Bornstein SR, Liu Z, Walsh LP, Stocco DM, and Ehrhart-Bornstein M (2000) Expression of adrenocortical steroidogenic acute regulatory (StAR) protein is influenced by chromaffin cells. *Mol Cell Endocrinol* **165**:25–32.

Hall JG, Pallister PD, Clarren SK, Beckwith JB, Wiglesworth FW, Fraser FC, Cho S, Benke PJ, and Reed SD (1980) Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations. *Am J Med Genet* **7**:47–74.

Hamon M, and Gozlan H (1993) Les récepteurs centraux de la sérotonine. *Médecine/Sciences* **9**:21–30.

Hannon J, and Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* **195**:198–213.

Harding MJ, McGraw HF, and Nechiporuk A (2014) The roles and regulation of multicellular rosette structures during morphogenesis. *Dev Camb Engl* **141**:2549–2558.

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 Devoted Mol Cell Mech* **1**:663–671.

Hattangady N, Olala L, Bollag WB, and Rainey WE (2012) Acute and Chronic Regulation of Aldosterone Production. *Mol Cell Endocrinol* **350**:151–162.

Hedlund PB, and Sutcliffe JG (2004) Functional, molecular and pharmacological advances in 5-HT7 receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **25**:481–486.

Heikkilä M, Peltoketo H, Leppäluoto J, Ilves M, Vuolteenaho O, and Vainio S (2002) Wnt-4 deficiency alters mouse adrenal cortex function, reducing aldosterone production. *Endocrinology* **143**:4358–4365.

Hench PS, and Kendall EC (1949) The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotropic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* **24**:181–197.

Hinson JP, Cameron LA, Purbrick A, and Kapas S (1994) The role of neuropeptides in the regulation of adrenal zona glomerulosa function: effects of substance P, neuropeptide Y, neurotensin, Met-enkephalin, Leu-enkephalin and corticotrophin-releasing hormone on aldosterone secretion in the intact perfused rat adrenal. *J Endocrinol* **140**:91–96.

Hofland J, Delhanty PJ, Steenbergen J, Hofland LJ, van Koetsveld PM, van Nederveen FH, de Herder WW, Feelders RA, and de Jong FH (2012) Melanocortin 2 receptor-associated protein (MRAP) and MRAP2 in human adrenocortical tissues: regulation of expression and association with ACTH responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:E747-754.

Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libè R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, and Stratakis CA (2006) A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* **38**:794–800.

Hoyer D (2017) 5-HT Receptor Nomenclature: Naming Names, Does It Matter? A Tribute to Maurice Rapport. *ACS Chem Neurosci* **8**:908–919.

Hoyer D (1988) Molecular pharmacology and biology of 5-HT1C receptors. *Trends Pharmacol Sci* **9**:89–94.

Hoyer D, and Martin G (1997) 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* **36**:419–428.

Hu L, Lin X, Lu H, Chen B, and Bai Y (2015) An overview of hedgehog signaling in fibrosis. *Mol Pharmacol* **87**:174–182.

Huang C-CJ, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, and Yao HH-C (2010) Progenitor Cell Expansion and Organ Size of Mouse Adrenal Is Regulated by Sonic Hedgehog. *Endocrinology* **151**:1119–1128.

Humphrey JH, and Jaques R (1954) The histamine and serotonin content of the platelets and polymorphonuclear leucocytes of various species. *J Physiol* **124**:305–310.

Humphrey PP, Hartig P, and Hoyer D (1993) A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* **14**:233–236.

Hunter RW, Ivy JR, and Bailey MA (2014) Glucocorticoids and renal Na+ transport: implications for hypertension and salt sensitivity. *J Physiol* **592**:1731–1744.

Hureau J, Hidden G, and Minh ATT (1979) Vascularisation des glandes surrénales. *Anat Clin* **2**:127–146.

Idres S, Delarue C, Lefebvre H, Larcher A, Feuilloley M, and Vaudry H (1989) Mechanism of action of serotonin on frog adrenal cortex. *J Steroid Biochem* **34**:547–550.

Isbister GK, Buckley NA, and Whyte IM (2007) Serotonin toxicity: a practical approach to diagnosis and treatment. *Med J Aust* **187**:361–365.

Ishimoto H, and Jaffe RB (2011) Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr Rev* **32**:317–355.

Itcho K, Oki K, Kobuke K, Yoshii Y, Ohno H, Yoneda M, and Hattori N (2018) Aberrant G protein-receptor expression is associated with DNA methylation in aldosterone-producing adenoma. *Mol Cell Endocrinol* **461**:100–104.

Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, and Schulze W (1997) Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod* **3**:459–466.

Iwata M, Oki Y, Okazawa T, Ishizawa S, Taka C, Yamazaki K, Tobe K, Fukuoka J, Sasano H, and Nishikawa T (2012) A rare case of adrenocorticotropic hormone (ACTH)-independent macroadrenal hyperplasia showing ectopic production of ACTH. *Intern Med Tokyo Jpn* **51**:2181–2187.

Jeon JH, Kim K, Kim JH, Baek A, Cho H, Lee YH, Kim JW, Kim D, Han SH, Lim J-S, Kim KI, Yoon DY, Kim S-H, Oh GT, Kim E, and Yang Y (2008) A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **22**:1502–1511.

Johnsen IK, Slawik M, Shapiro I, Hartmann MF, Wudy SA, Looyenga BD, Hammer GD, Reincke M, and Beuschlein F (2006) Gonadectomy in mice of the inbred strain CE/J induces proliferation of sub-capsular adrenal cells expressing gonadal marker genes. *J Endocrinol* **190**:47–57.

Jørgensen H, Knigge U, Kjaer A, Møller M, and Warberg J (2002) Serotonergic stimulation of corticotropin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin gene expression. *J Neuroendocrinol* **14**:788–795.

Judd AM, Call GB, Barney M, McIlmoil CJ, Balls AG, Adams A, and Oliveira GK (2000) Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann N Y Acad Sci* **917**:628–637.

Kaludjerovic J, and Ward WE (2012) The Interplay between Estrogen and Fetal Adrenal Cortex. *J Nutr Metab* **2012**:837901.

Kamrath C, Hartmann MF, and Wudy SA (2013) Androgen synthesis in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* **45**:86–91.

Kang S, Graham JM, Olney AH, and Biesecker LG (1997) GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* **15**:266–268.

Kaumann AJ, Sanders L, Brown AM, Murray KJ, and Brown MJ (1990) A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br J Pharmacol* **100**:879–885.

Keene MFL, and Hewer EE (1927) Observations on the Development of the Human Suprarenal Gland. *J Anat* **61**:302–324.

Kim A, and Hammer GD (2007) Adrenocortical Cells with Stem/Progenitor Cell Properties: Recent Advances. *Mol Cell Endocrinol* **265–266**:10–16.

Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, Lavery GG, Parker KL, and Hammer GD (2008) Targeted disruption of β-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* **135**:2593–2602.

Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, Fujitani Y, Kawamori R, Miyatsuka T, Kosaka Y, Yang K, Honig G, van der Hart M, Kishimoto N, Wang J, Yagihashi S, Tecott LH, Watada H, and German MS (2010) Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med* **16**:804–808.

King P, Paul A, and Laufer E (2009) Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:21185–21190.

King PJ, Guasti L, and Laufer E (2008) Hedgehog signalling in endocrine development and disease. *J Endocrinol* **198**:439–450.

Kohen R, Fashingbauer LA, Heidmann DE, Guthrie CR, and Hamblin MW (2001) Cloning of the mouse 5-HT6 serotonin receptor and mutagenesis studies of the third cytoplasmic loop. *Brain Res Mol Brain Res* **90**:110–117.

Komori T (2016) Glucocorticoid Signaling and Bone Biology. *Horm Metab Res* **48**:755–763.

Kraemer FB (2007) Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol* **265–266**:42–45.

Krobert KA, Bach T, Syversveen T, Kvingedal AM, and Levy FO (2001) The cloned human 5-HT7 receptor splice variants: a comparative characterization of their pharmacology, function and distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **363**:620–632.

Krobert KA, and Levy FO (2002) The human 5-HT7 serotonin receptor splice variants: constitutive activity and inverse agonist effects. *Br J Pharmacol* **135**:1563–1571.

Kroeze WK, Kristiansen K, and Roth BL (2002) Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem* **2**:507–528.

Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, and Ehrhart-Bornstein M (2007) 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 2005* **31**:1605–1616.

Kuc RE, Parker CA, Gee AD, Bao YP, Brown MJ, and Davenport AP (2005) 5-HT4 receptor distribution in the human adrenal revealed by 3H-GR113808 A 5-HT4 receptor antagonist. *Proc Brit Parmacol Soc* **3**:68.

Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, and Tremblay J (2004) Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab TEM* **15**:375–382.

Lacroix A, Bolté E, Tremblay J, Dupré J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, and Taillefer R (1992) Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* **327**:974–980.

Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, and Nieman LK (2015) Cushing's syndrome. *Lancet Lond Engl* **386**:913–927.

Lacroix A, Hamet P, and Boutin JM (1999) Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med* **341**:1577–1581.

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.

Lacroix, Bourdeau Isabelle, Lampron Antoine, Mazzuco Tânia L., Tremblay Johanne, and Hamet Pavel (2009) Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clin Endocrinol (Oxf)* **73**:1–15.

Laenen K, Haegeman G, and Vanhoenacker P (2007) Structure of the human 5-HT7 receptor gene and characterization of its promoter region. *Gene* **391**:252–263.

Lala DS, Rice DA, and Parker KL (1992) Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol Baltim Md* **6**:1249–1258.

Lalli E, Barhanin J, Zennaro M-C, and Warth R (2016) Local Control of Aldosterone Production and Primary Aldosteronism. *Trends Endocrinol Metab TEM* **27**:123–131.

Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, and Drouin J (2001) A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* **104**:849–859.

Lampron A, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, and Lacroix A (2006) Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal hyperplasias reveals novel targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:3611–3618.

Langer C, Piper C, Vogt J, Heintze J, Butz T, Lindner O, Burchert W, Kersting C, and Horstkotte D (2007) Atrial fibrillation in carcinoid heart disease: The role of serotonin. A review of the literature. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc* **96**:114–118.

Laufer E, Kesper D, Vortkamp A, and King P (2012) Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol Cell Endocrinol* **351**:19–27.

Law NC, Weck J, Kyriss B, Nilson JH, and Hunzicker-Dunn M (2013) Lhcgr expression in granulosa cells: roles for PKA-phosphorylated β-catenin, TCF3, and FOXO1. *Mol Endocrinol Baltim Md* **27**:1295–1310.

Leal LF, Szarek E, Faucz F, and Stratakis CA (2015) Phosphodiesterase 8B and cyclic AMP signaling in the adrenal cortex. *Endocrine* **50**:27–31.

Lecoq A-L, Stratakis CA, Viengchareun S, Chaligné R, Tosca L, Deméocq V, Hage M, Berthon A, Faucz FR, Hanna P, Boyer H-G, Servant N, Salenave S, Tachdjian G, Adam C, Benhamo V, Clauser E, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M, Bourdeau I, Maiter D, Tabarin A, Bertherat J, Lefebvre H, de Herder W, Louiset E, Lacroix A, Chanson P, Bouligand J, and

Kamenický P (2017) Adrenal GIPR expression and chromosome 19q13 microduplications in GIP-dependent Cushing's syndrome. *JCI Insight* **2**.

Lefebvre, Duparc Céline, Prévost G, Bertherat J, and Louiset E (2015) Cell-to-cell communication in bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing hypercortisolism. *Front Endocrinol* **6**:34.

Lefebvre, Duparc C., Prévost G, Zennaro MC, Bertherat J, and Louiset E (2015) Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol Cell Endocrinol* **408**:198–204.

Lefebvre H, Cartier D, Duparc C, Lihrmann I, Contesse V, Delarue C, Godin M, Fischmeister R, Vaudry H, and Kuhn J-M (2002) Characterization of serotonin(4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* **87**:1211–1216.

Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, and Kuhn JM (2001) Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:5001–5007.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, and Vaudry H (1992) Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience* **47**:999–1007.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Legrand A, Kuhn JM, Vaudry H, and Wolf LM (1995) The serotonin-4 receptor agonist cisapride and angiotensin-II exert additive effects on aldosterone secretion in normal man. *J Clin Endocrinol Metab* **80**:504–507.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Soubrane C, Legrand A, Kuhn JM, Wolf LM, and Vaudry H (1993) Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* **77**:1662–1666.

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, and Kuhn JM (1998) Serotonergic Regulation of Adrenocortical Function. *Horm Metab Res* **30**:398–403.

Lefebvre H, Duparc C, Chartrel N, Jegou S, Pellerin A, Laquerriere A, Ivell R, Vaudry H, and Kuhn J-M (2003) Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **88**:3035–3042.

Lefebvre H, Gonzalez KN, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, and Kuhnl JM (1998) Effect of prolonged administration of the serotonin4 (5-HT4) receptor agonist cisapride on aldosterone secretion in healthy volunteers. *Endocr Res* **24**:749–752.

Lefebvre H, Prévost G, and Louiset E (2013) Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* **169**:R115-138.

Lefebvre H, Thomas M, Duparc C, Bertherat J, and Louiset E (2016) Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front Endocrinol* **7**.

Lenglet S, Louiset E, Delarue C, Vaudry H, and Contesse V (2002) Activation of 5-HT(7) receptor in rat glomerulosa cells is associated with an increase in adenylyl cyclase activity and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology* **143**:1748–1760.

Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, and Clavien P-A (2006) Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* **312**:104–107.

Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Near JA, and Wightman RM (1991) Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. *J Neurochem* **56**:1855–1863.

Lever JD (1952) Observations on the adrenal blood vessels in the rat. *J Anat* **86**:459–467.

Lezoualc'h F (2007) 5-HT4 receptor and Alzheimer's disease: the amyloid connection. *Exp Neurol* **205**:325–329.

Li Q, Johansson H, and Grimelius L (1999) Innervation of human adrenal gland and adrenal cortical lesions. *Virchows Arch Int J Pathol* **435**:580–589.

Lian P, Li H, Zhang Y, and Ji Z (2015) [Effects of activity of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 on serum potassium levels in Cushing's syndrome patients]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **95**:929–932.

Lim JE, Porteus CS, and Bernier NJ (2013) Serotonin directly stimulates cortisol secretion from the interrenals in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* **192**:246–255.

Locatelli V, Bresciani E, Tamiazzo L, and Torsello A (2010) Central nervous system-acting drugs influencing hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Endocr Dev* **17**:108–120.

Lodish M, and Stratakis CA (2016) A genetic and molecular update on adrenocortical causes of Cushing syndrome. *Nat Rev Endocrinol* **12**:255–262.

Loughrey PB, Zhang D, and Heaney AP (2018) New Treatments for the Carcinoid Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* **47**:557–576.

Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, and Lefebvre H (2006) Expression of serotonin7 receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:4578–4586.

Louiset E, Duparc C, Groussin L, Gobet F, Desailloud R, Barrande G, Reznik Y, Bertherat J, Prévost G, and Lefebvre H (2014) Abnormal Sensitivity to Glucagon and Related Peptides in Primary Adrenal Cushing's Syndrome. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* **46**:876–882.

Louiset E, Duparc C, Lenglet S, Gomez-Sanchez CE, and Lefebvre H (2017) Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* **441**:99–107.

Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Libé R, Bram Z, Groussin L, Caron P, Tabarin A, Grunenberger F, Christin-Maitre S, Bertagna X, Kuhn J-M, Anouar Y, Bertherat J, and Lefebvre H (2013) Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* **369**:2115–2125.

Louiset E, Isvi K, Gasc JM, Duparc C, Cauliez B, Laquerrière A, Kuhn JM, and Lefebvre H (2008) Ectopic expression of serotonin7 receptors in an adrenocortical carcinoma co-secreting renin and cortisol. *Endocr Relat Cancer* **15**:1025–1034.

Lundblad JR, and Roberts JL (1988) Regulation of Proopiomelanocortin Gene Expression in Pituitary. *Endocr Rev* **9**:135–158.

Luo X, Ikeda Y, and Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**:481–490.

MacDonald BT, Tamai K, and He X (2009) Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* **17**:9–26.

Manchia M, Carpiniello B, Valtorta F, and Comai S (2017) Serotonin Dysfunction, Aggressive Behavior, and Mental Illness: Exploring the Link Using a Dimensional Approach. *ACS Chem Neurosci* **8**:961–972.

Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, Okopnik M, Knopf C, Indelman M, Drugan A, Tiosano D, Gershoni-Baruch R, Choder M, and 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.

Mantero F, Opocher G, Boscaro M, and Armanini D (1982) Effect of serotonin on plasma aldosterone in man. *J Endocrinol Invest* **5**:97–99.

Marazziti D, Baroni S, Pirone A, Giannaccini G, Betti L, Testa G, Schmid L, Palego L, Borsini F, Bordi F, Piano I, Gargini C, Castagna M, Catena-Dell'osso M, and Lucacchini A (2013) Serotonin receptor of type 6 (5-HT6) in human prefrontal cortex and hippocampus post-mortem: an immunohistochemical and immunofluorescence study. *Neurochem Int* **62**:182–188.

Matsuda M, Imaoka T, Vomachka AJ, Gudelsky GA, Hou Z, Mistry M, Bailey JP, Nieport KM, Walther DJ, Bader M, and Horseman ND (2004) Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev Cell* **6**:193–203.

Mawe GM, and Hoffman JM (2013) Serotonin signalling in the gut--functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **10**:473–486.

Mazzuco TL, Thomas M, Martinie M, Cherradi N, Sturm N, Feige J-J, and Chabre O (2007) Cellular and molecular abnormalities of a macronodular adrenal hyperplasia causing beta-blocker-sensitive Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* **51**:1452–1462.

Medhurst AD, Lezoualc'h F, Fischmeister R, Middlemiss DN, and Sanger GJ (2001) Quantitative mRNA analysis of five C-terminal splice variants of the human 5-HT4 receptor in the central nervous system by TaqMan real time RT-PCR. *Brain Res Mol Brain Res* **90**:125–134.

Meffre J, Chaumont-Dubel S, Mannoury la Cour C, Loiseau F, Watson DJG, Dekeyne A, Séveno M, Rivet J-M, Gaven F, Déléris P, Hervé D, Fone KCF, Bockaert J, Millan MJ, and Marin P (2012) 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med* **4**:1043–1056.

Mengod G, Vilaró MT, Raurich A, López-Giménez JF, Cortés R, and Palacios JM (1996) 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J* **28**:747–758.

Menzies RI, Zhao X, Mullins LJ, Mullins JJ, Cairns C, Wrobel N, Dunbar DR, Bailey MA, and Kenyon CJ (2017) Transcription controls growth, cell kinetics and cholesterol supply to sustain ACTH responses. *Endocr Connect* **6**:446–457.

Mesiano S, Coulter CL, and Jaffe RB (1993) Localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid

dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in human and rhesus monkey fetal adrenal glands: reappraisal of functional zonation. *J Clin Endocrinol Metab* **77**:1184–1189.

Mesiano S, and Jaffe RB (1997) Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocr Rev* **18**:378–403.

Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Rüschendorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nürnberg P, Huebner A, Cheetham ME, and Clark AJL (2005) Mutations in *MRAP*, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet* **37**:166–170.

Michaelson IA, and Whittaker VP (1963) The subcellular localization of 5-hydroxytryptamine in guinea pig brain. *Biochem Pharmacol* **12**:203–211.

Miller WL (1998) Why Nobody Has P450scc (20,22 Desmoslase) Deficiencyg. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:1399–1400.

Miller WL, and Bose HS (2011) Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking Thematic Review Series: Genetics of Human Lipid Diseases. *J Lipid Res* **52**:2111–2135.

Minami M, Endo T, Hirafuji M, Hamaue N, Liu Y, Hiroshige T, Nemoto M, Saito H, and Yoshioka M (2003) Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol Ther* **99**:149–165.

Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Vergé D, and Hamon M (1992) Effect of the selective lesion of serotoninergic neurons on the regional distribution of 5-HT1A receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **14**:357–362.

Mitra S, Genuth SM, Berman LB, and Vertes V (1972) Aldosterone secretion in anephric patients. *N Engl J Med* **286**:61–64.

Mohammad-Zadeh LF, Moses L, and Gwaltney-Brant SM (2008) Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* **31**:187–199.

Monkhouse WS, and Khalique A (1986) The adrenal and renal veins of man and their connections with azygos and lumbar veins. *J Anat* **146**:105–115.

More J, Young J, Reznik Y, Raverot G, Borson-Chazot F, Rohmer V, Baudin E, Coutant R, and Tabarin A (2011) Ectopic ACTH Syndrome in Children and Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* **96**:1213–1222.

Müller J, and Ziegler WH (1968) Stimulation of aldosterone biosynthesis in vitro by serotonin. *Acta Endocrinol (Copenh)* **59**:23–35.

Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, and Quehenberger O (1997) Characterization of CLA-1, a Human Homologue of Rodent Scavenger Receptor BI, as a Receptor for High Density Lipoprotein and Apoptotic Thymocytes. *J Biol Chem* **272**:17551–17557.

Murphy K, Zhang X, Gainetdinov R, Beaulieu JM, Caron MG (2008) A regulatory domain in the N terminus of tryptophan hydroxylase 2 controls enzyme expression. *J. Biol. Chem.* **283**: 13216-13224

Naccache A, Louiset E, Duparc C, Laquerrière A, Patrier S, Renouf S, Gomez-Sanchez CE, Mukai K, Lefebvre H, and Castanet M (2016) Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol Cell Endocrinol* **434**:69–80.

Nakamura Y, Hattangady NG, Ye P, Satoh F, Morimoto R, Ito-Saito T, Sugawara A, Ohba K, Takahashi K, Rainey WE, and Sasano H (2014) Aberrant gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) expression and its regulation of CYP11B2 expression and aldosterone production in adrenal aldosterone-producing adenoma (APA). *Mol Cell Endocrinol* **384**:102–108.

Natarajan R, Ploszaj S, Horton R, and Nadler J (1989) Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis. *Endocrinology* **125**:3084–3089.

Neville AM, and Mackay AM (1972) The structure of the human adrenal cortex in health and disease. *Clin Endocrinol Metab* **1**:361–395.

Newell-Price J (2003) Proopiomelanocortin gene expression and DNA methylation: implications for Cushing's syndrome and beyond. *J Endocrinol* **177**:365–372.

Ni W, and Watts SW (2006) 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* **33**:575–583.

Nishimoto K, Harris RBS, Rainey WE, and Seki T (2014) Sodium deficiency regulates rat adrenal zona glomerulosa gene expression. *Endocrinology* **155**:1363–1372.

Nishiyama A, and Kim-Mitsuyama S (2010) New Approaches to Blockade of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System: Overview of Regulation of the Renin–Angiotensin–Aldosterone System. *J Pharmacol Sci* **113**:289–291.

Noda M, Higashida H, Aoki S, and Wada K (2004) Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol Neurobiol* **29**:31–39.

Nussdorfer GG, and Malendowicz LK (1998) Role of tachykinins in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides* **19**:949–968.

Obinu E, Locci G, Gerosa C, Fanos V, Vinci L, Faa G, Ambu R, Loddo C, Coni E, Angiolucci M, Fanni C, and Fanni D (2016) Adrenal stem cell niches are located between adrenal and renal capsules. *J Pediatr Neonatal Individ Med* **5**:9.

Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, and Byers SW (1997) Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin. *J Biol Chem* **272**:24735–24738.

Pabon JE, Li X, Lei ZM, Sanfilippo JS, Yussman MA, and Rao CV (1996) Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab* **81**:2397–2400.

Pal SB (1978) 6-Hydroxylation of cortisol and urinary 6beta-hydroxycortisol. *Metabolism* **27**:1003–1011.

Paragliola RM, Papi G, Pontecorvi A, and Corsello SM (2017) Treatment with Synthetic Glucocorticoids and the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Int J Mol Sci* **18**.

Päth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, and Scherbaum WA (1997) Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **82**:2343–2349.

Payne AH, and Hales DB (2004) Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones. *Endocr Rev* **25**:947–970.

Pepe GJ, and Albrecht ED (1995) Actions of placental and fetal adrenal steroid hormones in primate pregnancy. *Endocr Rev* **16**:608–648.

Perogamvros I, Ray DW, and Trainer PJ (2012) Regulation of cortisol bioavailability—effects on hormone measurement and action. *Nat Rev Endocrinol* **8**:717–727.

Peroutka SJ, and Howell TA (1994) The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* **33**:319–324.

Perraudin V, Delarue C, Lefebvre H, Do Rego J-L, Vaudry H, and Kuhn J-M (2006) Evidence for a role of vasopressin in the control of aldosterone secretion in primary aldosteronism: in vitro and in vivo studies. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1566–1572.

Pervanidou P, and Chrousos GP (2007) Post-traumatic Stress Disorder in children and adolescents: from Sigmund Freud's "trauma" to psychopathology and the (Dys)metabolic syndrome. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* **39**:413–419.

Peters J (2012) Local renin–angiotensin systems in the adrenal gland. *Peptides* **34**:427–432.

Pihlajoki M, Dörner J, Cochran RS, Heikinheimo M, and Wilson DB (2015) Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front Endocrinol* **6**:27.

Plöckinger U, Chrusciel M, Doroszko M, Saeger W, Blankenstein O, Weizsäcker K, Kroiss M, Hauptmann K, Radke C, Pöllinger A, Tiling N, Steinmüller T, Huhtaniemi I, Quinkler M, Bertherat J, Lacroix A, and Rahman N (2017) Functional Implications of LH/hCG Receptors in Pregnancy-Induced Cushing Syndrome. *J Endocr Soc* **1**:57–71.

Raff H, Sharma ST, and Nieman LK (2014) Physiological Basis for the Etiology, Diagnosis, and Treatment of Adrenal Disorders: Cushing's Syndrome, Adrenal Insufficiency, and Congenital Adrenal Hyperplasia. *Compr Physiol* **4**:739–769.

Rahman NA, Kiiveri S, Rivero-Müller A, Levallet J, Vierre S, Kero J, Wilson DB, Heikinheimo M, and Huhtaniemi I (2004) Adrenocortical tumorigenesis in transgenic mice expressing the inhibin alpha-subunit promoter/simian virus 40 T-antigen transgene: relationship between ectopic expression of luteinizing hormone receptor and transcription factor GATA-4. *Mol Endocrinol Baltim Md* **18**:2553–2569.

Rainey WE (1999) Adrenal zonation: clues from 11β-hydroxylase and aldosterone synthase. *Mol Cell Endocrinol* **151**:151–160.

Rainey WE, and Nakamura Y (2008) Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **108**:281–286.

Rao CV, Zhou XL, and Lei ZM (2004) Functional luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal cortical H295R cells. *Biol Reprod* **71**:579–587.

Rapport MM, Green AA, and Page IH (1948) Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. *J Biol Chem* **174**:735–741.

Reid G, and Rand M (1952) Pharmacological actions of synthetic 5-hydroxytryptamine (serotonin, thrombocytin). *Nature* **169**:801–802.

Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, Leroyer R, Leymarie P, Travert G, Lebrethon MC, Budi I, Balliere AM, and Mahoudeau J (1992) Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* **327**:981–986.

Rhayem Y, Perez-Rivas LG, Dietz A, Bathon K, Gebhard C, Riester A, Mauracher B, Gomez-Sanchez C, Eisenhofer G, Schwarzmayr T, Calebiro D, Strom TM, Reincke M, and Beuschlein F (2016) PRKACA Somatic Mutations Are Rare Findings in Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **101**:3010–3017.

Ronchi CL, Di Dalmazi G, Faillot S, Sbiera S, Assié G, Weigand I, Calebiro D, Schwarzmayr T, Appenzeller S, Rubin B, Waldmann J, Scaroni C, Bartsch DK, Mantero F, Mannelli M, Kastelan D, Chiodini I, Bertherat J, Reincke M, Strom TM, Fassnacht M, Beuschlein F, and European Network for the Study of Adrenocortical Tumors (ENSAT) (2016) Genetic Landscape of Sporadic Unilateral Adrenocortical Adenomas Without PRKACA p.Leu206Arg Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **101**:3526–3538.

Rosenkrantz H (1959) A direct influence of 5-hydroxytryptamine on the adrenal cortex. *Endocrinology* **64**:355–362.

Rossi G, Albertin G, Belloni A, Zanin L, Biasolo MA, Prayer-Galetti T, Bader M, Nussdorfer GG, Palù G, and Pessina AC (1994) Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex. *J Clin Invest* **94**:1226–1234.

Rossi GP, Andreis PG, Neri G, Tortorella C, Pelizzo MR, Sacchetto A, and Nussdorfer GG (2000) Endothelin-1 stimulates aldosterone synthesis in Conn's adenomas via both A and B receptors coupled with the protein kinase C- and cyclooxygenase-dependent signaling pathways. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res* **48**:343–350.

Rossi GP, Sticchi D, Giuliani L, Bernante P, Zavattiero S, Pessina AC, and Nussdorfer GG (2006) Adiponectin receptor expression in the human adrenal cortex and aldosterone-producing adenomas. *Int J Mol Med* **17**:975–980.

Roth BL (2007) Drugs and valvular heart disease. *N Engl J Med* **356**:6–9.

Roth-Isigkeit AK, and Schmucker P (1997) Postoperative dissociation of blood levels of cortisol and adrenocorticotropin after coronary artery bypass grafting surgery. *Steroids* **62**:695–699.

Rothman RB, Baumann MH, Savage JE, Rauser L, McBride A, Hufeisen SJ, and Roth BL (2000) Evidence for possible involvement of 5-HT(2B) receptors in the cardiac valvulopathy associated with fenfluramine and other serotonergic medications. *Circulation* **102**:2836–2841.

Rubin RT, Miller TH, Rhodes ME, and Czambel RK (2006) Adrenal cortical responses to low- and high-dose ACTH(1-24) administration in major depressives vs. matched controls. *Psychiatry Res* **143**:43–50.

Ruggiero C, and Lalli E (2016) Impact of ACTH Signaling on Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes. *Front Endocrinol* **7**.

Sahut-Barnola I, Joussineau C de, Val P, Lambert-Langlais S, Damon C, Lefrançois-Martinez A-M, Pointud J-C, Marceau G, Sapin V, Tissier F, Ragazzon B, Bertherat J, Kirschner LS, Stratakis CA, and Martinez A (2010) Cushing's Syndrome and Fetal Features Resurgence in Adrenal Cortex–Specific Prkar1a Knockout Mice. *PLOS Genet* **6**:e1000980.

Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Ono K, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, and Tanaka T (2016) Cushing Syndrome Due to ACTH-Secreting Pheochromocytoma, Aggravated by Glucocorticoid-Driven Positive-Feedback Loop. *J Clin Endocrinol Metab* **101**:841–846.

Salomon A, Keramidas M, Maisin C, and Thomas M (2015) Loss of β-catenin in adrenocortical cancer cells causes growth inhibition and reversal of epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* **6**:11421–11433.

Salyer SA, Parks J, Barati MT, Lederer ED, Clark BJ, Klein JD, and Khundmiri SJ (2013) Aldosterone regulates Na(+), K(+) ATPase activity in human renal proximal tubule cells through mineralocorticoid receptor. *Biochim Biophys Acta* **1833**:2143–2152.

Sand M, Uecker S, Bechara FG, Gelos M, Sand D, Wiese TH, and Mann B (2007) Simultaneous ectopic adrenocorticotropic hormone syndrome and adrenal metastasis of a medullary thyroid carcinoma causing paraneoplastic Cushing's syndrome. *Int Semin Surg Oncol* **4**:15.

Saner-Amigh K, Mayhew BA, Mantero F, Schiavi F, White PC, Rao CV, and Rainey WE (2006) Elevated expression of luteinizing hormone receptor in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1136–1142.

Santos A, Resmini E, Pascual JC, Crespo I, and Webb SM (2017) Psychiatric Symptoms in Patients with Cushing's Syndrome: Prevalence, Diagnosis and Management. *Drugs* **77**:829–842.

Sasano H, Ohashi Y, Suzuki T, and Nagura H (1998) Vascularity in human adrenal cortex. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* **11**:329–333.

Sasano H, Suzuki T, and Nagura H (1994) ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia: immunohistochemical and in situ hybridization studies of steroidogenic enzymes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* **7**:215–219.

Sato Y, Maekawa S, Ishii R, Sanada M, Morikawa T, Shiraishi Y, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Yoshizato T, Suzuki H, Shiozawa Y, Kataoka K, Kon A, Aoki K, Chiba K, Tanaka H, Kume H, Miyano S, Fukayama M, Nureki O, Homma Y, and Ogawa S (2014) Recurrent somatic mutations underlie corticotropin-independent Cushing's syndrome. *Science* **344**:917–920.

Satoh H, Saito R, Hisata S, Shiihara J, Taniuchi S, Nakamura Y, Nukiwa T, Ebina M, and Sasano H (2012) An ectopic ACTH-producing small cell lung carcinoma associated with enhanced corticosteroid biosynthesis in the peritumoral areas of adrenal metastasis. *Lung Cancer Amst Neth* **76**:486–490.

Schäfer EA (1908) Oliver-Sharpey Lectures on the present condition of our knowledge regarding the functions of the suprarenal capsules. *Br Med J* **1**:1277–1281.

Schinner S, and Bornstein SR (2005) Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol* **16**:91–98.

Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, and Scherbaum WA (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 2005* **31**:864–870.

Sculptoreanu A, Scheuer T, and Catterall WA (1993) Voltage-dependent potentiation of L-type Ca2+ channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *Nature* **364**:240–243.

Sewer MB, and Li D (2008) Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis by the Cytoskeleton. *Lipids* **43**:1109–1115.

Shaikh LH, Zhou J, Teo AED, Garg S, Neogi SG, Figg N, Yeo GS, Yu H, Maguire JJ, Zhao W, Bennett MR, Azizan EAB, Davenport AP, McKenzie G, and Brown MJ (2015) LGR5 Activates

Noncanonical Wnt Signaling and Inhibits Aldosterone Production in the Human Adrenal. *J Clin Endocrinol Metab* **100**:E836–E844.

She Z-Y, and Yang W-X (2014) Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J Mol Endocrinol* **53**:R21-37.

Singh S (2004) Trials of new antiarrhythmic drugs for maintenance of sinus rhythm in patients with atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol Int J Arrhythm Pacing* **10 Suppl 1**:71–76.

Sleight AJ, and Peroutka SJ (1991) Identification of 5-hydroxytryptamine1A receptor agents using a composite pharmacophore analysis and chemical database screening. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **343**:109–116.

Spät A (2004) Glomerulosa cell—a unique sensor of extracellular K+ concentration. *Mol Cell Endocrinol* **217**:23–26.

Spät A, and Hunyady L (2004) Control of Aldosterone Secretion: A Model for Convergence in Cellular Signaling Pathways. *Physiol Rev* **84**:489–539.

Stamos JL, and Weis WI (2013) The β-Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**:a007898.

St-Jean M, Ghorayeb NE, Bourdeau I, and Lacroix A (2018) Aberrant G-protein coupled hormone receptor in adrenal diseases. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **32**:165–187.

Stocco DM (2001) StAR Protein and the Regulation of Steroid Hormone Biosynthesis. *Annu Rev Physiol* **63**:193–213.

Stratakis CA, and Boikos SA (2007) Genetics of adrenal tumors associated with Cushing's syndrome: a new classification for bilateral adrenocortical hyperplasias. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**:748–757.

Stratakis CA, Carney JA, Kirschner LS, Willenberg HS, Brauer S, Ehrhart-Bornstein M, and Bornstein SR (1999) Synaptophysin immunoreactivity in primary pigmented nodular adrenocortical disease: neuroendocrine properties of tumors associated with Carney complex. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:1122–1128.

Stull MA, Pai V, Vomachka AJ, Marshall AM, Jacob GA, and Horseman ND (2007) Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:16708–16713.

Teo AED, Garg S, Haris Shaikh L, Zhou J, Karet Frankl FE, Gurnell M, Happerfield L, Marker A, Bienz M, Azizan EAB, and Brown MJ (2015) Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Adrenal CTNNB1 Mutations.

Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, and Feige J-J (2004) Dual Hormonal Regulation of Endocrine Tissue Mass and Vasculature by Adrenocorticotropin in the Adrenal Cortex. *Endocrinology* **145**:4320–4329.

Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré A-M, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu M-C, Perret C, and Bertherat J (2005) Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* **65**:7622–7627.

Tominaga T, Fukata J, Naito Y, Usui T, Murakami N, Fukushima M, Nakai Y, Hirai Y, and Imura H (1991) Prostaglandin-dependent in vitro stimulation of adrenocortical steroidogenesis by interleukins. *Endocrinology* **128**:526–531.

Turcu AF, and Auchus RJ (2015) Adrenal steroidogenesis and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am* **44**:275–296.

Twarog BM, and Page IH (1953) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* **175**:157–161.

Uchida-Kitajima S, Yamauchi T, Takashina Y, Okada-Iwabu M, Iwabu M, Ueki K, and Kadowaki T (2008) 5-Hydroxytryptamine 2A receptor signaling cascade modulates adiponectin and plasminogen activator inhibitor 1 expression in adipose tissue. *FEBS Lett* **582**:3037–3044.

Ulrich-Lai YM, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, and Herman JP (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **291**:E965–E973.

Vanhoutte PM (1987) Cardiovascular effects of serotonin. *J Cardiovasc Pharmacol* **10 Suppl 3**:S8-11.

Vermes I, and Beishuizen A (2001) The hypothalamic-pituitary-adrenal response to critical illness. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **15**:495–511.

Vezzosi D, Libé R, Baudry C, Rizk-Rabin M, Horvath A, Levy I, René-Corail F, Ragazzon B, Stratakis CA, Vandecasteele G, and Bertherat J (2012) Phosphodiesterase 11A (PDE11A) gene defects in patients with acth-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH): functional variants may contribute to genetic susceptibility of bilateral adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **97**:E2063-2069.

Vitellius G, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, Decoudier B, Guiochon-Mantel A, Lombes M, Delemer B, and investigators of the MUTA-GR Study (2018) Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study. *Eur J Endocrinol* **178**:411–423.

Vouillarmet J, Fernandes-Rosa F, Graeppi-Dulac J, Lantelme P, Decaussin-Petrucci M, Thivolet C, Peix J-L, Boulkroun S, Clauser E, and Zennaro M-C (2016) Aldosterone-Producing Adenoma With a Somatic KCNJ5 Mutation Revealing APC-Dependent Familial Adenomatous Polyposis. *J Clin Endocrinol Metab* **101**:3874–3878.

Vrezas I, Willenberg HS, Mansmann G, Hiroi N, Fritzen R, and Bornstein SR (2003) Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and corticotropin-releasing hormone (CRH) production in the adrenal gland: Basic and clinical aspects. *Microsc Res Tech* **61**:308–314.

Vuorenoja S, Rivero-Muller A, Kiiveri S, Bielinska M, Heikinheimo M, Wilson DB, Huhtaniemi IT, and Rahman NA (2007) Adrenocortical tumorigenesis, luteinizing hormone receptor and transcription factors GATA-4 and GATA-6. *Mol Cell Endocrinol* **269**:38–45.

Walczak EM, and Hammer GD (2015) Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat Rev Endocrinol* **11**:14–28.

Walczak EM, Kuick R, Finco I, Bohin N, Hrycaj SM, Wellik DM, and Hammer GD (2014) Wnt Signaling Inhibits Adrenal Steroidogenesis by Cell-Autonomous and Non–Cell-Autonomous Mechanisms. *Mol Endocrinol* **28**:1471–1486.

Walker SW, Lightly ER, Milner SW, and Williams BC (1988) Catecholamine stimulation of cortisol secretion by 3-day primary cultures of purified zona fasciculata/reticularis cells isolated from bovine adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* **57**:139–147.

Walther DJ, and Bader M (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* **66**:1673–1680.

Wang W-H, and Giebisch G (2009) Regulation of potassium (K) handling in the renal collecting duct. *Pflugers Arch* **458**:157–168.

Waterston R, Lindblad-Toh K, and Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, Agarwala R, Ainscough R, Alexandersson M, An P, Antonarakis SE, Attwood J, Baertsch R, Bailey J, Barlow K, Beck S, Berry E, Birren B, Bloom T, Bork P, Botcherby M, Bray N, Brent MR, Brown DG, Brown SD, Bult C, Burton J, Butler J, Campbell RD, Carninci P, Cawley S, Chiaromonte F, Chinwalla AT, Church DM, Clamp M, Clee C, Collins FS, Cook LL, Copley RR, Coulson A, Couronne O, Cuff J, Curwen V, Cutts T, Daly M, David R, Davies J, Delehaunty KD, Deri J, Dermitzakis ET, Dewey C, Dickens NJ, Diekhans M, Dodge S, Dubchak I, Dunn DM, Eddy SR, Elnitski L, Emes RD, Eswara P, Eyras E, Felsenfeld A, Fewell GA, Flicek P, Foley K, Frankel WN, Fulton LA, Fulton RS, Furey TS, Gage D, Gibbs RA, Glusman G, Gnerre S, Goldman N, Goodstadt L, Grafham D, Graves TA, Green ED, Gregory S, Guigó R, Guyer M, Hardison RC, Haussler D, Hayashizaki Y, Hillier LW, Hinrichs A, Hlavina W, Holzer T, Hsu F, Hua A, Hubbard T, Hunt A, Jackson I, Jaffe DB, Johnson LS, Jones M, Jones TA, Joy A, Kamal M, Karlsson EK, Karolchik D, Kasprzyk A, Kawai J, Keibler E, Kells C, Kent WJ, Kirby A, Kolbe DL, Korf I, Kucherlapati RS, Kulbokas EJ, Kulp D, Landers T, Leger JP, Leonard S, Letunic I, Levine R, Li J, Li M, Lloyd C, Lucas S, Ma B, Maglott DR, Mardis ER, Matthews L, Mauceli E, Mayer JH, McCarthy M, McCombie WR, McLaren S, McLay K, McPherson JD, Meldrim J, Meredith B, Mesirov JP, Miller W, Miner TL, Mongin E, Montgomery KT, Morgan M, Mott R, Mullikin JC, Muzny DM, Nash WE, Nelson JO, Nhan MN, Nicol R, Ning Z, Nusbaum C, O'Connor MJ, Okazaki Y, Oliver K, Overton-Larty E, Pachter L, Parra G, Pepin KH, Peterson J, Pevzner P, Plumb R, Pohl CS, Poliakov A, Ponce TC, Ponting CP, Potter S, Quail M, Reymond A, Roe BA, Roskin KM, Rubin EM, Rust AG, Santos R, Sapojnikov V, Schultz B, Schultz J, Schwartz MS, Schwartz S, Scott C, Seaman S, Searle S, Sharpe T, Sheridan A, Shownkeen R, Sims S, Singer JB, Slater G, Smit A, Smith DR, Spencer B, Stabenau A, Stange-Thomann N, Sugnet C, Suyama M, Tesler G, Thompson J, Torrents D, Trevaskis E, Tromp J, Ucla C, Ureta-Vidal A, Vinson JP, Von Niederhausern AC, Wade CM, Wall M, Weber RJ, Weiss RB, Wendl MC, West AP, Wetterstrand K, Wheeler R, Whelan S, Wierzbowski J, Willey D, Williams S, Wilson RK, Winter E, Worley KC, Wyman D, Yang S, Yang SP, Zdobnov EM, Zody MC, Lander ES (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**:520–562.

Watson S, Serrate C, and Vignot S (2010) [Sonic Hedgehog signaling pathway: from embryology to molecular targeted therapies]. *Bull Cancer (Paris)* **97**:1477–1483.

Weigand I, Ronchi CL, Rizk-Rabin M, Dalmazi GD, Wild V, Bathon K, Rubin B, Calebiro D, Beuschlein F, Bertherat J, Fassnacht M, and Sbiera S (2017) Differential expression of the protein kinase A subunits in normal adrenal glands and adrenocortical adenomas. *Sci Rep* **7**:49.

Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, and Spiegel AM (1991) Activating Mutations of the Stimulatory G Protein in the McCune–Albright Syndrome. *N Engl J Med* **325**:1688–1695.

Werminghaus P, Haase M, Hornsby PJ, Schinner S, Schott M, Malendowicz LK, Lammers BJ, Goretzki PE, Müller-Mattheis V, Markus Giessing, and Willenberg HS (2014) Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* **139**:7–15.

Weyler W, Hsu YP, and Breakefield XO (1990) Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther* **47**:391–417.

Wilke C, Sheriff S, Soleimani M, and Amlal H (2005) Vasopressin-independent regulation of collecting duct aquaporin-2 in food deprivation. *Kidney Int* **67**:201–216.

Williams GH (2005) Aldosterone Biosynthesis, Regulation, and Classical Mechanism of Action. *Heart Fail Rev* **10**:7–13.

Witchel SF (2017) Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Pediatr Adolesc Gynecol* **30**:520–534.

Wong EH, Reynolds GP, Bonhaus DW, Hsu S, and Eglen RM (1996) Characterization of [3H]GR 113808 binding to 5-HT4 receptors in brain tissues from patients with neurodegenerative disorders. *Behav Brain Res* **73**:249–252.

Wu V-C, Wang S-M, Chueh S-CJ, Yang S-Y, Huang K-H, Lin Y-H, Wang J-J, Connolly R, Hu Y-H, Gomez-Sanchez CE, Peng K-Y, and Wu K-D (2017) The prevalence of CTNNB1 mutations in primary aldosteronism and consequences for clinical outcomes. *Sci Rep* **7**:39121.

Xing Y, Lerario A, Rainey W, and Hammer GD (2015) Development of Adrenal Cortex Zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am* **44**:243–274.

Xing Y, Parker CR, Edwards M, and Rainey WE (2010) Adrenocorticotrophic hormone is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol* **45**:59–68.

Xing Y, Rainey WE, Apolzan JW, Francone OL, Harris RBS, and Bollag WB (2012) Adrenal Cell Aldosterone Production Is Stimulated by Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL). *Endocrinology* **153**:721–731.

Ye L, Li Xiaoying, Kong X, Wang W, Bi Y, Hu L, Cui B, Li Xi, and Ning G (2005) Hypomethylation in the promoter region of POMC gene correlates with ectopic overexpression in thymic carcinoids. *J Endocrinol* **185**:337–343.

Ye P, Mariniello B, Mantero F, Shibata H, and Rainey WE (2007) G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol* **195**:39–48.

Young J, Deneux C, Grino M, Oliver C, Chanson P, and Schaison G (1998) Pitfall of Petrosal Sinus Sampling in a Cushing's Syndrome Secondary to Ectopic Adrenocorticotropin-Corticotropin Releasing Hormone (ACTH-CRH) Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:305–308.

Yu B, Ragazzon B, Rizk-Rabin M, and Bertherat J (2012) Protein kinase A alterations in endocrine tumors. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* **44**:741–748.

Zennaro M-C, Fernandes-Rosa FL, and Boulkroun S (2018) Overview of aldosterone-related genetic syndromes and recent advances. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*.

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.

Zwermann O, Suttmann Y, Bidlingmaier M, Beuschlein F, and Reincke M (2009) Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol* **160**:443–451.

Abstract

In most cases, cortisol hypersecretion (Cushing's syndrome; CS) results from ACTH-producing pituitary adenoma (Cushing's disease). Occasionally, CS is the consequence of a unilateral adrenal adenoma or a bilateral macronodular adrenal hyperplasia (BMAH) producing cortisol. In these conditions, hypercortisolism is referred to as "ACTH-independent" owing to suppressed plasma ACTH levels. The molecular mechanisms underlying the maintenance of cortisol hypersecretion by adrenocortical adenomas and BMAHs in the absence of circulating ACTH has long remained unknown. However, major advances have been made during the past recent years in the comprehension of the pathophysiology of primary adrenal CS. Two main types of molecular defects have been shown to favor cortisol hypersecretion by adrenocortical neoplasms: somatic mutations responsible for activation of intracellular signaling pathways and abnormally expressed (or illegitimate) membrane receptors by tumor cells. In the human adrenal gland, serotonin (5-HT), released by subcapsular mast cells stimulates corticosteroid secretion through activation of its type 4 receptor (5-HT_4R). The 5-HT_4R is principally expressed in zona glomerulosa cells but weakly expressed in zona fasciculata cells explaining why 5-HT strongly stimulates aldosterone production. Interestingly, in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) cells, activation of the cAMP/PKA pathway by *PRKAR1A* mutations triggers upregulation of the 5-HT synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase (TPH) type 2 together with the 5-HT_4, 5-HT_6 and 5-HT_7 receptors, positively coupled to cAMP/PKA signaling pathway. 5-HT strongly stimulates cortisol production and inhibition of TPH reduced corticosteroidogenesis in cultured PPNAD cells. In human, cortisol secretion is normally stimulated by ACTH also through activation of the cAMP/PKA signaling pathway. Patients suffering from Cushing's disease, paraneoplastic Cushing's syndrome (paraCS), 21-hydroxylase deficiency or BMAH display high plasma or intraadrenal ACTH levels. In these patients, we show that chronic stimulation of cAMP/PKA pathway by ACTH induces TPH type 1 and 5-$HT_{4/6/7}$ receptors overexpression in steroidogenic cells. In primary cultured adrenocortical cells originating from a patient with paraCS, 5-HT and 5-$HT_{4/7}$ receptors agonists were able to activate cortisol secretion. On the other hand, the role of Wnt/β-catenin signaling pathway in the emergence of illegitimate receptors is still debated. We therefore evaluated 5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7, LH/hCG and GIP receptors expression in an adrenocortical tumor with *APC* germline mutation and two experimental models of constitutive activation of β-catenin in adrenocortical cells, namely genetically modified mice and human transfected adrenocortical cells. Our results indicate that Wnt/β-catenin pathway activation promotes significant overexpression of LH/hCG receptor in the 3 models investigated.

Globally, our data show that activation of intracellular signaling pathways such as the cAMP/PKA pathway by ACTH or Wnt/β-catenin by genetic mutations favors the emergence of abnormal regulatory systems in the adrenal cortex. Our results also demonstrate that intraadrenal 5-HT is involved in corticosteroids hypersecretion related to different diseases including Cushing's disease, paraneoplastic Cushing's syndrome, 21-hydroxylase deficiency and BMAH. TPH inhibitors may thus represent a new therapeutic approach of corticosteroid excess in patients suffering from these disorders.

Key words : adrenal, cortisol, ACTH, serotonin, Wnt/β-catenin, cAMP/PKA, GPCR.

Résumé de la thèse

Dans la majorité des cas, l'hypersécrétion de cortisol résulte d'un adénome hypophysaire sécrétant de l'ACTH (maladie de Cushing). Plus rarement, le syndrome de Cushing est la conséquence d'un adénome corticosurrénalien unilatéral ou d'une hyperplasie bilatérale des surrénales (HMBS) sécrétant du cortisol. Ces deux pathologies appartiennent à la catégorie des hypercortisolismes dits ACTH-indépendants en raison des taux plasmatiques effondrés d'adrénocorticotrophine (ACTH). Les mécanismes moléculaires à l'origine de la sécrétion accrue de cortisol par ces lésions sont longtemps restés méconnus. Au cours des dernières années, des avancées considérables ont été réalisées dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie du syndrome de Cushing. Deux grands types d'anomalies paraissent impliqués dans la pathogénie de l'hypercortisolisme : des mutations germinales et somatiques activant des voies de signalisation intracellulaires et l'expression illégitime de récepteurs membranaires. Dans la surrénale humaine normale, la sérotonine (5-HT), synthétisée et libérée par les mastocytes sous-capsulaires, stimule la sécrétion des corticostéroïdes *via* son récepteur 5-HT_4. Ce dernier est principalement localisé à la surface des cellules de la zone glomérulée mais faiblement exprimé au niveau des cellules de la zone fasciculée, expliquant l'action stimulante prédominante de la 5-HT sur la sécrétion d'aldostérone. Dans la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales, l'activation de la voie AMPc/PKA par une mutation du gène *PRKAR1A* est responsable d'une surexpression de la tryptophane hydroxylase (TPH) de type 2, enzyme limitante de la synthèse de 5-HT, et des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7 couplés positivement à la voie AMPc/PKA dans les cellules cortisolosécrétrices. Chez l'Homme, la sécrétion de cortisol est physiologiquement stimulée par l'ACTH également *via* la voie AMPc/PKA. Les patients souffrant de maladie de Cushing, d'un syndrome de Cushing paranéoplasique (paraCS), d'un déficit en 21-hydroxylase ou d'HMBS présentent des taux d'ACTH plasmatique ou intrasurrénalienne élevés. Chez ces patients, nous montrons que la stimulation chronique de la voie AMPc/PKA par l'ACTH provoque une surexpression de la TPH de type 1, du récepteur eutopique 5-HT_4 et des récepteurs ectopiques 5-HT_6 et 5-HT_7 dans les cellules stéroïdogènes. Pour l'un des patients avec paraCS, nous avons pu montrer que les cellules corticosurrénaliennes en culture sécrètent du cortisol en réponse à la 5-HT ou à des agonistes des récepteurs 5-HT_4 ou 5-HT_7. Par ailleurs, le rôle de la voie Wnt/β-caténine dans l'apparition des récepteurs illégitimes reste controversé. Nous avons donc évalué l'expression des récepteurs 5-HT_4, 5-HT_6, 5-HT_7, du LH-R et du GIP-R dans une tumeur corticosurrénalienne avec mutation germinale du gène *APC* et deux modèles d'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine dans le cortex surrénalien, incluant des souris génétiquement modifiées et des cellules corticosurrénaliennes humaines en culture primaire. Nos résultats indiquent que l'activation de la voie Wnt/β-caténine favorise une surexpression significative du LH-R dans les 3 modèles étudiés. Globalement, les données issues de notre travail montrent que l'activation de voies de signalisation intracellulaire, comme la voie AMPc/PKA par l'ACTH ou la voie Wnt/β-caténine par des mutations génétiques, favorise l'émergence de systèmes de régulation surrénaliens aberrants. Ils indiquent en outre que la 5-HT intrasurrénalienne est impliquée dans l'hypersécrétion de corticostéroïdes associée à différentes pathologies incluant la maladie de Cushing et le syndrome de Cushing paranéoplasique, le bloc en 21-hydroxylase et l'HMBS. Le recours à des inhibiteurs sélectifs de la tryptophane hydroxylase pourrait donc permettre de réduire l'excès de stéroïdes chez les patients atteints de ces affections.

Mots clés : surrénale, cortisol, ACTH, sérotonine, Wnt/β-caténine, AMPc/PKA, RCPG.