



HAL
open science

Implication du récepteur des glucocorticoïdes en physiopathologie humaine

Géraldine Vitellius

► **To cite this version:**

Géraldine Vitellius. Implication du récepteur des glucocorticoïdes en physiopathologie humaine. Génétique humaine. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS256 . tel-02957217

HAL Id: tel-02957217

<https://theses.hal.science/tel-02957217>

Submitted on 5 Oct 2020

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.

Implication du Récepteur des Glucocorticoïdes en Physiopathologie Humaine

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à L'université Paris Sud

École doctorale n°568 Signalisation et Réseaux intégratifs en biologie
(Biosigne)

Thèse présentée et soutenue à Kremlin Bicêtre, le 4 octobre 2019 par

Géraldine VITELLIUS

Composition du Jury :

Madame la Pr Brigitte DELEMER PUPH, Reims	Président
Madame le Dr Marthe MOLDES CR Inserm, UMR_S 938, Paris	Rapporteur
Monsieur le Pr Antoine TABARIN PUPH, Bordeaux	Rapporteur
Madame le Dr Cindy DEGERNY MCU, Université Paris Sud, Paris	Examineur
Madame le Dr Séverine TRABADO MCU-PH, Inserm U 1185, Paris	Co-Directeur de thèse
Monsieur le Dr Marc LOMBES DR Inserm, Inserm U 1185, Paris	Co- Directeur de thèse

Implication du Récepteur des Glucocorticoïdes en Physiopathologie Humaine

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à L'université Paris Sud

École doctorale n°568 Signalisation et Réseaux intégratifs en biologie
(Biosigne)

Thèse présentée et soutenue à Kremlin Bicêtre, le 4 octobre 2019 par

Géraldine VITELLIUS

Composition du Jury :

Madame la Pr Brigitte DELEMER PUPH, Reims	Président
Madame le Dr Marthe MOLDES CR Inserm, UMR_S 938, Paris	Rapporteur
Monsieur le Pr Antoine TABARIN PUPH, Bordeaux	Rapporteur
Madame le Dr Cindy DEGERNY MCU, Université Paris Sud, Paris	Examineur
Madame le Dr Séverine TRABADO MCU-PH, Inserm U 1185, Paris	Co-Directeur de thèse
Monsieur le Dr Marc LOMBES DR Inserm, Inserm U 1185, Paris	Co- Directeur de thèse

Remerciements

Je tenais à remercier un certain nombre de personnes sans qui ce travail de thèse de sciences n'aurait pas pu aboutir.

Je tiens à remercier :

Madame le Docteur Marthe Moldes et monsieur le Professeur Antoine Tabarin, d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteur et d'avoir partagé vos remarques.

Madame le Docteur Cindy Degerny, d'avoir accepté d'être ma tutrice pour les deux évaluations durant cette thèse et de nous avoir permis d'avancer dans nos questionnements et finalement d'avoir accepté d'être membre de mon jury, en tant qu'examineur.

Madame le Professeur Brigitte Delemer, de m'avoir fait l'honneur de présider ma thèse. Je tenais à vous remercier également pour le travail réalisé ensemble depuis le début de mon internat et qui va se poursuivre durant les prochaines années à Reims.

Mes codirecteurs de thèse Madame le Docteur Séverine Trabado et Monsieur le Docteur Marc Lombès pour ces 4 années enrichissantes au laboratoire : la mise en place de nouvelles technologies avec CRISPR/Cas 9, d'avoir pu connaître de nouvelles techniques comme le sous-clonage, l'immunoprécipitation de chromatine et bien d'autres, de m'avoir poussée tout au long de cette thèse à toujours donner le meilleur de moi.

Madame le Docteur Séverine Trabado, pour m'avoir soutenue et d'avoir toujours été très positive, d'avoir pris du temps pour me faire répéter encore et encore les différentes présentations orales et d'avoir toujours été présente malgré un travail prenant dans le laboratoire d'hormonologie.

Monsieur le Docteur Marc Lombès, pour les nombreux projets que nous avons réalisés ensemble et ceux en cours. Merci pour tes connaissances illimitées, pour ta bonne humeur, pour tout ce que tu apportes au laboratoire et que tu m'as apporté pendant ces 4 années.

Je remercie également la Fondation pour la recherche médicale, qui a financé ces 3 années de thèse.

Je remercie Laetitia Herman, qui nous a donné le plasmide CRISPR/Cas 9 et nous a permis de reprendre espoir dans cette technologie.

Je remercie également Say, incontournable du laboratoire, merci pour ta relecture, Françoise, une maman poule, à qui je raconte tout, je te souhaite de dompter les cellules

HEK, Larbi, merci pour l'IF et j'espère que tes WB finiront par fonctionner, Jérôme F, merci pour ta gentillesse et les modélisations 3D des mutants, Jérôme B, merci pour ta bonne humeur persistance malgré beaucoup de travail dans le service de génétique, Damien, pour tes nombreuses connaissances sur tout et ton aide durant les deux premières années, Thian, pour ta bonne humeur même si c'est pas évident tous les jours, Julie, pour nous faire voyager, mais également à Laetitia, Nadine, Isabelle, Stéphanie, Ingrid, Mohsen, Elena, et Meriem.

Merci à mes 3 amis : Mirella, d'avoir partagé trois années de recherche avec moi, tu seras une merveilleuse maman et j'espère te recroiser souvent aux congrès, Laurence, depuis le M2, on ne s'est quasiment pas quitté, je te souhaite le meilleur professionnellement mais surtout avec mini toi, Simon, pour les petits déjeuners post garde, on se revoit pour ta thèse.

Merci à Annabelle ma cointerne rémoise, futur chef (tu vas déchirer), bientôt la thèse de médecine et la fin de l'internat, Clemence, Geoffrey, Laura et Lucie, de belles rencontres, Loic, la tâche pas toujours facile, d'encadrer un M2, Apolline, Elodie, Alexandre, Patrick pour l'escape game.

Evidemment merci à tous mes amis rémois toujours présents, notamment Sang, Séverine et Melissande et à Manue, pour nos apéros et nos discussions.

Et finalement un énorme merci à ma maman, toujours là en toutes circonstances, pour me pousser au quotidien et à ma sœur, toujours là l'une pour l'autre.

Publications présentées dans cette thèse

Articles :

1- **Vitellius G**, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Trabado S*, Lombes M*. (* equally contributed)

Three Novel Heterozygous Point Mutations of NR3C1 causing Glucocorticoid Resistance.

Hum. Mutat. 2016, 37: 794-803.

2- **Vitellius G**, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, Decoudier B, Guiochon-Mantel A, Lombes M*, Delemer B* & investigators of Muta-GR. (*equally contributed)

Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study.

Eur J Endocrinol 2018, 178: 411-23.

3- **Vitellius G**, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M.

Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling.

Ann Endocrinol, 2018, 79: 98-106.

4- **Vitellius G***, Foussier L*, Bouligand J, Amazit L, Bouvattier C, Young J, Trabado S, Lombès M (*equally contributed)

Functional Characterization of Glucocorticoid Receptor Variants Is Required to Avoid Misinterpretation of NGS Data.

Journal of Endocrine Society, 2019, 3: 865-881.

5- **Vitellius G**, Delemer B, Caron P, Chabre O, Bouligand J, Pussard E, Trabado S*, Lombès M* (* equally contributed)

Impaired 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Glucocorticoid Resistant Patients.

J Clin Endocrinol Metab, 2019, accepted.

6- **Vitellius G** & Lombès M

Partial glucocorticoid resistance in the pathophysiology of adrenal cortex hyperplasia.

Current opinion Endo Metab Res, 2019, accepted.

Présentations orales associées à ce travail :

1- **Vitellius G**, Bouligand J, Fagart J, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Delemer B, Trabado S, Lombès M.

Trois mutations originales du récepteur des glucocorticoïdes révélées par un incidentalome surrénalien.

32^{eme} Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Angers 7-10 Octobre 2015

Ann. Endocrinol. (Paris), 2015, POP, Présentation Orale de Poster

2- **Vitellius G**, Amazit L, Delemer B, Trabado S, Lombès M.

Three Novel Heterozygous Point Mutations of the Human Glucocorticoid Receptor Gene associated with Adrenal Incidentalomas and Glucocorticoid Resistance.

The Endocrine Society 98th Annual Meeting. Boston, Apr 1-4, 2016.

Oral Communication OR 13-3

3- **Vitellius G**, Delemer B, Caron P, Bennet A, Dani C, Bouligand J, Mantel A, Trabado S, Lombès M.

A new Glucocorticoid Receptor mutation underscores the substantial GR mutation prevalence in adrenal hyperplasia patients: Results of the French National Research Program MUTA-GR.

19th European Congress of Endocrinology, ECE 2017, Lisbon, May 20-23, 2017.

Guided Poster, GP7

4- **Vitellius G**, Trabado S, Bouligand J, Hoefler X, Guiochon-Mantel A, Delemer B, Lombès M et les collaborateurs du PHRC Muta-GR.

Résultats du PHRC National Muta-GR : Prévalence des mutations *NR3C1* dans l'hyperplasie bilatérale des surrénales.

34^{eme} Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Poitiers, Oct 11-14, 2017, Ann. Endocrinol. (Paris), 2017,

CO-014, Communication orale

5- Foussier L, **Vitellius G**, Bouligand J, Bouvattier C, Young J, Trabado S, Lombès M.

Méfions-nous du NGS : attention au faux-sens des incidentalomes génétiques avec l'exemple des mutations *NR3C1*.

35^{eme} Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, Sep 12-15, 2018,

Ann. Endocrinol. (Paris), 2018, CO-75, Communication orale

6- **Vitellius G**, Delemer B, Chabre O, Caron P, Pussard E, Bouligand J, Trabado S, Lombès M

Glucocorticoid resistant patients exhibit defective cortisol metabolism responsible for a functional hypermineralocorticoidism.

21th European Congress of Endocrinology, ECE 2019. Lyon, May 19-21, 2019.

Oral Communication, OC 10.2

Table des matières

Liste des Figures	15
Liste des Tableaux	17
Liste des Abréviations	19
Préambule	23
INTRODUCTION	25
1. Les Hormones glucocorticoïdes (GC)	27
1.1 Synthèse des GC.....	27
1.2 Effets biologiques des GC.....	31
1.2-1 L'insuffisance surrénalienne.....	31
1.2-2 Le syndrome de Cushing	32
1.2-3 Modèle d'inactivation du GR	32
1.2-4 Le développement embryonnaire.....	32
1.2-5 Le système immunitaire	33
1.2-6 Le métabolisme osseux	33
1.2-7. La régulation glucidique	33
1.2-8 Le tissu adipeux.....	34
1.2-9 GC et axe hypothalamo-hypophysaire	34
1.2-10 GC et cerveau.....	35
1.3 Mécanisme d'action des GC	35
1.3-1 Le récepteur des minéralocorticoïdes	35
1.3-2 Métabolisme des GC	36
1.3-2.1 <i>HSD11B1</i>	37
1.3-2.2 <i>HSD11B2</i>	38
2. Le récepteur des glucocorticoïdes	39
2.1 Le gène, les isoformes et les variants protéiques.....	39
2.2 La protéine GR	41
2.2-1 le NTD	42
2.2-2 Le DBD.....	43
2.2-3 Le LBD.....	44

2.3 La fonctionnalité du GR.....	45
2.4 Les voies de signalisation du GR.....	46
2.4-1 La voie génomique	46
2.4-2 La transrépression du GR.....	47
2.4-3 La voie non génomique.....	48
2.5 Les modifications post-traductionnelles du GR	49
2.5-1 La phosphorylation du GR	49
2.5-2 L'ubiquitination du GR.....	50
2.5-3 La SUMOylation du GR	51
2.5-4 L'acétylation du GR.....	51
2.5-5 La palmitoylation du GR.....	52
3. Implication du GR en physiopathologie : de l'hypersensibilité à la résistance aux GC	52
3.1 Hypersensibilité aux GC.....	52
3.2 Résistance aux GC	53
3.3. Les polymorphismes du <i>NR3C1</i>	54
3.3-1 Caractérisation fonctionnelle des polymorphismes	54
3.3-2 Les polymorphismes du GR et le syndrome métabolique	57
3.3-3 Les polymorphismes du GR et les incidentalomes surrénaliens.....	57
3.3-4 Les polymorphismes du GR et les troubles psychiatriques	57
3.3-5 Les polymorphismes du GR et les maladies auto-immunes.....	58
4. La résistance aux GC chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR	58
4.1 Hypertension artérielle	61
4.2 Hirsutisme.....	62
4.3 Hyperplasie surrénalienne	62
4.4 Le surpoids	63
4.5 Evolution des patients au cours du temps.....	63
OBJECTIFS DE LA THESE	65
RESULTATS	69

Partie 1 : Caractérisation fonctionnelle <i>in vitro</i> des mutants et variants du GR	71
1. Caractérisation fonctionnelle <i>in vitro</i> de 3 mutations hétérozygotes du GR	73
1.1 Confirmation de la mutation	73
1.2 Exploration fonctionnelle des mutations inactivatrices du GR.....	74
1.3 Nouveaux mutants GR identifiés.....	75
 Article 1 : Three Novel Heterozygous Point Mutations of NR3C1 Causing Glucocorticoid Resistance.....	 77
2. Caractérisation de nouvelles mutations GR identifiées dans les suites du PHRC	89
2.1 Caractéristique clinique, biologique et hormonale des patients porteurs des mutations hétérozygotes R491X, Q501H, Y660X, I757V.....	89
2.2 Expression protéique des mutants du GR	91
Après transfection transitoire, le GR est bien traduit en protéine, qu'il soit de type sauvage (GRWT) ou porteur de mutations introduites par mutagenèse dirigée. Ces données nous permettent d'aller plus loin dans l'étude de la voie de signalisation glucocorticoïde.	91
2.3 Etude de la cinétique de la navette cyto-nucléaire des GR mutants	91
2.4 Caractérisation des fonctions de transactivation des GR mutants	93
2.5 Recherche d'un effet dominant négatif des GR mutants sur le GR sauvage	94
2.6 Recherche d'un effet dominant négatif du GR β Q501H sur le GR α	96
2.7 Modélisation tri-dimensionnelle du GR mutant I757V	97
3. Caractérisation fonctionnelle <i>in vitro</i> de nouveaux variants du GR identifiés par NGS	98
 Article 2 : Functional Characterization of Glucocorticoid Receptor Variants Is Required to Avoid Misinterpretation of NGS Data.....	 99
4. Prolongement du travail et discussion	119
 Partie 2 : Résultats de l'étude nationale française Muta-GR	 125
1. Résultats du Protocole Hospitalier de Recherche Clinique Muta-GR	127

Article 3 : Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study.....	131
2. Poursuite de la caractérisation <i>ex vivo</i> des mutants du GR	147
2.1 Mise en évidence de l'haploinsuffisance du GR	147
2.2 Etude du mécanisme de non-sense mRNA Decay du mutant R491X	151
2.3 Etude de l'haploinsuffisance du mutant Q501H.....	152
3. Etude du mécanisme de pseudohyperaldostéronisme chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR	155
 Article 4 : Impaired 11b-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Glucocorticoid Resistant Patients.....	159
 Partie 3 : Implication physiopathologique du GR dans l'obésité et l'hyperplasie surrénalienne	175
1. Introduction	177
1.1 Implication des GC dans l'obésité	177
1.2 Voie de signalisation des GC dans le tissu adipeux blanc.....	178
1.3 Le rôle du GR dans l'hyperplasie surrénalienne	179
1.3 L'édition du génome par CRISPR/Cas 9	181
2. Matériel et Méthodes	185
2.1 Culture cellulaire	185
2.2 Amorces	185
2.3 Extraction des ARN totaux	186
2.4 RT-qPCR	186
2.5 Western Blot	186
2.6 Red Oil.....	187
2.7 Quantification des gouttelettes lipidiques en HTM.....	187
2.8 CRISPR/CAS 9.....	188

2.8-1 GeneArt Genomic Cleavage Selection kit	188
2.8-2 GeneArt CRISPR Nuclease Vector kit	189
2.9 Appariement des séquences insert et réaction de ligation.....	189
2.10 Transformation bactérienne et extraction des vecteurs	189
2.11 Oligonucleotide de réparation	190
2.12 Transfection	191
2.13 Amorces utilisées pour la PCR allèle spécifique.....	191
2.14 Analyses statistiques des résultats.....	192
3. Résultats	193
4. Discussion et prolongement du travail	201
4.1 L'implication du GR dans l'obésité	201
4.2 L'implication du GR dans l'hyperplasie surrénalienne	203
4.3 Le système CRISPR/Cas 9	204
DISCUSSION GENERALE	205
1. Caractérisation fonctionnelle des mutants <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i>	207
2. Implication du GR en clinique	210
2.1 Corrélation phénotype-caractérisation fonctionnelle	210
2.2 Quand faut-il réaliser un séquençage du GR ?	211
2.3 L'implication du GR dans l'hypertension artérielle	212
2.4 L'implication du GR dans l'hyperplasie surrénalienne	213
2.5 L'implication du GR dans l'obésité	214
3. Perspectives	215
CONCLUSION GENERALE	217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221
Annexe 1 : Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling, Vitellius et al, Ann Endocrinol, 2018	257
Annexe 2 : Partial glucocorticoid resistance in the pathophysiology of adrenal cortex hyperplasia, Vitellius et al, Current opinion Endo Metab Res, 2019	269

Liste des Figures

Figure 1 : Représentation moléculaire des différentes structures des GC.....	27
Figure 2 : Représentation schématique de la stéroïdogénèse	30
Figure 3 : Représentation schématique du rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	31
Figure 4 : Représentation schématique du gène <i>NR3C2</i> et des différents domaines fonctionnels de la protéine.....	36
Figure 5 : Métabolisme du cortisol et de la cortisone	37
Figure 6 : Réactions enzymatiques catalysées par les enzymes 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2...39	
Figure 7 : Représentation schématique des différentes isoformes du GR.....	41
Figure 8 : Représentation schématique du gène <i>NR3C1</i> et de la protéine hGR α ainsi que les différents domaines impliqués dans la transactivation du GR.....	42
Figure 9 : Modélisation des domaines du GR	45
Figure 10 : Représentation schématique des voies de signalisation du GR.	49
Figure 11 : Position des polymorphismes du GR et implication en physiopathologie	55
Figure 12 : Position des mutants du GR et leur localisation génique et protéique	59
Figure 13 : Perte du rétrocontrôle négatif du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien	61
Figure 14 : Positionnement des nouvelles mutations hétérozygotes du GR sur le hGR α	89
Figure 15 : Expression protéique du GR chez les GR mutants	91
Figure 16 : Navette cyto-nucléaire hormono-induite du GRWT et des mutants R491X et Q501H.....	92
Figure 17 : Activité transactivatrice des GR mutants comparée à celle du GR sauvage	94
Figure 18 : Recherche d'un effet dominant négatif du GR mutant sur le GRWT.....	95
Figure 19 : Absence d'effet dominant négatif du hGR β Q501H sur GR α (α WT).....	96
Figure 20 : Modélisation 3D de l'environnement de l'isoleucine 757 et son remplacement par la valine 757	97
Figure 21 : Position des variants du GR identifiés par Sanger et NGS.....	119
Figure 22 : Coupe axiale tomодensitométrique après injection de produit de contraste de l'abdomen du patient porteur de la mutation hétérozygote R469X.....	127
Figure 23 : Localisation de la mutation R469X sur le gène <i>NR3C1</i>	128
Figure 24 : Expression en messager et en protéine du GR dans les fibroblastes des patients porteur des mutations R491X et Q501H.....	148
Figure 25 : Etude de l'expression de gènes cibles endogènes du GR	150

Figure 26 : Etude du mécanisme de Non-Sense Mediated mRNA Decay (NMD) sur le mutant R491X.....	151
Figure 27 : Etude de l'haploinsuffisance du mutant Q501H.....	153
Figure 28 : Métabolites urinaires du cortisol.....	157
Figure 29 : Représentation schématique des glucocorticoïdes dans le tissu adipeux.....	179
Figure 30 : Hyperplasie surrénalienne des souris GR ^{+/-}	181
Figure 31 : Représentation schématique du système CRISPR/Cas 9.....	182
Figure 32 : Protocole de différenciation des hMADS	193
Figure 33 : Caractérisation des cellules pré-adipocytaires humaines (hMADS).....	194
Figure 34 : coloration au red oil des cellules adipocytaires humaines	194
Figure 35 : Protocole expérimental de différenciation adipocytaire	195
Figure 36 : Quantification en microscopie à haut débit (HTM) d'adipocytes matures après blocage à partir de J3 du GR par RU 486	195
Figure 37 : Dessin des gRNA ciblant l'exon 4 et 7 et prédiction des off-targets correspondantes	197
Figure 38 : Evaluation du pourcentage de coupure des guides RNA par TIDE,	199
Figure 39 : Validation de la méthode de PCR allèle spécifique ciblant le mutant Y478C	200
Figure 40 : Position des 31 mutations inactivatrices du GR qui ont été découvertes.....	207

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques génétiques, cliniques et biologiques des patients porteurs de mutations du GR avant 2016	64
Tableau 2 : Caractérisation des mutations de <i>NR3C1</i> et capacité de transactivation des GR mutants	75
Tableau 3 : Caractéristiques clinico-bio-hormonales des patients porteurs des mutations hétérozygotes R491X, Q501H, Y660X, I757V du GR.....	90
Tableau 4 : Résumé des caractéristiques clinique et fonctionnelles des différents variants du GR identifiés.....	120
Tableau 5 : Résumé clinique des patients porteurs de mutations hétérozygotes du GR et le retentissement de ces mutations sur l'hypertension artérielle.	156
Tableau 6 : Résumé de la caractérisation fonctionnelle des 7 mutations hétérozygotes du GR	208
Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et caractérisation fonctionnelle des mutations R491X et Q501H.....	210

Liste des Abréviations

aa : acides aminés

ACTH : *AdrenoCorticoTropin Hormone*, Hormone corticotrope

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AF1 : *Activation Function 1*

AF2 : *Activation Function 2*

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

ARNm : ARN messenger

CBG : *Corticosteroid Binding Globulin*

(CEBP) β : *CCAAT/Enhancer Binding Protein*

ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation

CREB : *c-AMP Response Element-Binding protein*

CRH : *Corticotropin Releasing Hormone*

CTNNB1 : *Catenin Beta 1*

DBD : DNA Binding Domain/ Domaine de liaison à l'ADN

DOC : 11 Désoxycorticostérone

DXM : Dexamethasone

EMSA : *Electromobility Shift Assay*

FACS : Cytométrie en flux et tri cellulaire

FKBP5 : *FK506 Binding Protein 5*

FSH : *Follicle Stimulating Hormone*

GC : Glucocorticoïdes

GIPR : *Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor*

GnRH : *Gonadotropin-Releasing Hormone*

GR : Récepteur des glucocorticoides

GRE : *Glucocorticoid Response Element*

HBS : Hyperplasie Bilatérale des Surrénales

HDAC : Histones DésACétylases

HDL : *High Density Lipoprotein*

H6PDH : *Hexose-6-Phosphate DeHydrogenase*

HHS : Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien

HTA : HyperTension Artérielle

HR : Hinge Region/ Domaine charnière

IMC : Indice de Masse Corporelle

KO : *Knock Out*

LBD : Ligand Binding Domain/ Domaine de liaison au ligand

LDL : *Low Density Lipoprotein*

LH : *Luteinizing Hormone*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MR : Récepteur des Minéralocorticoïdes

NCOR : *Nuclear receptor CO-Repressor*

NGS : *Next Generation Sequencing* / Séquençage de nouvelle génération

NLS1 : Nuclear Localisation Signal 1 / Domaine de Localisation Nucléaire 1

NLS2 : Nuclear Localisation Signal 2 / Domaine de Localisation Nucléaire 2

NMD : *Non sense Mediated mRNA Decay*

NTD : N-Terminal Domain / Domaine N-terminal

OFP : *Orange Fluorescent Protein*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PEPCK : *PhosphoEnolPyruvateCarboxyKinase*

PER1 : *Period Circadian Regulator 1*

POMC : ProOpioMélanoCortine

SGK1 : *Serine and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*

SF1 : *Steroidogenic Factor 1*

SMRT : *Silencing Mediator for Retinoid or Thyroid-hormone receptors*

ssODN : *single stranded ODN / Oligonucléotides simple brin*

SRAA : *Système Rénine Angiotensine Aldostérone*

SRC 1/2/3 : *Steroid Receptor Coactivator 1 (SRC1)*

StAR : *Steroidogenic Acute Regulatory protein*

TBP : *Tata Box binding Protein*

THE : *TetraHydrocortisone*

THF : *TetraHydrocortisol*

TIDE : *Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition*

TIF2 : *Transcriptional Intermediary Factor 2*

TLR : *Toll-Like Receptor*

UCP 1 : *UnCoupling Protein 1*

WB : *Western Blot*

Préambule

Au cours de ma 3^{ème} année d'internat au CHU de Reims, j'ai voulu découvrir la recherche en réalisant un master 2. D'anciennes co-internes ayant déjà réalisé le leur m'ont dirigée vers l'Unité 693, devenue U1185 dirigé par le Docteur Marc Lombès. Les docteurs Marc Lombès et Séverine Trabado, MCU-PH dans le service de génétique moléculaire, pharmacogénétique et hormonologie du CHU du Kremlin Bicêtre, m'ont alors proposé de travailler sur la caractérisation de nouvelles mutations du récepteur des glucocorticoïdes (GR), découvertes au cours du protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC) Muta-GR, codirigé par le Docteur Marc Lombès et le Professeur Brigitte Delemer, chef du service d'Endocrinologie, Diabétologie et Maladies Métaboliques au CHU de Reims. Une première publication réunissant l'équipe de Marc Lombès et du Pr Brigitte Delemer avait porté en 2010 sur la description clinique et la caractérisation fonctionnelle de la première mutation hétérozygote non-sens du GR, la mutation R469X. Cette année de recherche, alliant d'un côté la clinique avec le recueil de données des patients et la recherche fondamentale de l'étude *in vitro* des mutations responsables m'a énormément plu et poussée à poursuivre avec la réalisation d'une thèse de sciences, en accord avec le Professeur Brigitte Delemer.

Ces années ont été passionnantes et enrichissantes. Ce projet dont le point de départ a été l'interprétation des résultats obtenus grâce au PHRC Muta-GR a permis d'allier clinique et recherche, deux axes fondamentaux, à mon sens pour mieux comprendre la physiopathologie du patient. Nous avons également utilisé la nouvelle technologie, CRISPR/Cas 9 pour introduire par *knock-in* les mutations du GR que nous avons identifiées, afin de valider nos hypothèses physiopathologiques.

Cette thèse regroupe le travail de ces 4 années de recherche ayant abouti à la publication de 4 articles scientifiques et de 2 revues.

Ce manuscrit débutera avec une introduction générale comportant 3 chapitres : un premier chapitre sur le récepteur des glucocorticoïdes, puis un second sur le syndrome de résistance aux glucocorticoïdes associé à des mutations inactivatrices du GR et enfin un chapitre sur le retentissement clinique de ces mutations, suivi des objectifs de cette thèse de sciences. La partie résultats sera découpée en 3 parties : la première partie concernera la caractérisation fonctionnelle des différents variants du GR que nous avons découverts, la deuxième partie : les résultats du protocole hospitalier de recherche clinique Muta-GR et une dernière partie présentera l'implication du GR dans l'obésité et l'hyperplasie surrénalienne. Les résultats seront suivis d'une discussion générale avec des perspectives et d'une conclusion générale.

INTRODUCTION

1. Les Hormones glucocorticoïdes (GC)

1.1 Synthèse des GC

Le cortisol, hormone stéroïde liposoluble, endogène, est sécrété par le cortex surrénalien à raison de 10 à 20 mg/jour. Le cortisol est la principale hormone glucocorticoïde (GC) chez l'homme. Elle a une demi-vie entre 70 et 120 minutes. L'hydrocortisone dont la structure est identique à celle du cortisol possède une demi-vie plasmatique de 90 minutes. Il existe de nombreux GC de synthèse avec une durée de vie plus longue que le cortisol. Ils présentent une homologie de structure avec le cortisol : un noyau pregnane. La dexaméthasone (DXM) (**Figure 1**) possède une double liaison C1-C2, associée à un atome de fluor en C-9 α et une méthylation en C-16 et a une durée de vie plasmatique de 300 minutes. La prednisone et la prednisolone ont une durée de vie plasmatique de 200 minutes alors que la bétaméthasone a une demi-vie de 300 minutes. Le transport plasmatique des GC est réalisé par l'albumine ou encore la corticostéroïde binding globulin (CBG ou transcortine) liant 90 % du cortisol circulant (K. E. Chapman et al. 2013). D'autres composés modulant l'action du récepteur des GC (GR) ont été décrits : les agonistes stéroïdiens sélectifs du GR ayant des effets agonistes partiels sur la transactivation du GR et les modulateurs du GR, qui sont des composés non stéroïdiens (Sundahl et al. 2015; He et al. 2014).

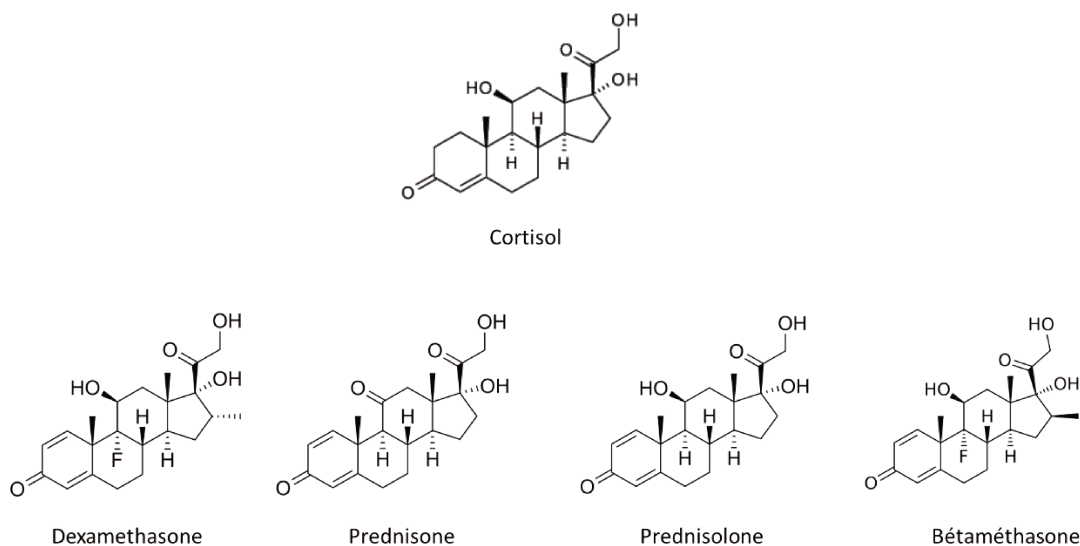


Figure 1 : Représentation moléculaire des différentes structure des GC

Par rapport au cortisol, la dexaméthasone possède une double liaison C1-C2 associée à un fluor en C-9 α et une méthylation en C-16, la prednisone possède une double liaison C1-C2 et une cétone en position 11, la prednisolone possède une double liaison C1-C2, la bétaméthasone, possède également une double liaison C1-C2 associée à un fluore en C-9 α .

Le cortisol, hormone GC endogène, est synthétisé et sécrété par le cortex surrénalien selon un rythme circadien et ultradien chez l'adulte (Lightman et Conway-Campbell 2010). Les glandes surrénales sont formées de deux zones distinctes, d'origines embryologiques différentes : la médullosurrénale en profondeur, siège de la synthèse des catécholamines et dérivée du neuro-ectoderme, et le cortex surrénalien, en périphérie de la glande, dérivé du mesoderme et siège de la synthèse d'hormones stéroïdes (**Figure 2**). Le cortex surrénalien est lui-même constitué de 3 zones concentriques. De la plus externe à la plus interne : la zone glomérulée est impliquée dans la synthèse des minéralocorticoïdes, la zone fasciculée majoritairement dans la synthèse des GC et enfin la zone réticulée est le siège de la synthèse des androgènes surrénaux : la delta-4-Androstènedione (Δ 4-Androsténédione) et le déhydroépiandrostérone (DHEA). Chez l'adulte, la sécrétion pulsatile de cortisol est sous la dépendance de la CRH (corticolibérine ou Corticotropin Releasing Hormone) libérée par le noyau para-ventriculaire de l'hypothalamus. Après sécrétion dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, la CRH va stimuler les cellules corticotropes de l'antéhypophyse en se liant à son récepteur à sept domaines transmembranaires de type 1, CRH-R1, codé par le gène *CRHR1*, situé sur le chromosome 17 (Chang et al. 1993). La liaison de la CRH sur son récepteur est responsable de l'activation de la voie de signalisation impliquant l'AMP cyclique (AMPc) qui va entraîner la transcription du gène codant la pro-opiomélanocortine (POMC), de son expression protéique, puis de sa protéolyse en plusieurs fragments, dont l'adrénocorticotrophine (ACTH) (Kimura et al. 1979). L'ACTH est libérée dans la circulation générale et lie son récepteur à 7 domaines transmembranaires MC2R, codé par le gène *MC2R*, situé le chromosome 18. Le récepteur MC2R est localisé sur la membrane des cellules du cortex surrénalien, et la liaison de l'ACTH entraîne un changement de conformation du récepteur, responsable de l'activation de l'hétérotrimère de protéines G constitué de 3 sous unités : α , β , γ (Villares Frago et al. 2016) et l'activation de la voie de l'adénylate cyclase permettant la production d'AMPc à partir d'ATP. La liaison de 4 molécules d'AMPc sur la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA), permet l'activation et la libération de ses 2 sous unités catalytiques. La PKA est un hétéro-tetramère composé de deux types de sous-unités régulatrices (R1 et R2) codées par 2 gènes différents (R1 α , R1 β , R2 α et R2 β), toutes présentes dans les différentes zones de la surrénale (Weigand et al. 2017) et de 2 sous-unités catalytiques parmi les trois sous-unités codées par le génome humain (C α , C β and C γ). Les sous-unités catalytiques vont phosphoryler un certain nombre d'effecteurs intracellulaires dont le facteur de transcription CREB, qui va alors être activé et s'homodimériser avant de lier des éléments de réponse spécifiques (CRE) dans le promoteur de gènes cibles, notamment steroidogenic factor 1, SF1. Cette voie de signalisation permet l'expression d'enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse, ou encore du transporteur steroidogenic acute regulatory protein, StAR, codé par le gène *STAR*, qui va faciliter l'entrée de cholestérol dans la

mitochondrie. Chaque molécule de StAR nouvellement synthétisée permet l'importation de 100 à 200 molécules de cholestérol du compartiment cytosolique vers la matrice mitochondriale, dix minutes après la transcription de StAR et de très faibles quantités de StAR sont nécessaires pour importer le cholestérol (Artemenko et al. 2001). La présence de cholestérol dans la mitochondrie conduit à la première étape de la stéroïdogénèse et entraîne sa conversion en pregnénolone (**Figure 2**) par le cytochrome P450_{scc} (side chain cleavage) codé par le gène *CYP11A1* (Miller 1988). La voie majeure de synthèse du cortisol est réalisée dans la zone fasciculée par la transformation de la pregnénolone en progestérone par l'isoenzyme II de la 3 β hydroxystéroïde déshydrogénase, codé par le gène *HSD3B2*. Celle-ci est ensuite hydroxylée en 17 hydroxy-progestérone par le cytochrome P450_{c17}, codé par le gène *CYP17*, puis hydroxylée en position 21 permettant la production de 11-désoxycortisol par l'enzyme P450_{c21}, codée par le gène *CYP21A2*. Pour finir, le 11-désoxycortisol est transformé en cortisol par la 11- β hydroxylase, codée par le gène *CYP11B1* (Miller 2018). L'activation de la voie de l'AMPc est donc responsable de la stéroïdogénèse et est impliquée en physiopathologie humaine.

Les mutations sur chacune des enzymes ou transporteurs de la stéroïdogénèse peuvent être responsables d'une hyperplasie surrénalienne et d'un hypercortisolisme biologique (Vitellius et Lombès 2019).

Des mutations activatrices de MC2R, ou de GNAS, codant la sous-unité α de la protéine G, des mutations perte de fonction du gène *PRKAR1A*, codant une des sous-unités régulatrices de la PKA ou encore *PDE11A* et *PDE8B*, codant pour des phosphodiésterases impliquées dans la dégradation de l'AMPc sont responsables d'une activation de la voie de l'AMPc dans la surrénale. La présence de certains récepteurs, illégitimes, c'est à dire non présents physiologiquement dans la zone fasciculée, peut être responsable de l'activation de cette voie de signalisation, comme les récepteurs à la sérotonine ou encore du récepteur du GIP (GIPR : Glucose-dependent insulinotropic peptide receptor) (Lefebvre et al. 2009).

Des mutations perte de fonctions de *CTNNB1*, gène codant pour la β -caténine entraînant une activation de la voie Wnt/ β -caténine ou encore des mutations inactivatrices du gène *APC*, qui joue un rôle important dans la dégradation de la β -caténine ont également été décrites comme responsables d'hyperplasie surrénalienne (Bourdeau et al. 2018).

Ajouté aux mutations précédemment décrites, le rôle de l'ACTH dans la surrénale semble être prépondérant pour la modulation de la prolifération cellulaire et de la stéroïdogénèse. Le rôle de l'ACTH hypophysaire sur la surrénale est bien démontré depuis longtemps et est reflété par le dosage d'ACTH circulant. Mais, récemment, et de manière intéressante, Louiset et al (Louiset et al. 2013) ont montré qu'il existait une production locale d'ACTH par des cellules

localisées autour des nodules d'hyperplasie à partir de tissu humain et que la concentration locale d'ACTH dans l'espace interstitiel était 1.000 fois plus importante que celle dans le plasma (Louiset et al. 2013) responsable d'une augmentation de production de cortisol local.

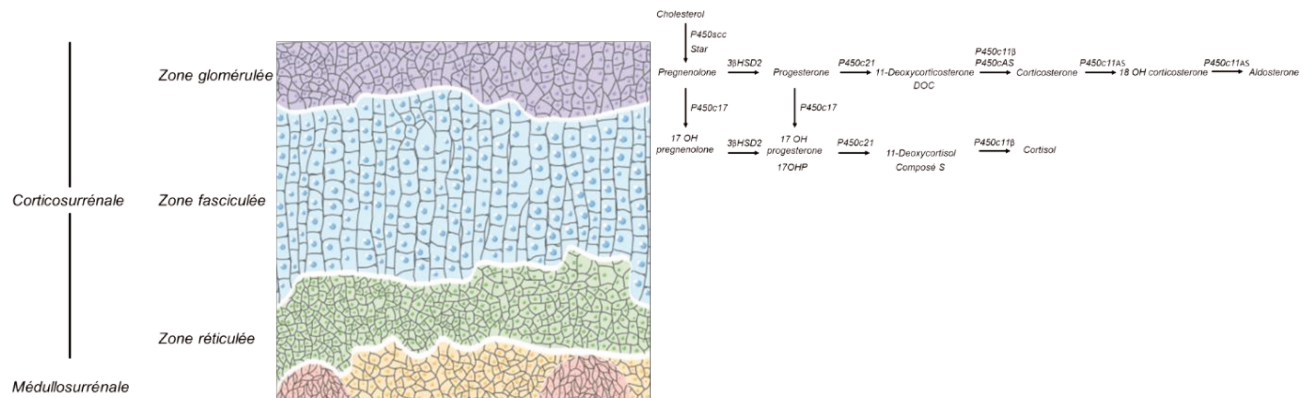


Figure 2 : Représentation schématique de la stéroïdogénèse

A gauche, représentation schématique des différentes zones des glandes surrénales. La zone la plus externe de la surrénale est la corticosurrénale responsable de la sécrétion des stéroïdes. La médullosurrénale, située dans la partie la plus interne de la surrénale, est responsable de la sécrétion des catécholamines. L'aldostérone est synthétisée dans la zone glomérulée (en violet) alors que les glucocorticoïdes sont essentiellement synthétisés dans la zone fasciculée (en bleu) et les androgènes surrénaux principalement dans la zone réticulée (en vert).

A droite, Représentation schématique de la voie de la stéroïdogénèse dans les zones glomérulée et fasciculée.

Comme le montre la **Figure 3**, le cortisol exerce ensuite un rétrocontrôle négatif sur les cellules hypothalamiques en inhibant notamment l'expression et la sécrétion de CRH. Le rétrocontrôle s'exerce également sur les cellules hypophysaires en réprimant notamment la transcription de la POMC, précurseur de l'ACTH (Gomez et al. 1993). Des études antérieures ont montré que le rétrocontrôle négatif du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire passait par des effets non génomiques, dont nous parlerons ultérieurement, responsables de la pulsativité de la sécrétion des GC, avec une fréquence relative d'un pulse par heure (Deng, Riquelme, et al. 2015).

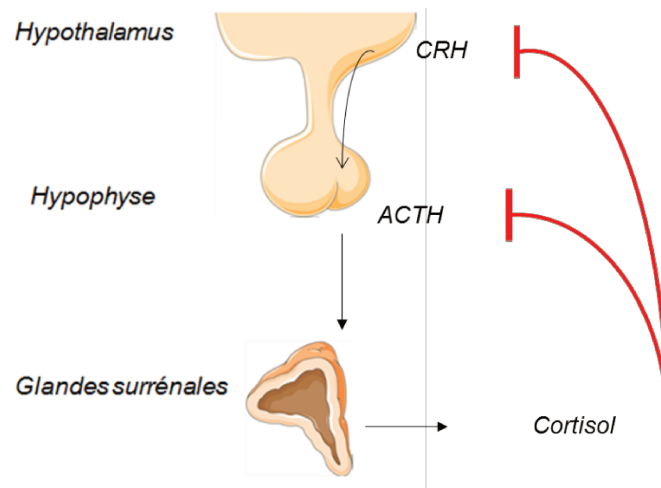


Figure 3 : Représentation schématique du rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien

Le cortisol est sécrété par les glandes surrénales après stimulation par la CRH hypothalamique et par l'ACTH hypophysaire. Ce premier exerce ensuite un rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamique et hypophysaire.

CRH : *Corticotropin Releasing Hormone*, ACTH : *AdrenoCorticoTropin Hormone*

1.2 Effets biologiques des GC

Les GC régulent de nombreuses fonctions dans l'organisme (Kadmiel et al, 2013), notamment la croissance, la reproduction, le système immunitaire et inflammatoire, la cognition et le comportement. Leurs effets biologiques peuvent être mis en évidence lors des états où leur concentration est diminuée comme l'insuffisance surrénalienne ou en excès dans le cadre d'un syndrome de Cushing.

1.2-1 L'insuffisance surrénalienne

Les premiers signes cliniques d'insuffisance surrénalienne ont été décrits par Thomas Addison en 1856 (Addison 1856). Les signes cliniques de la maladie d'Addison étaient la présence d'une fatigue, d'une faiblesse généralisée, d'une anorexie, de douleurs abdominales, d'une perte de poids ou encore d'une hypotension orthostatique associée à une hyperpigmentation de la peau secondaire à l'élévation des peptides dérivés du clivage de la POMC, liant la mélanocortine-1 receptor, MCR 1, présent au niveau cutané (Charmandari, Nicolaidis, et Chrousos 2014). En effet, les signes cliniques résultent du déficit de sécrétion des minéralo et glucocorticoïdes ainsi que des androgènes surrénaliens (Charmandari, Nicolaidis, et

Chrousos 2014). Les signes secondaires à l'hypocortisolisme sont la fatigue, l'anorexie, la perte de poids, les myalgies, la fièvre et l'hypoglycémie (Charmandari, Nicolaidis, et Chrousos 2014).

1.2-2 Le syndrome de Cushing

Lorsque les concentrations en GC sont importantes et inappropriées, on retrouve chez les patients un syndrome de Cushing (Newell-Price et al. 2006). Les patients présentent morphologiquement un hypercatabolisme protidique en lien avec l'excès de GC se traduisant par une amyotrophie quadricipitale, une fragilité cutanée (hématomes spontanés ou lors de traumatisme minime) et une ostéoporose. Ils ont également une modification de la répartition des graisses avec une prise de poids facio tronculaire et une répartition viscérale de la graisse. Les patients peuvent également présenter des troubles psychiatriques tels qu'une dépression ou encore des troubles maniaques mais également des troubles de la libido et des menstruations chez les femmes. Un syndrome métabolique peut également être associé au syndrome de Cushing (Newell-Price et al. 2006).

1.2-3 Modèle d'inactivation du GR

Les modèles de knock-out (KO) total du GR réalisés notamment sur les souris nous apportent également des informations sur le rôle des GC. En 1995, Cole et al, (Cole et al. 1995) ont montré que l'inactivation à l'état homozygote du gène codant le GR (*Nr3c1*) chez la souris était responsable de la mort de ces souris soit avant la mise-bas soit quelques heures après la naissance secondaire à une détresse respiratoire due à une atélectasie pulmonaire. Ces souris GR^{-/-} avaient également une réduction de la glucose-6-phosphatase, enzyme impliquée dans la régulation de la glycémie, une hyperplasie bilatérale des surrénales, associée à des concentrations d'ACTH très élevées. Les cellules chromaffines sont présentes dans la médullosurrénale mais de manière dispersée, et sont incapables de sécréter de l'adrénaline mais sécrètent de la noradrénaline. Les GC, à travers la liaison à leur récepteur semblent donc indispensables à la vie.

Les principales fonctions des GC sont présentées ci-dessous.

1.2-4 Le développement embryonnaire

La surrénale fœtale humaine est constituée de 3 zones : une zone définitive, une zone transitionnelle et une zone foetale. La médulla n'est pas une structure distincte mais consiste en des cellules chromaffines isolées. Après la naissance, la zone définitive et transitionnelle deviennent respectivement la zone glomérulée et fasciculée. La zone réticulée n'apparaît que

6 ans après la naissance et les ilots des cellules chromaffines se regroupent pour former la médulla dans l'espèce humaine (Ishimoto et al, 2011).

Les GC sont importants au moment de l'implantation de l'embryon en réprimant le système immunitaire maternel, empêchant ainsi le rejet de l'embryon (Busada et Cidlowski 2017). Chez l'homme, à 7 semaines de gestation, les premières enzymes de la stéroïdogénèse sont exprimées dans la zone fœtale et la zone transitionnelle exprimant le transporteur StAR et quelques enzymes de la stéroïdogénèse, notamment la 3 β -HSD2 permettant la conversion de la pregnénolone en progestérone et la P450c17 permettant la synthèse des GC (Goto et al. 2006). Parallèlement à la synthèse des GC, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien est actif avec la libération d'ACTH. La production de GC commence vers 8-9 semaines de gestation et s'arrête à 10 semaines de gestation (Parker et al. 1995) et exerce un rétrocontrôle négatif sur l'axe HHS, permettant de contrôler la production d'androgènes surrénaliens (Ishimoto et al, 2011). Puis, à partir de 22 semaines de gestation, la surrénale fœtale recommence à synthétiser des GC permettant la maturation de certains organes comme les poumons (Cole et al. 1995), le cœur (Rog-Zielinska et al. 2013) et le foie.

Les GC maternels sont très élevés au cours de la grossesse et dépassent les concentrations présentes chez le fœtus. L'enzyme 11 β -HSD2, présente au niveau du placenta, dont nous reparlerons plus tard, protège le fœtus des GC maternels (Burton et al, 1999).

1.2-5 Le système immunitaire

Le premier effet des GC, découverts en 1940 est leur effet anti-inflammatoire. Les GC diminuent les médiateurs de l'inflammation tels que NF- κ B, TLR (*Toll-Like Receptor*) ou encore AP-1 pendant la phase de reconnaissance de l'inflammation et également en arrêtant la maturation des cellules dendritiques, en contrôlant leur migration et leur apoptose, ou encore les composants de l'inflammation, par suppression de la migration des polynucléaires neutrophiles pendant l'inflammation. Les GC inhalés sont le traitement de choix des maladies pulmonaires inflammatoires chroniques, telles que l'asthme (Cain et al, 2017).

1.2-6 Le métabolisme osseux

Les GC agissent sur les cellules impliquées dans le renouvellement osseux en diminuant les ostéoblastes, impliqués dans la formation osseuse, en favorisant l'apoptose des ostéocytes et en augmentant les ostéoclastes, impliqués dans la résorption osseuse (Hardy et al. 2018).

1.2-7. La régulation glucidique

La dénomination des GC rappelle leur capacité à convertir les protéines et lipides en glucose au cours du stress. Il a donc été montré que les GC étaient impliqués dans le maintien de

l'homéostasie glucidique en agissant sur différents organes. A long terme, chez des patients présentant un excès de cortisol, les GC sont responsables d'une hyperglycémie et d'une insulino-résistance. En effet, les GC activent la néoglucogenèse hépatique responsable d'une hyperglycémie à jeun et post-prandiale associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline. En période post-absorptive (Sacta et al, 2016), l'insuline inhibe la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique alors que les GC permettent le maintien de la glycémie pendant cette période en augmentant la transcription du gène codant la Phosphoénolpyruvatecarboxykinase (PEPCK), impliquée dans la néoglucogenèse. Les GC entraînent également une augmentation des lipoprotéines. Dans le foie, les GC permettent d'augmenter le stockage de glycogène, en activant la glycogène synthase (Kuo et al. 2015). Au niveau du muscle squelettique, les GC inhibent la recapture du glucose, réduisent le stockage de glycogène et augmentent la dégradation protéique.

1.2-8 Le tissu adipeux

Les GC sont également impliqués dans l'adipogenèse et la différenciation adipocytaire, importante dans le tissu adipeux viscéral. Il a été montré que 20 % des gènes adipocytaires sont sous la dépendance des GC (Lee et al. 2011).

Trois types de tissus adipeux ont été identifiés chez l'homme : le tissu adipeux brun impliqué dans la thermogenèse *via* l'expression de la protéine mitochondriale découplante UCP1, le tissu adipeux blanc le plus abondant, responsable du stockage de l'énergie sous forme de triglycérides et de la sécrétion d'adipokines qui modulent la sensibilité à l'insuline et plus récemment, le tissu adipeux beige, représenté par des cellules différenciables en cellules brunes, a été caractérisé au sein du tissu adipeux blanc (Harms et al, 2013). Dans le tissu adipeux blanc, les GC sont importants dans l'adipogenèse et l'hypertrophie adipocytaire (Gathercole et al. 2013). Les GC inhibent également la recapture du glucose et augmentent la lipolyse. Lors d'un jeun ou d'un exercice, les GC sont impliqués dans l'hydrolyse des triglycérides (TG), par augmentation de l'expression et l'activité de la lipase hormonosensible et des acides gras (AG), responsable à long terme d'une résistance à l'action de l'insuline. Les différents modèles de souris avec un KO adipocytaire du GR montrent que le GR semble être impliqué dans la tolérance glucidique (Dalle et al. 2019) et la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique (Abulizi et al. 2019).

1.2-9 GC et axe hypothalamo-hypophysaire

Les GC diminuent le fonctionnement thyroïdien probablement par une action centrale sur la TRH et une diminution de l'activité des désiodases. Ils sont également responsables d'une

diminution de la fertilité en agissant de manière centrale sur l'hypothalamus et l'hypophyse en inhibant la pulsativité de la *Gonadotrophin Releasing Hormone* (GnRH) (A. E. Oakley et al. 2009) et la sécrétion de *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) et de Luteinizing Hormone (LH) mais également au niveau périphérique en inhibant le fonctionnement des cellules de Leydig (Vierhapper et al, 2000).

1.2-10 GC et cerveau

Le KO du GR dans le système nerveux central est responsable d'une diminution de l'anxiété. L'excès de cortisol est impliqué dans des pathologies neurologiques, comme l'addiction, la schizophrénie, l'état de stress post traumatique ou les troubles de l'humeur (Newell-Price et al. 2006). L'excès de cortisol est également responsable d'anomalie de la substance grise et blanche, d'atrophie cérébrale, d'une diminution du volume de l'hippocampe ou d'un troisième ventricule plus large et est associé chez les patients avec une maladie de Cushing active à des troubles de l'apprentissage ou encore de l'humeur secondaire à une activation anormale des zones cérébrales (Andela et al. 2015).

1.3 Mécanisme d'action des GC

Pour exercer leurs effets sur les différents tissus de l'organisme, les GC peuvent lier deux types de récepteur, le GR, dont nous reparlerons ci-dessous et le récepteur des minéralocorticoïdes (MR).

1.3-1 Le récepteur des minéralocorticoïdes

Le MR, tout comme le GR appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires et est un facteur de transcription. Les membres de la famille des récepteurs nucléaires possèdent une structure très conservée avec un domaine N-terminal (NTD) porteur de domaines de transactivation, un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine de liaison à l'hormone (LBD) (**Figure 4**). Le MR est codé par le gène *NR3C2* chez l'homme, situé sur le chromosome 4 et code une protéine de 984 acides aminés (aa). L'exon 1 est non codant. Le MR existe sous deux isoformes : une isoforme majoritaire (1 α) présente dans tous les tissus où le MR est exprimé et une deuxième isoforme (1 β) est exprimée de façon temporaire au cours du développement et dans certains tissus (Le Menuet et al. 2000). L'exon 2 code le NTD, les exons 3 et 4 codent le DBD et les exons 5 à 9, le LBD (Arriza et al. 1987; Zennaro et al. 1995). Le MR est localisé dans des tissus épithéliaux tels que les tubules contournés distaux, les tubules collecteurs du cortex rénal, le tube digestif (du duodenum au colon) (Rafestin-Oblin et al. 1984; Lombès et al. 1990; Pressley et al. 1975) mais également au niveau des kératinocytes ainsi que dans les glandes sudoripares ou sébacées (Kenouch et al. 1994). Le MR est également présent dans des tissus non épithéliaux tels que le cœur ou le cerveau (au

niveau de l'hippocampe) et le tissu adipeux (Zennaro 1998; Caprio et al. 2007; Van Eekelen et al. 1988). L'aldostérone, synthétisée par la zone glomérulée du cortex surrénalien, est la principale hormone minéralocorticoïde chez l'homme et est capable de se lier et d'activer le MR. Le MR lie avec la même affinité le cortisol et l'aldostérone (Arriza et al. 1987) alors que les concentrations circulantes de cortisol sont 1000 fois plus élevées que celles de l'aldostérone (Funder 2016). Dans les tissus épithéliaux, le MR est physiologiquement activé par l'aldostérone (Funder et al. 1988) alors que dans les tissus non-épithéliaux il est activé principalement par le cortisol. Le cortisol a une affinité beaucoup plus importante pour le MR ($K_d = 0,1-0,5 \text{ nM}$) que pour le GR ($K_d = 2-5 \text{ nM}$ chez le rat et la souris) (Reul et al. 1987).

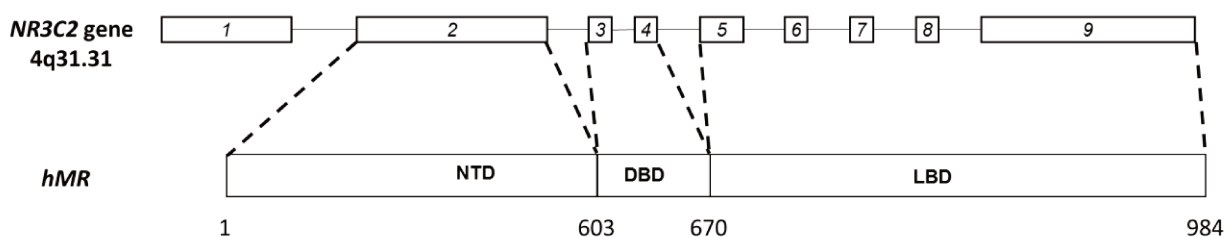


Figure 4 : Représentation schématique du gène NR3C2 et des différents domaines fonctionnels de la protéine.

NTD : Domaine N terminal, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, LBD : Domaine de liaison au ligand

1.3-2 Métabolisme des GC

Quatre-vingt-dix pourcent des GC sont transportés par la CBG ou l'albumine. Les 10 % restant sont sous forme libre et par conséquent vont être capables de lier le GR ou encore le MR. Le cortisol est ensuite ultrafiltré par les reins où il subit une réduction par les enzymes $5\alpha/5\beta$ réductase et 3α hydroxysteroid déshydrogénase donnant lieu aux dérivés urinaires du cortisol : tétrahydrocortisol (THF), tétrahydrocortisone (THE) et allo-tétrahydrocortisol (allo-THF). Le cortisol est également hydroxylé par l'enzyme 6β -hydroxylase donnant le 6β -hydroxycortisol et réduit par une 20-oxo reductase en 20 β -dihydrocortisol (**Figure 5**) (Gathercole et al. 2013). Le métabolisme des GC est aussi régulé par deux enzymes : l'enzyme 11β -HSD1 et 11β -HSD2, appartenant à la superfamille des alcools déshydrogénases à chaînes courtes, utilisant respectivement les cofacteurs NAD^+ ou NADPH , H^+ .

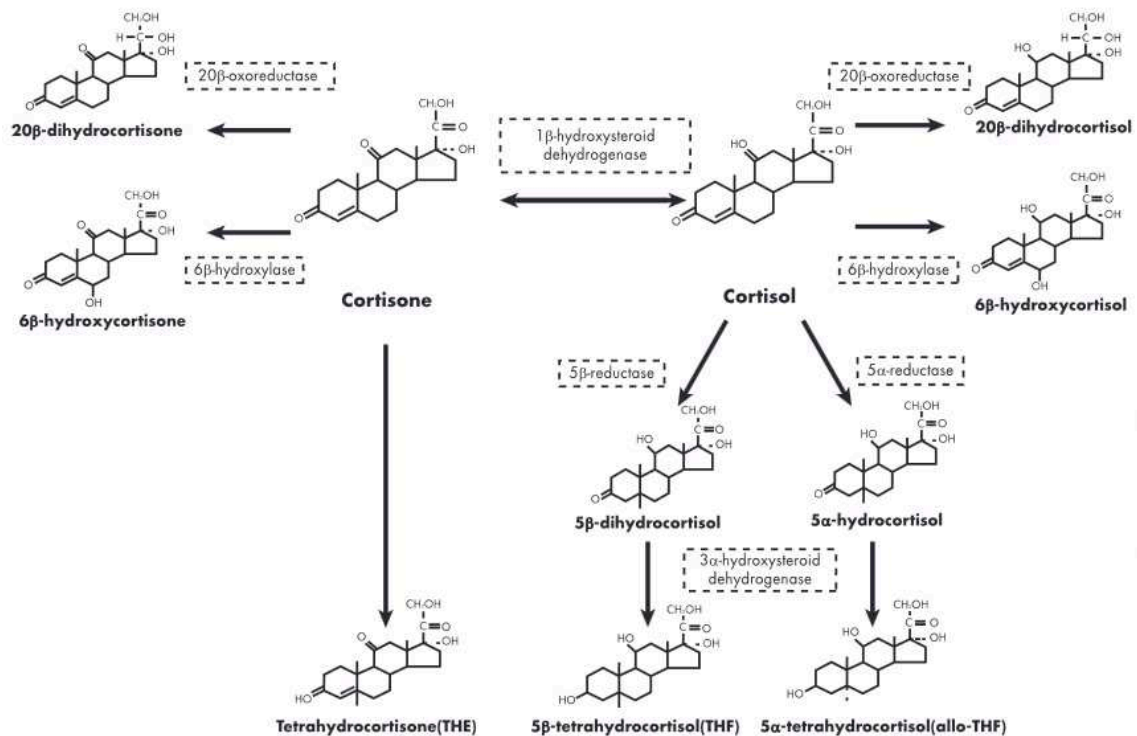


Figure 5 : Métabolisme du cortisol et de la cortisone

issu de l'article de Gathercole *et al* (Gathercole et al. 2013).

1.3-2.1 *HSD11B1*

Le gène *HSD11B1*, codant l'enzyme 11β-HSD1 est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme et comporte 6 exons. La protéine est constituée de 292 aa (White 2018). L'enzyme 11β-HSD1 est une réductase qui convertit la cortisone en cortisol, dépendante de la présence du cofacteur NADPH, H⁺, généré notamment par l'activité de l'enzyme hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PDH) (**Figure 6**) (Atanasov et al. 2004). L'enzyme 11β-HSD1 est exprimée dans les tissus cibles des GC tels que le foie et le tissu adipeux mais également dans les gonades, le cerveau, le tissu oculaire et les muscles (Ricketts et al. 1998). L'enzyme 11β-HSD1 a une faible affinité pour le cortisol (Km 10-50 μM) et un Km à 1,9 ± 0,1 μM pour la cortisone (Hult et al. 1998). Son rôle principal est donc d'augmenter la concentration locale de GC actifs mais aussi d'augmenter également la durée de vie des GC biodisponibles (**Figure 6**). L'augmentation de l'activité de la 11β-HSD1 peut être à l'origine de l'obésité et de l'insulino-résistance. Des études animales sur des souris dépourvues d'enzyme 11β-HSD1 (Kotelevtsev et al. 1997) ont permis de préciser son rôle. En effet, ces souris sont résistantes à la prise de poids et ont un meilleur profil glycémique par rapport aux souris sauvages lors d'une alimentation riche en graisse. Les modèles KO du gène *Hsd11b1* chez la souris montrent que les souris ont une meilleure sensibilité à l'insuline hépatique et musculaire, une meilleure

tolérance glucidique et également un meilleur profil des lipoprotéines (N. M. Morton et al. 2001). Le KO adipocytaire de *Hsd11b1* retrouve une diminution d'accumulation de la graisse viscérale chez les souris (Morton et al. 2004) mais pas lors de l'inactivation génique hépatique (Lavery et al. 2012). Chez l'homme, des mutations inactivatrices de *HSD11B1* ont été décrites responsables d'une diminution de l'activité de l'enzyme 11 β -HSD1 avec un effet dominant négatif lorsque ces mutations sont présentes à l'état hétérozygote (White 2018). Les patients porteurs de ces mutations sont atteints d'un syndrome rare nommé déficit apparent en cortisone réductase, caractérisé par une hyperactivité du cortex surrénalien avec en particulier une hyperandrogénie observée chez la femme et chez les enfants. Des mutations de *H6PDH* sont également décrites, responsables d'un déficit apparent en cortisone réductase (Gathercole et al. 2013). Les études des inhibiteurs de l'enzyme 11 β -HSD1 sur différents animaux étant prometteuses avec une amélioration des paramètres métaboliques, des essais cliniques sont en cours chez l'homme (Boyle et al. 2009).

1.3-2.2 *HSD11B2*

Le gène *HSD11B2* est localisé chez l'homme sur le chromosome 16 et possède 5 exons. Il code une protéine 11 β -HSD2 de 405 aa avec 21 % d'homologie avec la protéine 11 β -HSD1. L'enzyme 11 β -HSD2 a une forte affinité pour les corticostéroïdes (K_m : 10 nM) (White 2018; Brown et al. 1996) et utilise le cofacteur NAD⁺. L'enzyme 11 β -HSD2 catalyse la réaction inverse de l'enzyme 11 β -HSD1 et permet la conversion de GC actifs en forme inactive (**Figure 6**), assurant ainsi une sélectivité hormonale du MR dans les cellules épithéliales en empêchant ainsi les GC de lier le MR (Chapman et al. 2013). En effet, le rôle principal de l'enzyme 11 β -HSD2 est de maintenir la sélectivité du MR pour l'aldostérone dans certains tissus (Funder et al. 1988; Edwards et al. 1988). Le MR est occupé à 90% par le cortisol et 10% par l'aldostérone et la production de NADH, H⁺ lors de la conversion du cortisol en cortisone par l'enzyme 11 β -HSD2 permettrait d'empêcher l'activation du complexe cortisol-MR (Young et al. 2003).

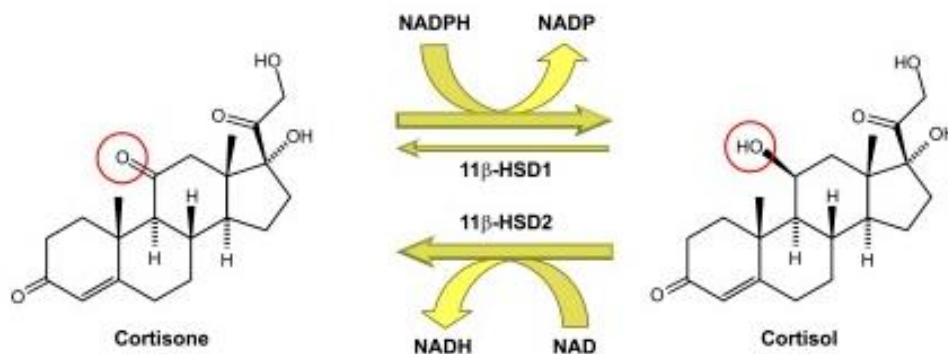


Figure 6 : Réactions enzymatiques catalysées par les enzymes 11β-HSD1 et 11β-HSD2

issu de l'article de Chapman et *al*, 2013

L'enzyme 11β-HSD1 est une réductase qui convertit la cortisone (GC inactif) en cortisol (GC actif), dépendante de la présence du cofacteur NADPH, H⁺, alors que l'enzyme 11β-HSD2 permet la conversion de GC actifs (le cortisol) en forme inactive (la cortisone) avec l'aide du cofacteur NAD⁺.

2. Le récepteur des glucocorticoïdes

Le GR appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires qui compte 48 membres dans l'espèce humaine et les mammifères.

2.1 Le gène, les isoformes et les variants protéiques

Le GR a été cloné pour la première fois en 1985 (Hollenberg et al. 1985) et est codé chez l'homme par le gène *NR3C1*, situé sur le chromosome 5. Son expression est ubiquitaire. Le GR agit comme un facteur de transcription hormono-dépendent, capable d'interagir avec l'ADN. Le gène est constitué d'au moins 10 exons (**Figure 7**). L'organisation génique, les variants protéiques correspondants et la nomenclature des isoformes et variants sont relativement complexes. Il semble exister une région promotrice propre à chaque exon 1, non codant, décrit par Breslin et *al* (Breslin et al. 2001). Turner et *al* (Turner et al. 2005) ont montré qu'il existait 7 exons 1 non-traduits donnant lieu à 7 isoformes de messenger GR : 1-A à 1-H. Chacun de ces 7 exons 1 possède un site donneur d'épissage qu'ils partagent avec un même site accepteur d'épissage contenu dans l'exon 2. L'exon 1-C peut donner naissance à 3 variants différents (1-C1 à 1-C3) (Turner et al. 2005). La présence de chaque variant de l'exon 1 est tissu-spécifique. En effet, les ARNm porteurs des exons 1-B et 1-C sont exprimés dans la plupart des tissus alors que ceux porteurs de l'exon 1-D sont présents dans l'hippocampe. Les messagers porteurs des exons 1-D et 1-E ont été retrouvés dans le système immunitaire

et l'ARNm porteur de l'exon 1-H, dans le foie, le poumon et les muscles lisses (Turner et *al.* 2005). Le contrôle de l'expression du GR est donc différent d'un tissu à l'autre. L'exon 2 est le premier exon codant du GR contenant le codon d'initiation de la traduction (ATG) et code le NTD. Il a été décrit 8 sites d'initiation de la traduction (Lu et *al.* 2005) donnant naissance à 8 protéines distinctes se différenciant par la taille et par conséquent la séquence primaire du NTD (**Figure 7**) : la méthionine 1 qui produit la protéine GR α -A, la méthionine 27 : la protéine GR α -B, la méthionine 86 : la protéine GR α -C1, la méthionine 90 : GR α -C2, la méthionine 98 : GR α -C3 (à distinguer des isoformes 1-C1, 1-C2 et 1-C3 décrites précédemment), la méthionine 316 : la protéine GR α -D1, la méthionine 331 : GR α -D2, et enfin la méthionine 336 : la protéine GR α -D3. Ces différentes protéines ont des activités transcriptionnelles distinctes et entraînent des régulations sélectives et différentes des gènes (notamment le variant GR α -D). Les exons 3 et 4 codent pour le DBD. L'exon 5 code une région charnière d'une dizaine d'aa, s'articulant entre le DBD et le LBD, appelée aussi hinge region (HR). Cette région n'est pas modélisée en raison de l'absence de domaines structurés. La fin de l'exon 5 jusqu'à l'exon 9 codent pour le LBD. Il existe deux exons 9 (exon 9 α et exon 9 β) qui subissent un épissage alternatif responsable des deux principales isoformes hGR α et hGR β (Lewis-Tuffin et *al.* 2006; Oakley et *al.* 1996) et donnant naissance à deux variants protéiques distincts (hGR α et hGR β), différant par leur partie C-terminale du récepteur et donc le LBD.

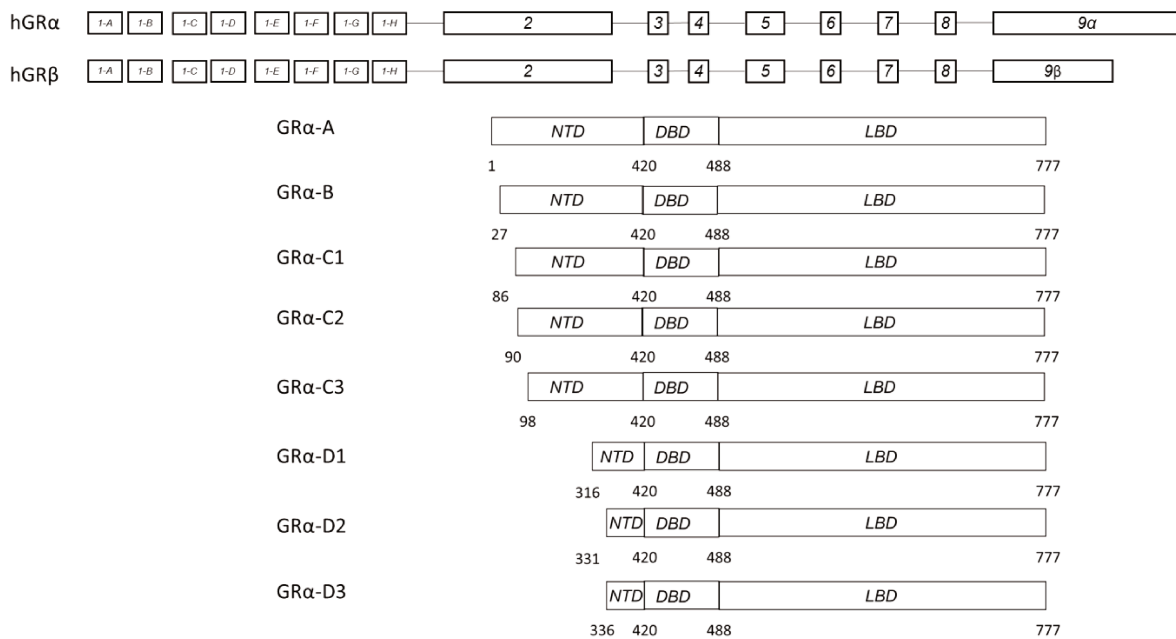


Figure 7 : Représentation schématique des différentes isoformes du GR

Il existe deux exons 9 (exon 9α et exon 9β) qui subissent un épissage alternatif responsable des deux principaux variants hGRα et hGRβ. Huit protéines distinctes, produit par l'utilisation alternative de codon d'initiation de la traduction, se différenciant par la taille et par conséquent la séquence primaire du domaine N-terminal (NTD) : la méthionine 1 qui produit la protéine GRα-A, la méthionine 27 : la protéine GRα-B, la méthionine 86 : la protéine GRα-C1, la méthionine 90 : GRα-C2, la méthionine 98 : GRα-C3, la méthionine 316 : la protéine GRα-D1, la méthionine 331 : GRα-D2, et enfin la méthionine 336 : la protéine GRα-D3. Schéma d'après Lu et al (Lu et Cidlowski 2005).

NTD : Domaine N-termina, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, LBD : Domaine de liaison au ligand

2.2 La protéine GR

L'isoforme majoritairement active est hGRα qui possède 777 aa, composée de quatre principaux domaines (**Figure 8**) : le domaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison à l'ADN (DBD), la région charnière (HR) et le domaine de liaison au ligand (LBD).

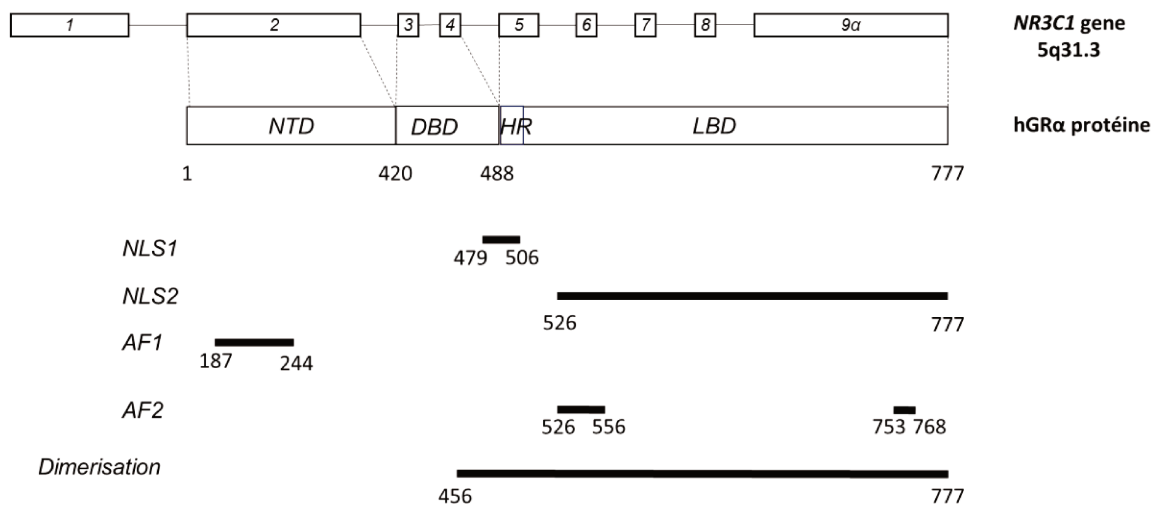


Figure 8 : Représentation schématique du gène *NR3C1* et de la protéine hGR α ainsi que les différents domaines impliqués dans la transactivation du GR

D'après Nicolaidis et *al.* (Nicolaidis, Lamprokostopoulou, et al. 2015)

Le GR est codé par le gène *NR3C1* situé sur le chromosome 5. L'isoforme majoritairement active est hGR α qui possède 777 acides aminés (aa), composée de quatre principaux domaines : le domaine N-terminal (NTD), codé par l'exon 2, possède une fonction activatrice du GR, AF1. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD), codé par les exons 3 et 4 permet la dimérisation du récepteur. Un domaine de localisation nucléaire est situé entre le DBD et la région charnière (HR). Le domaine de liaison au ligand (LBD), codé par les exons 5 à 9 contient un domaine d'activation du récepteur, AF2, un domaine de localisation nucléaire (NLS2) et peut permettre la dimérisation du récepteur.

NLS1 et 2 : un domaine de localisation nucléaire

AF1 et 2 : fonction activatrice du GR, Activation Function 1 et 2

NTD : Domaine N-terminal, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, HR : région charnière entre le DBD et le LBD, LBD : domaine de liaison au ligand

2.2-1 le NTD

Le NTD est constitué de 420 aa (**Figure 4**). La structure tridimensionnelle du NTD n'est pas connue compte tenu de son état de désordre intrinsèque (Motlagh et al. 2015; Khan et al. 2012), mais le NTD est le domaine le moins conservé entre les espèces et entre les différents récepteurs nucléaires. Cependant, ce domaine possède une fonction activatrice du GR, Activation Function 1 (AF1) et plus précisément le domaine tau core 1 ($\tau 1$), situé entre les aa 187 et 244 (Dahlman-Wright et al. 1995). $\tau 1$ possède 60 à 70 % d'activité transactivatrice du GR (Dahlman-Wright et al. 1995) en absence de LBD et par conséquent de ligand (Miranda et al. 2013).

Le NTD, à travers son domaine AF1 est également le domaine privilégié d'interactions avec des co-régulateurs transcriptionnels permettant le recrutement soit de coactivateurs ou de corépresseurs comme p160, TIF2, DRIP/TRAP (Carruthers et al. 2015; Bledsoe et al. 2002).

La liaison de AF1 à la TATA box binding protein (TBP) entraîne l'induction d'une plus grande structure hélicoïdale, et structure davantage la partie NTD du GR, facilitant l'interaction avec d'autres coactivateurs et augmentant l'activité transcriptionnelle du GR (Kumar et al. 2004).

Le NTD interagit également avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine comme le complexe SWI/SNF (Wallberg et al. 2000).

Il est également le siège de modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, ubiquitylations ou sumoylations dont nous reparlerons dans un chapitre dédié (page 37) (Duma et al. 2006; Nicolaidis et al. 2017).

Comme nous l'avons montré précédemment, il existe 8 sites d'initiation de la traduction dans le NTD, responsables de protéines GR différentes avec une troncation plus ou moins importante du NTD. L'isoforme GR α -C3 est plus active que le GR α entier car ce variant a perdu une partie du NTD qui exerce un effet répressif sur le domaine AF1 (Kumar et al. 2010).

2.2-2 Le DBD

Le DBD ou domaine central, très homologue au sein de la famille des récepteurs nucléaires (sorte de signature des récepteurs nucléaires), est constitué de 70 aa et est structuré par 2 doigts de zinc, très conservés tetracoordonnés autour de 4 cystéines (Luisi et al. 1991) (**Figure 9**). Il contient plusieurs domaines fonctionnels : un domaine d'interaction avec l'ADN, des domaines de dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires, homo- ou hétérodimérisation, ainsi que des motifs ou signaux de localisation nucléaire (NLS) et d'export nucléaire (NES). Le premier doigt de zinc contient la boîte P, située dans la partie C-terminale du doigt de zinc, contient 3 aa Gly⁴³⁹, Ser⁴⁴⁰, Val⁴⁴³, est impliqué dans la reconnaissance d'éléments spécifiques sur le promoteur des gènes cibles, les glucocorticoid response element, GRE. Les GRE sont spécifiques au GR (Danielsen et al. 1989; Green et al. 1988), et correspondent généralement à une séquence de 15 nucléotides comportant un palindrome inversé de 6 bases, séparé par trois nucléotides. Leur séquence consensus est la suivante : 5'-AGAACA_nnnTGTTCT-3'. Le deuxième doigt de zinc est impliqué dans l'homodimérisation du récepteur par l'intermédiaire de cinq aa ou boîte D située dans la partie N-terminale du doigt de Zinc avec les aa suivants : Asp⁴⁵⁸, Gly⁴⁵⁹, Arg⁴⁶⁰, Asn⁴⁶¹, et Ala⁴⁶² (Dahlman-Wright et al. 1991).

La région charnière (HR) est une partie moins conservée dans la famille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un domaine flexible faisant un lien entre le DBD et le domaine de liaison au ligand, le LBD. Son rôle précis dans la fonctionnalité du GR reste inconnu mais elle semble être importante dans la liaison à certaines protéines (Yoshikawa et al. 2008).

Entre le DBD et la HR, est présent un signal de localisation nucléaire (NSL1) entre les acides aminés 479 et 506, participant au transfert du complexe ligand-récepteur dans le noyau, en association avec un autre domaine de localisation nucléaire NLS2 porté par le LBD (Picard et

Yamamoto 1987). Quinze aa présents entre les deux doigts de zinc contiennent un signal d'export nucléaire (NES) (Black et al. 2001).

2.2-3 Le LBD

Le LBD est constitué de 251 aa, très conservé entre les espèces et entre les différents récepteurs nucléaires. Il est constitué de 11 hélices α et 4 feuillets β (**Figure 9**). Les hélices H1 et H3 forment une partie de la poche où le ligand va interagir et sont importantes dans la régulation du GR par les protéines chaperons (Cluning et al. 2013; Xu et al. 1998), et les hélices H7 et H10 l'autre partie. Les hélices H4-H5-H8 et H9 sont présentes dans la partie haute de la poche du ligand (Bledsoe et al. 2002). L'hélice H8 est très importante à la fonction du GR, puisque la présence de mutations dans cette hélice est responsable d'une absence de transactivation du GR (Deng, Waxse, et al. 2015). Le ligand se lie dans la cavité inférieure formée par les hélices. Le LBD interagit avec les corégulateurs transcriptionnels (coactivateurs ou corépresseurs) *via* une séquence particulière d'acides aminés : LxxLL mais également grâce à l'environnement hydrophobe des aa des hélices H3, H4, H5 et H12 (Nagy et al. 2004; Feng et al. 1998). Le domaine AF2 du LBD, présent au sein de l'hélice H12, est dépendant de la liaison du ligand. Le LBD possède également un domaine de localisation nucléaire, NLS2 (Picard et Yamamoto 1987) et est également capable de se dimériser (Savory et al. 2001).

L'isoforme hGR β est une protéine de 727 aa, homologue au hGR α pour le NTD et le DBD, et codé par des exons similaires de 1 à 8, mais subissant un épissage alternatif de l'exon 9 produisant une protéine avec un domaine LBD différent n'ayant que 10 hélices.

L'isoforme hGR β possède une séquence additionnelle de 15 aa codant pour une hélice H11 spécifique de hGR β (Oakley et al. 1996). hGR β est incapable de lier le ligand (Oakley et al. 1996) et est exprimé en messenger dans tous les tissus de l'organisme (Lewis-Tuffin et al. 2006). hGR β diminue la transactivation de hGR α lorsqu'il est présent en quantité au moins deux fois plus importante que hGR α (Bamberger et al. 1995), caractérisant l'effet dominant négatif de hGR β sur hGR α . Les aa 733 et 734 jouent un rôle important dans la fonction biologique de hGR β car leur mutation est responsable de l'abolition de l'effet dominant négatif de hGR β sur hGR α . La perte de l'hélice H12 n'est pas la seule responsable de l'effet dominant négatif de hGR β (Yudt et al. 2003). La formation d'hétérodimère inactif semble être la raison principale de l'effet dominant négatif de hGR β (Oakley et al. 1999). hGR β est localisé dans le noyau en absence de ligand et n'a pas d'effet répresseur sur NF κ B contrairement à hGR α (Oakley et al. 1999).

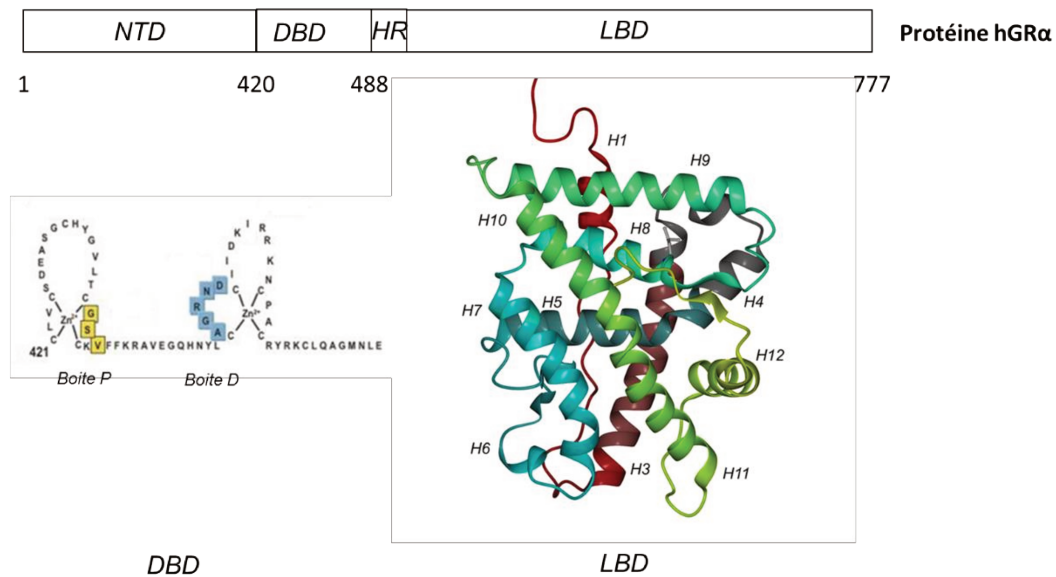


Figure 9 : Modélisation des domaines du GR

Le DBD est constitué de 69 aa et est structuré par 2 doigts de zinc. Le premier doigt de zinc appelé boîte P, dans la partie la plus proximale est impliqué dans la reconnaissance des GRE (Glucocorticoid Response Element) et le deuxième doigt de zinc est impliqué dans l'homodimérisation de récepteur par l'intermédiaire de cinq nucléotides.

Le LBD est constitué de 251 aa, très conservé entre les espèces et entre les différents récepteurs nucléaires. Il est constitué de 11 hélices α et 4 feuillets β .

NTD : Domaine N terminal, DBD : domaine de liaison à l'ADN, HR : Hinge région, LBD : domaine de liaison au ligand

2.3 La fonctionnalité du GR

En absence de ligand, hGR α est localisé principalement dans le compartiment cytoplasmique, lié à un complexe hétéro-oligomérique de protéines co-chaperons : hsp90, hsp70, p23, immunophilines, FKBP51 et FKBP52 par une liaison avec l'hélice H1 du LBD, permettant de le protéger de la dégradation (Cheung et *al.* 2000). Ce complexe maintient le GR dans une conformation inactive (Pratt et *al.* 1997) mais favorise une haute affinité du GR pour son ligand (Kaul et *al.* 2002). Les GC diffusent à travers la membrane cellulaire de façon passive ou facilitée. La liaison des GC à hGR α entraîne un changement de conformation du LBD avec une compaction du LBD associée à un alignement et une fusion des hélices H10 et H11 et un repositionnement de l'hélice H12 sur le ligand, renforçant les interactions du ligand avec la poche hydrophobe du LBD. Les feuillets β relient les hélices H8 et H9 à l'hélice H12 (Bledsoe et *al.* 2002) permettant la stabilisation de l'hélice H12. Ces changements conformationnels entraînent la libération avec les protéines co-chaperons. Dans cette nouvelle conformation, le

domaine AF2, présent au niveau de l'hélice H12 devient alors capable d'interagir avec des coactivateurs transcriptionnels par leurs motifs riches en leucine LxxLL tels que Steroid Receptor Coactivator 1 (SRC1) ou encore transcriptional intermediary factor (TIF2) (Darimont et al. 1998; Lonard et al. 2007) *via* Glu⁷⁵⁵, Lys⁵⁷⁹, Arg⁵⁸⁵ et Asn⁵⁹⁰ (Bledsoe et al. 2002).

La liaison du GR à des molécules antagonistes, comme le RU486 déstabilise l'hélice H12, qui n'est plus dans sa conformation active permettant alors au LBD de lier des corepresseurs transcriptionnels (SMRT et NCOR) (J. D. Chen et al. 1995; Schulz et al. 2002).

Le motif de localisation nucléaire, NLS1 porté par le DBD est ciblé par des importines et permet l'importation du complexe ligand-récepteur dans le comportement nucléaire en quelques minutes alors que le motif NLS2, présent dans le LBD n'est pas ciblé par l'importine α et induit un transfert cyto-nucléaire plus lent, de l'ordre d'une heure du complexe ligand-récepteur (Savory et al. 1999).

2.4 Les voies de signalisation du GR

Trois voies de signalisation du GR sont décrites : la voie génomique classique, la liaison du GR à d'autres facteurs de transcription et enfin la voie non génomique.

2.4-1 La voie génomique

Le GR s'homodimérise avant l'arrivée dans le noyau (Savory et al. 2001) grâce à la séquence présente dans le DBD et HR. Cette interaction est suffisante pour l'homodimérisation du récepteur. L'affinité de l'homodimère GR-GR pour le GRE est augmentée en présence du NTD (Segard-Maurel et al. 1996).

Les domaines AF1 et AF2 du GR permettent le démarrage de la transcription en recrutant des corégulateurs transcriptionnels et en stabilisant la machinerie de l'ARN polymérase II (Miranda et al. 2013).

L'ADN est présent sous une forme compactée et interagit avec des histones pour former le nucléosome (Miranda et al. 2013). La liaison du complexe ligand-GR sur l'ADN des gènes cibles est pré-déterminée par l'accessibilité de la chromatine, qui est cellule-spécifique (John et al. 2011). L'interaction du GR avec des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine comme le complexe SWI/SNF permet de rendre les GRE plus accessibles par déplacement ou retrait des histones (Miranda et al. 2013; Narlikar et al. 2002). Cependant, John et al, ont montré que ces dernières interactions ne concernaient que 5 % des sites de liaison au GR et que 95% d'entre elles étaient d'emblée dans une conformation pré-accessibles (John et al. 2011).

La fonctionnalité d'un GRE est cellule-spécifique. En effet, avec un même traitement agoniste, selon les lignées cellulaires utilisées, le GR ne recrute pas les mêmes gènes et par conséquent ne lie pas les mêmes GRE (Starick et al. 2015).

Différents GRE ont été décrits. Le GRE classique est défini, comme nous vous l'avons déjà expliqué, par un palindrome inversé séparé par trois nucléotides : AGAACAx₃TGTTCT et la liaison du GR au GRE classique est responsable d'une interaction avec les coactivateurs transcriptionnels SRC1, SRC2 et SRC3 (Lonard et al. 2007). Cependant, seule une faible fraction des sites de liaison du GR contient le motif classique du GRE alors que la majorité des sites contient un héli-GRE ou des GRE dégénérés appelé motif composite (Starick et al. 2015). Le dimère du GR interagit davantage avec des motifs composites. Les séquences GRE sont responsables d'une conformation particulière du DBD, menant à différents degrés d'affinité du dimère responsable du recrutement des coactivateurs mais également du recrutement des complexes de remodelage de la chromatine (Meijsing et al. 2009; Vandewalle et al. 2018). Il a également été montré que l'hétérodimère MR-GR cible les mêmes séquences génomiques que l'homodimère GR-GR dans l'hippocampe mais également dans le rein (Le Billan et al. 2018; Mifsud et al. 2016). La liaison d'un monomère de GR sur les héli-sites ou des sites dégénérés GRE peut permettre l'interaction avec d'autres monomères du GR ou d'autres facteurs de transcription tels que AP-1, la famille des STATS ou NF- κ B (Sacta et al. 2016). Seuls 3-4 % des GRE sont proches du site d'initiation de la transcription (Sacta et al. 2016).

Le recrutement des coactivateurs transcriptionnels puis de la machinerie transcriptionnelle associée à l'ARN polymérase permet la création du complexe d'initiation de la transcription et par conséquent la transcription de gènes cibles.

Les protéines co-chaperons HSP90 et p23 sont également recrutées après reconnaissance du GRE par le GR et jouent un rôle dans le désassemblage du complexe de régulation transcriptionnelle (Freeman et al. 2002).

Ces événements transcriptionnels sont très dynamiques (Miranda et al. 2013) et nécessitent en plus du remodelage continu de la chromatine, la présence du GR sur les GRE. La présence du GR dans le noyau dépend également de son recyclage par le protéasome et de la forme non active, liée au complexe des protéines chaperons, cellules-spécifique (Miranda et al. 2013; Stavreva et al. 2004).

2.4-2 La transrépression du GR

La transrépression peut avoir lieu quand le GR lie des nGRE (Surjit et al. 2011). Les nGRE correspondent à des séquences palindromiques inversées, séparées par 0 à 2 nucléotides. La liaison du GR sur les nGRE entraîne le recrutement de corépresseurs transcriptionnels comme NCoR et SMRT (Surjit et al. 2011), qui vont ensuite recruter des histones

désacétylases (HDAC). La présence d'un nGRE peut empêcher la dimérisation du récepteur et seul un monomère de GR est alors lié au nGRE (Hudson et al. 2013).

La liaison d'un monomère de GR avec un autre facteur de transcription peut également lier un hémi-GRE et entraîner la transactivation ou la répression de gènes cibles (Kassel et al. 2007; Belikov et al. 2009).

Le monomère de GR peut également réguler certains gènes par «tethering», c'est à dire par interaction protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription comme AP-1 ou NF- κ B ne faisant pas intervenir la liaison directe du GR sur une cible génomique mais une liaison indirecte à des éléments de réponse sur l'ADN des gènes cibles par l'intermédiaire autres facteurs de transcription (Karin 1998; Kassel et al. 2007; De Bosscher et al. 2000) ou encore avec le complexe Jun-Fos (Touray et al. 1991) et être responsable de la transrépression de gènes cibles.

2.4-3 La voie non génomique

Les GC peuvent également exercer leurs effets très rapidement, en quelques secondes ou minutes notamment après leur administration. Cette voie de signalisation implique la liaison des GC à un GR membranaire, codé par le gène *NR3C1* (Song et al. 2006; Goulding 2004). Cette voie de signalisation, n'est pas inhibée par les inhibiteurs de la transcription, tel que l'actinomycine D (Ayroldi et al. 2012) et est présente également dans des cellules non nucléées (Stellato 2004) suggérant que cette signalisation n'est pas génomique (**Figure 10**).

Les GC liés au GR membranaire interagissent directement avec des membres de la famille mitogen-activated proteine kinase (MAPK) (Ayroldi et al. 2012), par augmentation de la phosphorylation de ERK (Gutiérrez-Mecinas et al. 2011), mais également de la voie de la phosphatidylinositol-3-phosphate, (Solito et al. 2003) ou encore à travers la voie de la phospholipase C (Teng et al. 2013), la voie Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) et la voie de la synapsin-I (Ayroul et al. 2017).

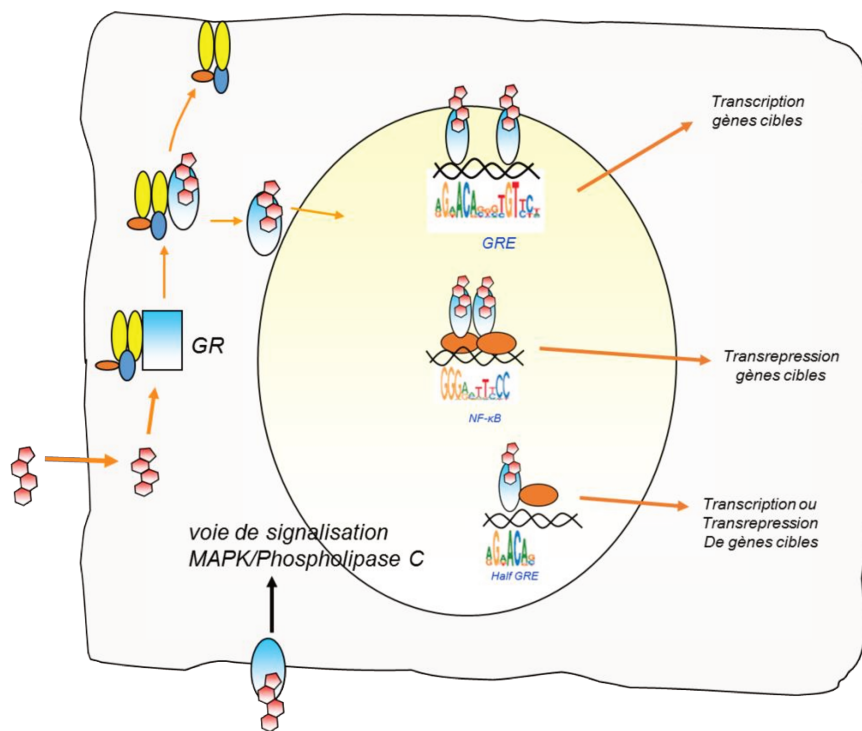


Figure 10 : Représentation schématique des voies de signalisation du GR.

Les différentes voies de signalisation du GR sont décrites. La voie génomique *via* la liaison du GR reconnaissant un élément de réponse spécifique sur l'ADN des gènes cibles, les GRE permettant la transcription des gènes cibles. Le monomère GR peut également se lier sur des demi-GRE associés à d'autres facteurs de transcription permettant soit la transcription soit la transrépression des gènes cibles. Le GR est responsable d'une transrépression des gènes cibles à travers la liaison à des facteurs de transcription tels que NF-κB. Enfin le GR peut également être impliqué par une activation des voies de signalisation MAPK ou encore Phospholipase C à travers la liaison des GC au GR membranaire.

2.5 Les modifications post-traductionnelles du GR

Les modifications post-traductionnelles du GR sont responsables d'une modulation de son activité transcriptionnelle mais aussi de sa stabilité (Gallier-Beckley et *al.* 2009; Duma et *al.* 2006). On présentera succinctement 5 d'entre elles: la phosphorylation, l'ubiquitinylation, la sumoylation, l'acétylation et la palmitoylation.

2.5-1 La phosphorylation du GR

Huit sérines, toutes localisées dans le NTD, peuvent être le siège de phosphorylations par des kinases : la sérine Ser¹¹³, Ser¹³⁴, Ser¹⁴¹, Ser¹⁴³, Ser²⁰³, Ser²¹¹, Ser²²⁶ et Ser⁴⁰⁴. La mutation de cinq d'entre elles (Ser¹¹³, Ser¹⁴¹, Ser²⁰³, Ser²¹¹, Ser²²⁶) est responsable d'une diminution de

transactivation du GR humain (Almlöf et al. 1995) montrant l'importance de la phosphorylation de ces sérines sur l'activité du récepteur.

La phosphorylation du GR au niveau des différentes sérines identifiées est responsable d'une modification de transactivation du GR en fonction des GRE présents sur le promoteur des gènes cibles (Ismaili et al. 2004). En effet, certains auteurs (Mason et al. 1993) ont montré que les mutations de certaines sérines phosphorylables, impliquées dans la transactivation du GR, n'entraînent pas de diminution de transactivation du GR sur ces gènes cibles en présence du MMTV-promoteur, contenant 1 classique GRE et trois hémi-GRE (Zaret et al. 1984; Gouilleux et al. 1991), alors qu'une diminution de transactivation du GR était observée lors de l'utilisation d'un GRE2-promoteur, contenant 2 GRE classiques lorsque les sérines Ser²⁰³ et Ser²¹¹ étaient mutées (Almlöf et al. 1995). Cela suggère donc que la transactivation du GR sur certains GRE ne nécessite pas la phosphorylation de ces sérines alors qu'elle semble importante dans la transactivation d'autres GRE.

Certaines phosphorylations peuvent également être responsables d'une résistance à l'action des GC, comme la phosphorylation de la Ser¹³⁴ par la p38 MAPK (Gallagher-Beckley et al. 2011). Chen et al ont montré que le remplacement de la sérine Ser²²⁶ par une alanine est responsable d'une amélioration de l'activité transactivatrice du GR suggérant que cette phosphorylation est responsable d'une diminution d'activité du GR alors que la phosphorylation de la sérine Ser²¹¹ entraîne un changement conformationnel facilitant le recrutement de certains coactivateurs transcriptionnels (Chen et al. 2008).

L'interaction du GR avec certaines protéines comme TSG101, impliquées dans l'ubiquitinylation du récepteur est modifiée par la phosphorylation des sérines (Almlöf et al. 1995).

L'inhibition de certaines phosphatases, nommées PP4 et PP5 est responsable d'une augmentation de la liaison du GR sur les GRE, et d'une augmentation de transactivation du GR en absence d'hormone (Zuo et al. 1999) suggérant l'importance de la phosphorylation du récepteur.

Les résidus thréonines peuvent être également le siège de phosphorylation.

Finalement, la phosphorylation du récepteur joue aussi un rôle important dans sa stabilité (Webster et al. 1997). Webster et al ont montré en effet que des mutations sur les sites de phosphorylation sont responsables d'une augmentation de la demi-vie de la protéine du récepteur et inhibe sa dégradation ligand dépendante.

2.5-2 L'ubiquitination du GR

Le GR peut également être ubiquitinilé, entraînant sa dégradation par le protéasome. L'ubiquitine est une molécule de 76 aa qui établit un contact covalent avec les lysines présentes au niveau des protéines cibles. Les protéines liées à une ubiquitine ont une affinité

élevée pour le protéasome (Kinyamu, et al. 2005). Le traitement par un inhibiteur du protéasome (MG-132) des cellules transfectées par le GR a montré une absence de dégradation du GR (Wallace et al. 2001). Un motif PEST associant une proline (P), un glutamate (E), une sérine (S) et une thréonine (T) est un site de reconnaissance des ligases permettant le greffage covalent du groupement ubiquitine sur la protéine cible (Rogers et al. 1986). Wallace et al ont montré que la Lys⁴²⁶ chez l'homme était un lieu d'accrochage du groupement ubiquitine et sa mutation permettait d'inhiber la dégradation du GR par le protéasome et d'augmenter la capacité du GR à transactiver des gènes cibles (Wallace et al. 2001).

2.5-3 La SUMOylation du GR

La SUMOylation du GR correspond au greffage covalent d'un polypeptide de 98 aa (11 kDa) (SUMO 1, 2 ou 3, ou une *small-ubiquitin like related protein*) sur des résidus lysines sur un site consensus Ψ KXE où Ψ est un aa aliphatique, K la lysine cible ; X n'importe quel aa et E le glutamate. Trois sites sont le siège de SUMOylation : les lysines K²⁷⁷, K²⁹³ et K⁷⁰³ (Duma et al. 2006; Tian et al. 2002). Le Drean et al ont montré que la présence de SUMO-1 pouvait modifier l'activité transcriptionnelle du GR en fonction des GRE présents sur le promoteur des gènes cibles (Le Drean et al. 2002). Ils ont mis en évidence une augmentation de transactivation en présence de 4 GRE dans le promoteur des gènes cibles et une transrépression en présence de deux GRE. Hua et al ont montré que la présence de SUMO-1 était impliquée dans la transrépression du GR secondairement au recrutement des corépresseurs NcoR1/SMRT/HDAC3 et la liaison au nGRE (Hua et al. 2016). Les motifs SUMO-2 et 3 ont un potentiel inhibiteur moins important que SUMO-1 (Holmstrom et al. 2003).

2.5-4 L'acétylation du GR

D'autres modifications post-traductionnelles ont été décrites comme l'acétylation du GR au niveau d'un motif KxKK (lysine-x-lysine- lysine) impliquant les Lys⁴⁹⁴ et Lys⁴⁹⁵ situées dans HR (Nader et al. 2009). L'acétylation correspond au greffage d'un groupement acétyl sur un résidu de lysine permettant au GR-acétylé d'interagir avec des protéines possédant une activité histone acétyltransférase, tel que p300/CBP. Il s'agit d'un processus dynamique et réversible. Les protéines du cycle circadien (BMAL1 et CLOCK) répriment la transactivation du GR en interagissant *via* le groupement acétyl (Nader et al. 2009). Le GR est désacétylé par les HDAC et un défaut de désacétylation du GR est responsable d'une perte de transrépression de NF- κ B montrant un rôle important de la désacétylation du GR dans la transrépression de gènes cibles (Ito et al. 2006).

2.5-5 La palmitoylation du GR

Pour finir, des études anciennes ont également montré que le GR pouvait être ancré à la membrane plasmique (Bartholome et al. 2004). Tout comme le récepteur aux oestrogènes, le GR peut également être le siège d'une palmitoylation, correspondant à une liaison thioester d'un palmitate à une cystéine, responsable de son ancrage à la membrane (Pedram et al. 2007). Cependant le lieu d'ancrage du palmitate sur le GR reste encore inconnu (Ayrout et al. 2017; Deng, Waxse, et al. 2015; Nicolaidis et al. 2017).

3. Implication du GR en physiopathologie : de l'hypersensibilité à la résistance aux GC

Deux pathologies sont associées à des anomalies du GR : l'hypersensibilité et la résistance aux GC

3.1 Hypersensibilité aux GC

D'un point de vue clinique, les patients présentant une hypersensibilité aux GC, ont été décrits comme ayant un phénotype de syndrome de Cushing (Kino et al. 2003; Iida et al. 1990) pouvant associer une obésité viscérale, une amyotrophie quadricipitale, une ostéoporose, des troubles métaboliques tels que l'insulinorésistance, du diabète de type 2, des dyslipidémies et biologiquement une diminution de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien avec une concentration d'ACTH basse à 8 h et de cortisol sérique normale ou bas.

Russcher et al ont caractérisé fonctionnellement le GR d'une patiente de 9 ans présentant une hypersensibilité aux GC et ont montré une augmentation du nombre de GR dans les leucocytes mononucléaires de cette patiente sans augmentation de la transactivation des gènes cibles endogènes du GR comme GILZ et IL-2 et avec une affinité pour les GC normale (Russcher et al. 2006).

Deux variants du GR sont associés à une hypersensibilité aux GC : le variant D401H (Charmandari et al. 2008) correspondant au remplacement d'un acide aspartique par une histidine dans le DBD et le variant N363S, dont nous reparlerons dans la partie 3.3. Le variant D401H a été découvert chez une patiente de 43 ans qui présentait une hypertension artérielle (HTA) associée à une obésité viscérale, un diabète de type 2 et une dyslipidémie. De manière étonnante cette patiente a biologiquement une élévation des concentrations de cortisol à 8 h et d'ACTH. La caractérisation fonctionnelle *in vitro* de ce variant retrouvait uniquement une augmentation de la capacité de transactivation d'un gène rapporteur MMTV-luciférase du GR

à 2,4 fois par rapport au contrôle sans modification de l'affinité pour les GC, ni de la liaison aux coactivateurs ou à l'ADN. Le variant N363S, dont nous avons déjà discuté dans le paragraphe III, est associé dans certains cas à un syndrome métabolique chez les patients et *in vitro* présente une augmentation de transactivation d'un gène rapporteur GRE-luciférase par rapport au contrôle (Russcher et al. 2005) et une augmentation *ex vivo* du gène GILZ, gène cible endogène du GR.

Nicolaidis et al ont également rapporté le cas d'une fillette de 9 ans présentant une prise de poids progressive associée à des signes cliniques d'un syndrome de Cushing : obésité centrale, atrophie cutanée, répartition centrale des graisses avec un visage rond, régressifs après quelques mois. L'étude du GR n'a retrouvé aucune anomalie (Nicolaidis, Lamprokostopoulou, et al. 2015).

Finalement le diagnostic d'hypersensibilité aux GC se fait tout d'abord cliniquement devant un patient présentant des signes cliniques se rapprochant d'un syndrome de Cushing associé à une hyporéactivité de l'axe HHS. La caractérisation *in vitro* peut ne révéler aucune anomalie et finalement le diagnostic semble être davantage clinico-biologique. D'autres mécanismes sont peut être en cause et les modélisations tridimensionnelles de ces variants pourraient nous apporter des nouveaux éléments sur la stabilité du récepteur ou l'étude du variant hGR β également.

3.2 Résistance aux GC

Cliniquement, les patients ne présentent aucun signe de syndrome de Cushing mais un hypercortisolisme biologique et une absence de rétrocontrôle du cortisol sur l'axe HHS. La résistance à l'action des GC est également décrite dans le cas d'échappement aux traitements par GC ou lorsque les cellules deviennent résistantes à l'apoptose induites par l'action des GC, frein à leur efficacité thérapeutique dans certaines hémopathies ou leucémies. La résistance à l'action des GC peut être généralisée comme dans des cas de mutations germinales inactivatrices du GR, dont nous parlerons dans la partie 4 ou partielles.

Plusieurs mécanismes cellulaires de résistance aux GC ont été rapportés : une diminution de l'expression d'un GR fonctionnel (Rabindran et al. 1987), une haploinsuffisance du GR secondaire à la translocation d'une partie du chromosome 5 contenant les deux premiers exons codant pour le GR avec un autre gène (Emadali et al. 2016), une diminution d'affinité du GR pour son ligand, ou encore la présence d'une mutation somatique du GR (Kunz et al. 2003, Hillmann et al. 2000).

La présence de certaines isoformes du GR dans certains tissus est également impliquée dans la résistance partielle aux GC : l'isoforme GR α -D n'a pas de domaine $\tau 1$ et par conséquent possède une capacité réduite de transactivation des gènes cibles (Lu et al, 2005).

Comme nous l'avons déjà vu, certaines modifications post-traductionnelles du GR telles qu'une diminution de phosphorylation du GR (Gallagher-Beckley et al, 2011), ou encore une augmentation de l'expression de hGR β (Lewis-Tuffin et al, 2006) peuvent être impliquées dans la diminution de transactivation du GR α . Des auteurs ont également montré que le blocage de la transcription au niveau de l'intron B était responsable d'une diminution des niveaux de transcrits et de protéine GR (Sánchez-Vega et al, 2009).

Tous ces mécanismes sont donc responsables d'une résistance cellulaire à l'action des GC.

3.3. Les polymorphismes du *NR3C1*

Plus de 449 variants du GR sont décrits dans la base de données ExAC, en février 2019, présents principalement dans les régions introniques et de l'exon 2, mais davantage de variants du GR sont finalement retrouvés. Mille quatre cents quatre vingt un variants viennent d'être récemment identifiés dans une population de volontaires sains et de malades, dont un tiers sont situés dans l'exon 2 (Leventhal et al. 2019). Pour savoir si ces variants sont délétères, une caractérisation fonctionnelle est indispensable ainsi qu'une exploration des signes cliniques associés.

3.3-1 Caractérisation fonctionnelle des polymorphismes

Cinq polymorphismes ont été fonctionnellement décrits, associés à une résistance ou une hypersensibilité aux GC (**Figure 11**).

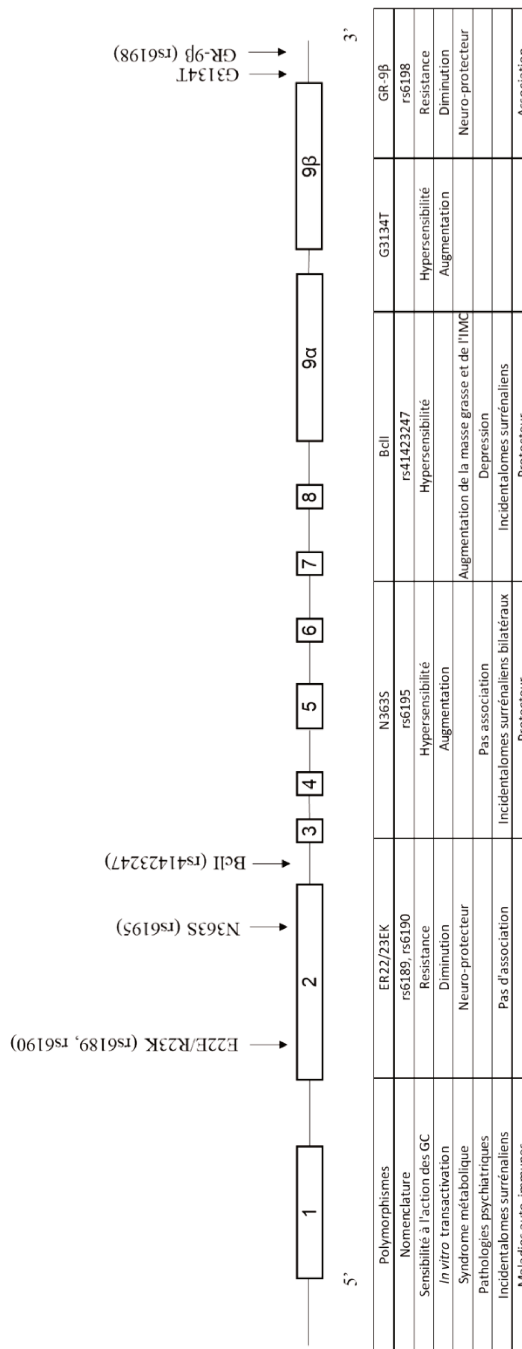


Figure 11 : Position des polymorphismes du GR et implication en physiopathologie

Les polymorphismes ER22/23EK (rs6189/rs6190), correspondant au changement nucléotidique GAG AGG en GAA AAG dans l'exon 2 et donc de codons remplaçant l'arginine en lysine et N363S (rs6195) correspondant au remplacement d'une asparagine par une sérine en position 363, sont situés dans l'exon 2. Le polymorphisme BclI (rs41423247) est localisé dans l'intron 2, correspondant à la substitution d'une cytosine par une guanine. Les polymorphismes A3669G (rs6198) correspondant au remplacement d'une adénine (A) par une guanine (G) et le polymorphisme G3134T correspondant au remplacement d'une guanine par une thymine, sont situés dans la portion 3'-UTR de l'exon 9β.

ER22/23EK (rs6189 et rs6190) correspondant au changement nucléotidique GAG AGG en GAA AAG dans l'exon 2, remplaçant l'Arg en Lys. Le polymorphisme ER22/23EK conduit à une réduction de la capacité transactivatrice du hGR α , associé à une augmentation d'expression de l'isoforme GR α -A (Russcher et al. 2005).

Le polymorphisme N363S (rs6195), localisé également dans l'exon 2 correspond au remplacement d'une asparagine par une sérine en position 363. Il est présent chez 2% de la population générale. Russcher et al ont montré une augmentation de capacité de transactivation de ce variant (Russcher et al. 2005) de 8.0 % \pm 3 % par rapport au GR sauvage d'un gène rapporteur GRE-luciférase et une augmentation ex-vivo du gène GILZ, gène cible endogène du GR.

Des polymorphismes introniques ont été décrits, parmi les plus représentés dans la population générale, on peut trouver notamment *BclI* (rs41423247), localisé dans l'intron 2, correspondant à la substitution d'une cytosine par une guanine. Ce polymorphisme, présent dans 25% de la population générale, est associé à une augmentation de la sensibilité aux GC dans des études d'association (van Rossum et al. 2003). Aucune caractérisation fonctionnelle n'a été réalisée (Rosmond et al. 2008).

Dans la région 3' non traduite de l'ARN messager qui suit le codon stop en position 3' (3'-UTR); deux polymorphismes ont été décrits.

Le premier polymorphisme décrit est le GR-9 β ou A3669G (ou rs6198) correspondant au remplacement d'une adénine (A) par une guanine (G) dans la portion 3' -UTR de l'exon 9 β . Les études fonctionnelles *in vitro* de GR-9 β retrouvent une augmentation de la stabilité du transcrit GR β et une augmentation de la protéine hGR β , qui exerce un effet dominant négatif sur le hGR α (Schaaf et al. 2002).

Le polymorphisme G3134T (rs6191) (Whirlledge et al. 2017), correspondant au remplacement d'une guanine par une thymine, également situé dans la partie 3'-UTR du hGR9 β , a été retrouvé en association avec le polymorphisme A3669G. Santen et al ont réalisé une caractérisation fonctionnelle *in vitro* et une co-transfection d'un plasmide exprimant le hGR α et le hGR β portant ces deux variants associé à un gène rapporteur (Santen et al. 2018). Ces deux polymorphismes G3134T et A3669G étaient responsables d'une augmentation statistiquement significative de transactivation de gènes cibles endogènes du GR comme GILZ probablement secondaire à la perte de l'effet dominant négatif du variant hGR β G3134T sur le hGR α (Santen et al. 2018) et responsable donc d'un gain de fonction.

Les GC, à travers leur liaison au GR ont des rôles très importants en physiologie mais également en physiopathologie. C'est la raison pour laquelle de nombreuses études ont étudié l'association entre la présence de ces polymorphismes et diverses pathologies (Koper et al. 2014) et les résultats sont parfois controversés.

3.3-2 Les polymorphismes du GR et le syndrome métabolique

Une étude de l'équipe de van Rossum et al, a été réalisée pour préciser l'implication des polymorphismes ER22/23EK, N363S, *Bcll* et 9 β dans le développement du syndrome métabolique sur plus de 12 552 patients (Wester et al. 2016). Seule la présence du polymorphisme N363S à l'état hétérozygote était associée à un sur-risque du syndrome métabolique chez les hommes de moins de 47 ans. L'association entre ces polymorphismes et le syndrome métabolique reste donc discutable.

3.3-3 Les polymorphismes du GR et les incidentalomes surrénaliens

Damjanovic et al, ont montré que la présence du polymorphisme *Bcll* était associé à un sur-risque de développer un incidentalome surrénalien (Damjanovic et al. 2012), alors que Majnik et al retrouvent une association entre la sur-représentation du polymorphisme N363S chez les patients avec un incidentalome surrénalien bilatéral (Majnik et al. 2006), sans avoir étudié le polymorphisme *Bcll*. Une autre étude réalisée par Reimondo et al ne retrouve pas d'association entre les polymorphismes *Bcll*, N363S et ER22/23EK et l'incidentalome surrénalien chez 229 patients (Reimondo et al. 2016), tout comme Tzanela et al (Tzanela et al. 2012). L'association entre ces différents polymorphismes et les incidentalomes surrénaliens reste donc très controversée.

3.3-4 Les polymorphismes du GR et les troubles psychiatriques

Le polymorphisme *Bcll* était plus représenté chez les patients dépressifs par rapport aux sujets témoins (van Rossum et al. 2006), alors que Le polymorphisme ER22/23EK est associé à un risque plus bas de développer une démence (van Rossum et al. 2006). Spijker et al, ont également montré une association protectrice de la présence des polymorphismes GR-9 β et Tth111I chez des patients avec une maladie bipolaire, (Spijker et al. 2009).

Les polymorphismes du GR entraînant une hypersensibilité aux GC semblent donc être associés aux troubles dépressifs alors que ceux responsables d'une résistance aux GC semblent être neuro-protecteur.

3.3-5 Les polymorphismes du GR et les maladies auto-immunes

Le polymorphisme *Bcll* semble protecteur dans le cadre de la sévérité de l'ophtalmopathie basedowienne (Boyle et al. 2008). Van Oosten et al ont mis en évidence une faible association entre la présence du polymorphisme N363S et l'arthrite rhumatoïde (van Oosten et al. 2010). Le rôle de l'hypersensibilité aux GC dans les maladies auto-immunes semble là encore être controversé.

Les études d'association semblent donc difficilement mettre en relation des pathologies souvent plurifactorielles avec une hypersensibilité ou une résistance aux GC secondaire à la présence d'un polymorphisme du GR.

4. La résistance aux GC chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR

Le premier cas de résistance aux GC a été publié en 1976 par Vingerhoeds et al (Vingerhoeds et al, 1976). Le propositus, tout comme son fils, présentait une HTA associée à une hypokaliémie. Depuis cette publication princeps, 21 cas index ont été alors décrits dans la littérature au début de ma thèse de sciences associés à 21 mutations inactivatrices du GR, une même mutation ayant été découverte dans deux familles distinctes (Roberts et al. 2013; Bouligand et al. 2010; Ruiz et al. 2001; Velayos et al. 2016; Zhu et al. 2011; Karl et al. 1996; Mendonca et al. 2002; Nicolaidis et al. 2016; Nicolaidis et al. 2015; Nicolaidis et al. 2014; Trebble et al. 2010; Karl et al. 1993; Hurley et al. 1991; Raef et al. 2008; Nader et al. 2010; Charmandari et al. 2007; Charmandari et al. 2005; Vottero et al. 2002; Donner et al. 2013; McMahon et al. 2010; Charmandari et al. 2004) (**Figure 12**).

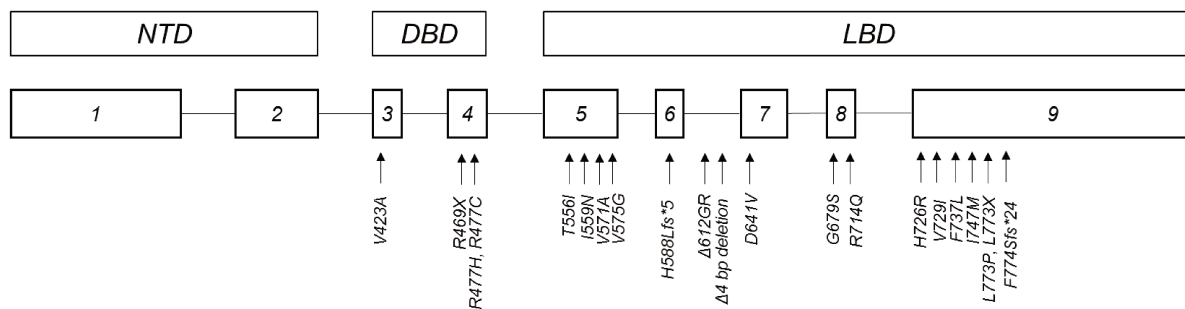


Figure 12 : Position des mutants du GR et leur localisation génique et protéique

21 mutations inactivatrices du GR étaient décrites avant ma thèse de science (2016).

V423A : substitution d'une valine par une alanine, R469X : substitution d'une arginine par un codon stop, R477H : substitution d'une arginine par une histidine, R477C : substitution d'une arginine par une cystéine, T556I : substitution d'une thréonine par une isoleucine, I559V : substitution d'une isoleucine par une valine, V571A : substitution d'une valine par une alanine, V575G : substitution d'une valine par une glycine, H588Lfs*5 : Substitution d'une histidine par une leucine, suivie d'un codon stop prématuré, Δ612GR : délétion d'une paire de base, Δ4 bp deletion : délétion de 4 paires de base, D641V : substitution d'un acide aspartique par une valine, G679S : substitution d'une glycine par une sérine, R714Q : substitution d'une arginine par une glutamine, H726R : substitution d'une histidine par une arginine, V729I : substitution d'une valine par une isoleucine, F737L : substitution d'une phénylalanine par une leucine, I747M : substitution d'une isoleucine par une méthionine, L773P : substitution d'une leucine par une proline, L773X : substitution d'une leucine par un codon stop, F774Sfs*24 : substitution d'une phénylalanine par une sérine, suivie d'un codon stop prématuré.

Les signes cliniques des patients porteurs de mutations du GR sont très variés pouvant être très sévères avec des hypoglycémies néonatales chez les nourrissons ou des hyperandrogénies majeures responsables d'une ambiguïté sexuelle (Vitellius, Trabado, Bouligand, et al. 2018), des HTA résistantes ou des infarctus du myocarde prématuré chez des adultes et des décès, à des signes communs à de nombreuses maladies tels que la fatigue ou encore la dépression mais aucun patient ne présente de signe clinique de syndrome de Cushing. Biologiquement, la majorité des patients, présente un syndrome de résistance aux GC (**Figure 13**) associant à un hypercortisolisme biologique (cortisol libre urinaire des 24 h augmenté), une concentration d'ACTH non freinée (Nieman et al. 2008) et une absence du rétrocontrôle du cortisol (cortisol à 8h >50 nmol/L après prise d'1 mg de dexaméthasone (DXM), la veille) (Fassnacht et al. 2016).

Le séquençage de *NR3C1* codant le GR par la méthode de Sanger a montré que la plupart des mutations étaient hétérozygotes et cinq mutations sont présentes à l'état homozygote, le plus souvent découvertes chez des jeunes enfants (**Tableau 1**) (Vitellius, Trabado, Bouligand, et al. 2018). La majorité des mutations sont des mutations faux-sens correspondant au remplacement d'un acide aminé par un autre et deux mutations sont des mutations non-sens

responsables d'un codon stop prématuré, R469X et L773X. Cinq mutations sont situées dans le DBD et 18 dans le LBD. Dans le DBD, 1 mutation est située dans l'exon 3 et les autres sont situées dans l'exon 4. Dans le LBD, les mutations sont situées dans tous les exons de 5 à 9. Les mutations ont pour la plupart été caractérisées fonctionnellement. Six mutants du GR ont une capacité transactivatrice nulle (R469X, R477H, Δ 612GR, D641V, L773X et F774Sfs*24) et deux de ces mutants (D641V et F774Sfs*24) sont présents à l'état homozygote chez les patients. Plusieurs mutants sont responsables d'une diminution de transactivation du GR sauvage et exercent un effet dominant négatif sur le GR sauvage (Karl et al. 1996; Charmandari, Chrousos, et al. 2005; Charmandari et al. 2007; Vottero et al. 2002). Lorsque ces mutations sont situées dans le DBD, le GR mutant est incapable d'interagir avec l'ADN. Quant aux mutations situées dans le LBD, elles sont responsables d'une diminution d'interaction entre le GR mutant et les coactivateurs transcriptionnels et/ou d'une diminution d'affinité pour le ligand. Certains articles ont exploré l'effet de ces mutations *ex vivo*, soit après isolement des cellules lymphocytaires sanguines du patient (Russcher et al. 2006) soit sur les fibroblastes cutanés du patient (Bouligand et al. 2010). Cela a permis de mettre en évidence une diminution du nombre de GR par cellule, une diminution du nombre de copies de GR α , une augmentation 3 fois plus importante de GR β ou encore l'absence de l'allèle porteur de la mutation secondaire à sa dégradation par un mécanisme de non-sense mediated mRNA decay (NMD).

Les mutations inactivatrices du GR sont responsables d'une insensibilité des tissus cibles à l'action du cortisol et par conséquent d'une perte du rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La concentration d'ACTH, non freinée voir dans certaines situations cliniques élevée, peut entraîner l'élévation du cortisol, d'un agoniste minéralocorticoïde, la 11 désoxycorticostérone (DOC) responsable d'une HTA ou encore des androgènes surrénaliens entraînant un hirsutisme chez les jeunes femmes et une hyperplasie surrénalienne (**Figure 13**). Nous allons donc revenir sur les principaux signes cliniques associés aux mutations perte de fonction du GR.

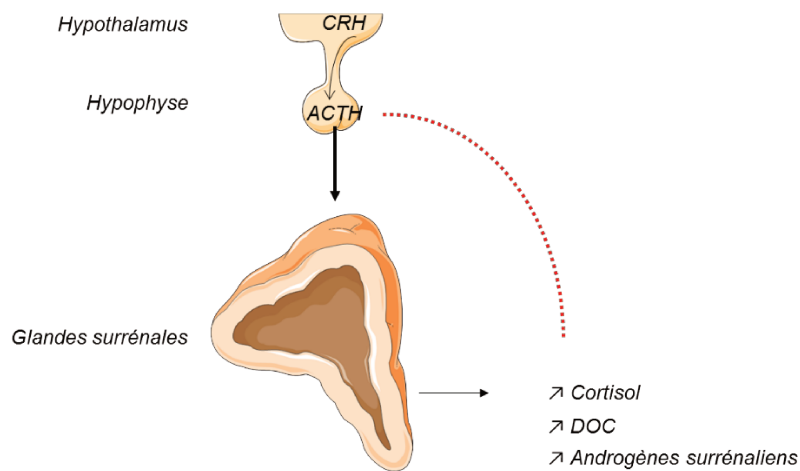


Figure 13 : Perte du rétrocontrôle négatif du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

Les mutations inactivatrices du GR sont responsables d'une perte du rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. La concentration d'ACTH, non freinée peut entraîner l'élévation du cortisol responsable de l'hypercortisolisme biologique, l'élévation d'un agoniste minéralocorticoïde, la 11 désoxycorticostérone (DOC) responsable d'une hypertension artérielle ou encore des androgènes surrénaliens responsable d'un hirsutisme chez la femme et pour finir d'une hyperplasie surrénalienne.

4.1 Hypertension artérielle

L'HTA est décrite pour 11 patients mutés. Il s'agit d'une HTA du sujet jeune puisque les patients ont tous moins de 50 ans. Comme nous pouvons le voir dans le **Tableau 1**, quatre des 5 patients avec des mutations homozygotes ont une HTA, cette information n'est pas décrite pour le cinquième patient.

La kaliémie, décrite pour 7 patients est inférieure à la normale (3,5 mmol/L). La rénine est basse pour les cinq patients pour lesquels nous disposons de l'information alors que le dosage d'aldostérone est dans un cas sur 2 normal ou inférieur aux normes du laboratoire de chaque centre. La concentration plasmatique d'ACTH est élevée chez 8 patients et normale chez un. Le dosage de la corticostérone n'a été réalisé que chez un patient et est élevé alors que le dosage de la DOC est normale chez deux patients et élevé chez un patient.

L'étude des familles, bien que pas toujours exhaustive révèle, parmi les informations disponibles, qu'au sein de la famille porteuse de la mutation hétérozygote R469X, seuls les patients les plus âgés, de 41 à 71 ans, sont hypertendus, alors que dans d'autres familles, la pénétrance de l'HTA est complète et présente même à un jeune âge (G679S et L773X).

Différentes étiologies sont responsables de cette HTA : l'élévation de la DOC ou la corticostérone, agonistes minéralocorticoïdes, secondaire à l'élévation de l'ACTH qui sont

capables de lier et d'activer le MR (Bertagna 2017). Une autre explication est la diminution de l'enzyme rénale 11 β -HSD2 responsable d'une activation du MR par le cortisol (Bouligand et al. 2010). Nous reviendrons sur ce mécanisme physiopathologique dans la partie II des résultats.

4.2 Hirsutisme

Neuf patientes décrites présentent un hirsutisme, souvent à l'origine de la découverte de la résistance aux GC. La concentration plasmatique d'ACTH n'a été étudiée que pour 6 patientes et est élevée dans 5 cas et normale chez une patiente. Les mesures des concentrations de stéroïdes sexuels surrénaliens sont rarement rapportées, la 17 hydroxy-progestérone est élevée chez les deux patientes chez qui elle a été dosée, la Δ -4 androsténédione est élevée chez 2 patientes et normale chez la troisième. La testostérone est normale pour une patiente et élevée pour une autre.

La pénétrance de l'hirsutisme semble également différente au sein d'une même famille : parfois présente chez tous les membres féminins de la famille (V575G et G679S) et parfois uniquement chez quelques membres (Δ 612GR).

L'étiologie de cet hirsutisme décrit jusqu'à présent est l'élévation de l'ACTH circulant (Charmandari 2012) bien que chez un patient ce dosage semble être normal.

4.3 Hyperplasie surrénalienne

Un scanner surrénalien n'est pas systématiquement réalisé chez les patients mutés et nous avons cette information que pour 6 patients. Néanmoins, nous pensons que l'hyperplasie des surrénales pourrait être révélatrice de syndrome de résistance aux GC comme nous le discuterons plus tard. Deux patients ne présentent pas d'hyperplasie surrénalienne, et les 4 autres patients présentent un incidentalome surrénalien, unilatéral pour 1 patient et bilatéral pour les 3 autres. Un des 2 patients mutés, sans hyperplasie surrénalienne, avait une concentration élevée d'ACTH, l'information n'était pas renseignée pour le second patient.

Deux patients présentant un incidentalome surrénalien, soit unilatéral soit bilatéral, ont une concentration élevée d'ACTH et normale pour le deuxième.

La pénétrance de l'hyperplasie bilatérale des surrénales est incomplète chez deux familles étudiées. En effet l'étude de la famille porteuse de la mutation R469X révèle une pénétrance incomplète et une hyperplasie bilatérale des surrénales présente chez 4 membres âgés de 9 à 71 ans sur les 6 membres mutés. Dans la famille porteuse de la mutation V575G, seul un membre de la famille a une hyperplasie bilatérale des surrénales.

Le mécanisme physiopathologique de cette hyperplasie était initialement l'élévation de l'ACTH plasmatique (Charmandari et al. 2007) mais une autre explication potentielle serait l'haploinsuffisance du GR, sans nécessairement d'élévation de l'ACTH, comme l'a montré

Michailidou et al (Michailidou et al. 2008). Nous reparlerons plus en détail de cette hypothèse dans la partie III des résultats.

4.4 Le surpoids

Des études ont montré que l'absence de rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire pouvait être associée à une augmentation de la masse grasse chez les patients avec un hypercortisolisme infra-clinique et un incidentalome surrénalien (Debono et al. 2013). Les indices de masse corporelle (IMC) ne sont notés que pour neuf patients mutés : cinq d'entre eux ont un IMC normal et les quatre autres, un IMC élevé. Le cortisol libre urinaire des 24 h (CLU) est élevé pour tous les sujets avec ou sans surpoids excepté chez un patient. Nous discuterons aussi de cette partie plus en détail dans la partie III des résultats.

4.5 Evolution des patients au cours du temps

Le suivi au cours du temps est décrit de manière variable dans la littérature. Un jeune nourrisson présentant une mutation inactivatrice homozygote du GR associé à un déficit en GH a présenté un sepsis sévère à 4 mois de vie (McMahon et al. 2010). De façon intrigante, le patient porteur de la mutation inactivatrice I559N a développé une maladie de Cushing (Karl et al. 1996) dans les suites de sa surveillance. La découverte de la mutation hétérozygote L773X (Donner et al. 2013) était associée à la présence d'une HTA chez le cas index de 27 ans mais également chez son frère de 38 ans. Ce dernier présentait une hypertrophie ventriculaire gauche et est décédé brutalement alors qu'il ne présentait aucun autre facteur de risque cardiovasculaire. Le suivi au long terme des patients mutés est très variable. Avant de poser le diagnostic de résistance aux GC, l'équipe de Zhu a opéré le patient porteur de la mutation hétérozygote T556I de son incidentalome surrénalien unilatéral sans rémission de l'hypercortisolisme biologique après chirurgie (Zhu et al. 2011).

Ces mutations inactivatrices peuvent donc être associées à des décès et un suivi des patients semble donc indispensable.

Mutations	Localisation protéique	Type de mutations	Age au diagnostique	Sexe	IMC	Hirsutisme	HTA	Hyperplasie Surrénalienne	ACTH	CLU	Test de freination	Transactivation
V423A	DBD	HETEROZYGOTE	9	H			+		+	N		DIMINUEE
R489X	DBD	HETEROZYGOTE	46	H	+		+	Bilatérale	N			NULLE
R477H	DBD	HETEROZYGOTE	41	F	+	OUI	N		N	+		NULLE
R477C	DBD	HETEROZYGOTE	12	F		OUI	N		+	+		NA
T556I	LBD	HETEROZYGOTE	53	H	N		N	Unilatérale	+	+		DIMINUEE
I559N	LBD	HETEROZYGOTE	33	H			N		+	+		DIMINUEE
V571A	LBD	HOMOZYGOTE	9	F		OUI	+		+		-0 mg/1pt4.1pt	DIMINUEE
V575G	LBD	HETEROZYGOTE	70	H			N	Bilatérale	+	+	- (0.5 mg DXM le 6h par 48h)	DIMINUEE
H588LeuF*5	LBD	HETEROZYGOTE	41	F	N	OUI	N		N	+		NA
Δ61ΔGR	LBD	HETEROZYGOTE	20	F	N	NON	N		+	N		NULLE
4 bp deletion	LBD	HETEROZYGOTE	26	F			N		+	+		NULLE
D641V	LBD	HOMOZYGOTE	48	M	+		+	NON	+	+		NULLE
G679S	LBD	HOMOZYGOTE	19	H			+		+	+		DIMINUEE
G679S	LBD	HETEROZYGOTE	31	F		OUI	N		+	+		DIMINUEE
R714Q	LBD	HETEROZYGOTE	2	F		OUI	+		+	+		DIMINUEE
H726R	LBD	HETEROZYGOTE	30	F		OUI			+	+		DIMINUEE
V729I	LBD	HOMOZYGOTE	6	H			N	NON	+	+		DIMINUEE
F737L	LBD	HETEROZYGOTE	7	H	N		+	Bilatérale	+	+		DIMINUEE
I747M	LBD	HETEROZYGOTE	18	F	N	OUI	N		+	+		DIMINUEE
L773P	LBD	HETEROZYGOTE	29	F	+	OUI	+		+	+		DIMINUEE
L773K	LBD	HETEROZYGOTE	27	H			+		+	+		NULLE
F774S*24	LBD	HOMOZYGOTE	INCARRISON	H			+		+		- (12 mg DXM)	NULLE

Tableau 1 : Caractéristiques génétiques, cliniques et biologiques des patients porteurs de mutations du GR avant 2016

IMC : indice de masse corporelle ; CLU : Cortisol libre urinaire des 24heures ; DXM : Dexaméthasone ; Test de freination : test de freinage minute de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien : prise d'un 1 mg de DXM la veille et dosage du cortisol le lendemain. - : absence de freination ; + : freination
H : homme ; F : femme ; N : normale ; NA : information non disponible , en rouge : patient HOMOZYGOTE, DBD : domaine de liaison à l'ADN, LBD : domaine de liaison au ligand

OBJECTIFS DE LA THESE

La découverte de la première mutation hétérozygote non-sens du GR, R469X (Bouligand et al. 2010) chez un patient suivi par le Pr Brigitte Delemer, au CHU de Reims présentant une HTA et une hyperplasie surrénalienne bilatérale associée à une concentration plasmatique d'ACTH normale, a été à l'origine de la mise en place d'un Protocole Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) Muta-GR. Ce PHRC était codirigé par le Docteur Marc Lombès et le Professeur Brigitte Delemer et l'inclusion des patients a commencé en août 2012. L'objectif principal était d'évaluer la prévalence des mutations du GR chez des patients présentant une hyperplasie bilatérale des surrénales et/ou une HTA mais sans signe clinique de Cushing, et/ou un hypercortisolisme biologique.

De nouvelles mutations du GR ont été découvertes dans le cadre de ce PHRC et le premier travail de ma thèse de science a été de caractériser ces mutations *in vitro* afin de comprendre l'impact délétère potentiel de ces mutations sur la signalisation GC.

Cette première partie s'organise autour de 3 sous-parties. La première sous partie présente la caractérisation fonctionnelle de 3 mutants GR, publiée lors de mon master 2 dans la revue Human Mutation (Vitellius et al. 2016).

La deuxième sous partie décrit la poursuite de la caractérisation fonctionnelle de quatre autres mutations hétérozygotes du GR, découvertes en parallèle du PHRC Muta-GR.

Peu de mutations inactivatrices du GR avaient été décrites au moment où j'ai démarré cette thèse alors qu'un nombre croissant de variants du GR sont découverts notamment dans le contexte de nouveaux outils de séquençage comme le séquençage à haut débit (NGS). Ces variants ne semblent pas avoir un impact fonctionnel sur la signalisation GC, cependant les logiciels de prédiction disponibles peuvent être mis en défaut pour prédire le caractère délétère ou non de ces nouveaux variants. Nous avons donc entrepris une caractérisation fonctionnelle pour des variants GR identifiés à l'aide d'une puce NGS au CHU du Kremlin Bicêtre, qui a été publié cette année dans le Journal of Endocrine Society (Foussier, Vitellius et al. 2019).

Cette première partie de thèse nous a permis de mieux comprendre l'impact de ces mutations GR sur la signalisation GC.

La deuxième partie de cette thèse de science a consisté à présenter et analyser les résultats du PHRC Muta-GR.

Cette partie est également subdivisée en plusieurs sous-chapitres. La première sous partie présente le recueil et les résultats du PHRC Muta-GR, ayant fait l'objet d'une publication dans l'European Journal of Endocrinology (Vitellius, Trabado, Hoeffel, et al. 2018).

Nous avons également pu obtenir pour certains patients mutés hétérozygotes des biopsies cutanées, qui ont permis la mise en culture des fibroblastes des propositus avec une expression endogène théoriquement équimolaire du GR sauvage et mutant dans la mesure

où il s'agit de mutations hétérozygotes. Ce modèle, unique et pertinent, permet d'affiner l'étude de la résistance aux GC de ces patients et correspond à la deuxième sous partie.

Par ailleurs, nous avons pu progresser dans l'étude de mécanismes moléculaires sous-jacents au pseudohyperminéralocorticisme fonctionnel et dans l'explication du mécanisme d'HTA présent chez certains patients porteurs de mutation inactivatrice du GR. Ce travail novateur apporte des données originales et bouleverse notre conception historique. Il a été publié dans le Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (Vitellius et al. 2019).

La troisième partie de la thèse de science s'est intéressée à l'étude des mécanismes physiopathologiques responsables de l'hyperplasie surrénalienne et de l'obésité des patients porteurs de mutations inactivatrices du GR.

Afin d'étudier l'implication du GR sur la différenciation adipocytaire, nous avons utilisé un modèle cellulaire humain de préadipocytes, les hMADS en collaboration avec le docteur C.Dani à Nice et avons étudié le retentissement d'une signalisation GR altérée par l'utilisation d'un antagoniste du GR, le RU486.

L'hyperplasie surrénalienne bilatérale chez les patients mutés a été décrite initialement dans un tableau clinique associant des concentrations d'ACTH très élevées alors que les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR découverts dans le cadre du PHRC Muta-GR avaient des concentrations normales d'ACTH circulant. Nous voulions donc étudier l'implication du GR dans les cellules corticosurréaliennes humaines, H295R par introduction de mutations GR, précédemment identifiées, par la technologie de CRISPR/Cas 9.

Ainsi l'ensemble de ce travail de thèse, nous a permis de comprendre le retentissement de ces mutations inactivatrices de GR *in vitro* mais surtout *ex vivo* et de préciser les mécanismes par lesquels ces mutations altèrent la signalisation GC.

Cette thèse nous a surtout permis d'identifier de nouvelles mutations inactivatrices du GR et de mieux en comprendre l'implication physiopathologique chez les patients mutés. En conséquence, ce travail devrait favoriser la mise en place d'un suivi plus adapté des patients mutés et des membres de la famille atteints au cours du temps.

RESULTATS

Partie I

Caractérisation fonctionnelle *in vitro* des mutants et variants du GR

1. Caractérisation fonctionnelle *in vitro* de 3 mutations

hétérozygotes du GR

Au début de la thèse de science, en Novembre 2016, seule une vingtaine de mutations inactivatrices du GR avaient été rapportées dans la littérature (Bouligand et al. 2010; Nicolaidis et al. 2015; Trebble et al. 2010) dont trois que nous évoquerons dans ce chapitre. Les patients étaient porteurs d'un syndrome de résistance aux GC associé à divers signes cliniques (Vitellius, Trabado, Bouligand, et al. 2018) ayant conduits à suspecter une mutation inactivatrice du GR et à l'envoi d'une demande de séquençage du gène *NR3C1* codant le GR.

1.1 Confirmation de la mutation

La technique classiquement et actuellement utilisée pour séquencer le GR est la méthode Sanger (Sanger, et al. 1992). Cette méthode est couteuse, nécessite parfois la réalisation d'un gel d'électrophorèse, et ne permet qu'un séquençage ciblé gène par gène. L'analyse est centrée sur les régions codantes et les régions introniques, entourant les exons. Depuis 2005, une nouvelle méthode de séquençage plus rapide et moins chère a vu le jour : le séquençage de nouvelle génération, le NGS. Avec le NGS on peut désormais cibler un grand nombre de gènes en parallèle et détecter de nouveaux variants (van Dijk et al. 2018; Adams et al. 2018). Le NGS consiste dans un premier temps à fragmenter l'ADN soit par coupure enzymatique soit par sonication. Si l'on souhaite étudier qu'un panel de gènes ciblés ou l'exome, un enrichissement permettant de sélectionner uniquement les fragments d'ADN complémentaires aux gènes recherchés est réalisé. Les fragments d'ADN d'intérêt sont ensuite amplifiés par PCR puis séquencés. Une fois les séquences de 150 paires de bases obtenues, un alignement est réalisé grâce à des programmes de bioinformatique permettant d'obtenir la séquence codante du gène (van Dijk et al. 2018). Un des problèmes générés par ce séquençage à haut débit est le nombre très important de nouveaux variants détectés. Les récentes recommandations américaines indiquent (Richards et al. 2015) l'importance de classer les variants découverts selon le risque de leur pathogénicité. Plusieurs données permettent d'analyser un variant nouvellement découvert (Guillermin et al. 2018) : l'utilisation de logiciel de prédiction permettant de classer le variant en pathogène, ou bénin, la conservation nucléotidique inter-espèce et la modélisation tridimensionnelle de la protéine nouvellement formée lorsqu'elle est connue. D'après les recommandations, lorsque le variant est prédit comme étant un polymorphisme, il n'est pas nécessaire de réaliser des caractérisations fonctionnelles.

1.2 Exploration fonctionnelle des mutations inactivatrices du GR

Les mutations inactivatrices du GR ont été caractérisées fonctionnellement afin de mettre en évidence leur rôle pathogène (**Tableau 2**) (Charmandari et al. 2007).

La caractérisation fonctionnelle permet d'évaluer les différentes étapes de la voie de signalisation du GR.

La liaison du GR aux GC est étudiée par des études de liaison (binding) consistant à étudier l'affinité du GR pour les GC en déterminant la constante de dissociation (K_d), qui se situe autour de 5 nM pour le récepteur sauvage (de Kloet et al. 2005).

Le transfert nucléocytoplasmique du complexe ligand-récepteur est étudié par des méthodes immunocytochimiques à l'aide d'un anticorps, éventuellement fluorescent dirigé contre le GR, après transfection du GR sauvage et mutant dans des cellules humaines dépourvues de GR endogène, et traitement par DXM à différents temps (5-10 min). Cette technique permet de voir la localisation cytosolique et nucléaire du GR sauvage et mutant. L'utilisation de la microscopie à haut débit (HTM), technique d'analyse automatisée, permet de quantifier la localisation subcellulaire cytoplasmique et nucléaire du GR mutant en comparaison au GR sauvage, avec des index appropriés.

La liaison du GR à l'ADN a pu être étudiée par des techniques d'électrophorèse avec retardement sur gel (EMSA), suivie d'autoradiographie mais aussi grâce à de nouvelles techniques comme l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) (Le Billan et al. 2015) qui permet d'évaluer le recrutement du GR sur les séquences régulatrices d'un gène cible et son positionnement génomique.

La liaison du GR aux coactivateurs transcriptionnels a également été étudiée par des expériences de précipitations dites GST pull down, révélée par western blot (WB), mais aussi par co-transfections de coactivateurs transcriptionnels avec le GR sauvage ou les GR mutants.

Enfin, de manière globale des études de transactivation d'un gène rapporteur luciférase *in vitro* sont réalisées à l'aide de la transfection d'un plasmide rapporteur luciférase contenant des GRE, placés en amont du gène codant la luciférase et d'un plasmide normalisateur β -galactosidase. Ces études permettent d'évaluer la capacité transactivatrice d'un mutant GR comparé au GR sauvage.

Ces mutations étant pour la plupart présentes à l'état hétérozygote, des études d'effet dominant négatif sont réalisées. Elles consistent à transférer des quantités similaires de plasmide codant le GR mutant en présence de GR sauvage et d'étudier la capacité résultante

à transactiver un gène rapporteur luciférase. Une transactivation statistiquement inférieure à celle du GR sauvage seule, signe un effet dominant négatif du GR mutant sur le GR sauvage.

Mutations NR3C1	Protéine GR	Genotype	Sexe	Age au diagnostique	Localisation sur le gène NR3C1	Localisation sur la protéine hGR	Transactivation	Références
c.1268 T>C	V423A	heterozygote	H	9	Exon 3	DBD	↘	Roberts, JCEM, 2013
c.1405 C>T	R469X	heterozygote	H	46	Exon 4	DBD	0	Bouligand, Plos One, 2010
c.1430 G>A	R477H	heterozygote	F	41	Exon 4	DBD	0	Ruiz, Clin End, 2001
c.1667 G>T	T556I	heterozygote	H	53	Exon 5	LBD	↘	Zhu, Chinese Medical journal, 2011
c.1676 T>A	I559N	heterozygote	H	33	Exon 5	LBD	↘	Karl, Proc Assos Am Physicians, 1996
c.1712 T>C	V571A	HOMOZYGOTE	F	9	Exon 5	LBD	↘	Mendonca, JCEM, 2002
c.1724 T>G	V575G	heterozygote	H	70	Exon 5	LBD	↘	Nicolaidis, JCEM, 2014
c.1762-1763insTTAC	H588Lfs*5	heterozygote	F	41	Exon 6	LBD	NA	Velayos, Endocrinol Nut, 2017
c.1835 delC	Δ612GR	heterozygote	F	20	Exon 6	LBD	0	Trebbie, JCEM, 2010
4 bp deletion		heterozygote	F	26	Intron 6		NA	Karl M, JCEM, 1993
c.2054 A>T	D641V	HOMOZYGOTE	H	48	Exon 7	LBD	0	Chrousos, JCI, 1990
c.2035 G>A	G679S	HOMOZYGOTE	H	19	Exon 8	LBD	NA	Raef, EJE, 2008
c.2035 G>A	G679S	heterozygote	F	31	Exon 8	LBD	↘	Ruiz et al, Clin Endocrinol, 2001
c.2141 G>A	R714Q	heterozygote	F	2	Exon 8	LBD	↘	Nader, JCEM, 2010
c.2177 A>G	H726R	heterozygote	F	30	Exon 9	LBD	↘	Nicolaidis, EJCI, 2015
c.2185 G>A	V729I	HOMOZYGOTE	H	6	Exon 9	LBD	↘	Charmandari, JCEM, 2004
c.2209 T>C	F737L	heterozygote	H	7	Exon 9	LBD	↘	Charmandari, JCEM, 2007
c.2241 T>G	I747M	heterozygote	F	18	Exon 9	LBD	↘	Vottero, JCEM, 2002
c.2318T>C	L773P	heterozygote	F	29	Exon 9	LBD	↘	Charmandari, JCEM, 2005
c 2317-2318 delCT	L773X	heterozygote	H	27	Exon 9	LBD	0	Donner, EJE, 2013
c 2318-2319 delTG	F774Sfs*24	HOMOZYGOTE	H	Nourrisson	Exon 9	LBD	0	McMahon, JCEM, 2010

Tableau 2 : Caractérisation des mutations de NR3C1 et capacité de transactivation des GR mutants, publiés dans la littérature jusqu'en 2017

LBD : domaine de liaison au ligand, DBD : domaine de liaison à l'ADN, NA : non disponible, 0 : absence de transactivation et ↘ : diminution de transactivation

H : homme ; F : femme

1.3 Nouveaux mutants GR identifiés

Nous avons étudié de nouvelles mutations hétérozygotes du GR découvertes dans le cadre du PHRC Muta-GR (R477S, R491X, Q501H, L672P), dont nous reparlerons dans la partie II des résultats mais également des mutations découvertes avant (Y478C) et après (Y660X et I757V) le PHRC ainsi que des nouveaux variants du GR identifiés à l'aide de la technologie NGS (Foussier, Vitellius et al. 2019).

L'objectif de cette partie est donc de présenter la caractérisation fonctionnelle des nouvelles mutations hétérozygotes du GR, que nous avons déjà publiée dans le journal Human Mutation (R477S, Y478C et L672P) (Vitellius et al. 2016) et un deuxième chapitre consacré à la caractérisation fonctionnelle *in vitro* des autres mutations hétérozygotes du GR (R491X, Q501H, Y660X et I757V). Enfin la troisième partie sera consacrée à la caractérisation fonctionnelle *in vitro* de nouveaux variants du GR découverts par NGS ayant fait l'objet d'un autre article, publié dans la revue Journal of Endocrine Society (Foussier, Vitellius et al. 2019).

Article 1 : Three Novel Heterozygous Point Mutations of NR3C1 causing
Glucocorticoid Resistance

Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F,
Guiochon-Mantel A, Trabdao S, Lombes M

Hum, Mutat, 2016

Three Novel Heterozygous Point Mutations of *NR3C1* Causing Glucocorticoid Resistance

Géraldine Vitellius,¹ Jérôme Fagart,¹ Brigitte Delemer,² Larbi Amazit,^{1,3} Nelly Ramos,¹ Jérôme Bouligand,^{1,4} Florian Le Billan,¹ Frédéric Castinetti,⁵ Anne Guiochon-Mantel,^{1,4} Séverine Trabado,^{1,4†} and Marc Lombès^{1,6*†}

¹INSERM UMR S 1185, Fac Med Paris Sud, Univ. Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre F-94276, France; ²Service d'Endocrinologie, Hôpital Robert Debré, CHU Reims, Reims F-51100, France; ³INSERM UMS-32, Institut Biomédical de Bicêtre, Univ. Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre F-94275, France; ⁴Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, CHU Bicêtre F-94275, France; ⁵Service d'Endocrinologie, Hôpital de la Timone, CHU Marseille, Marseille F-13385, France; ⁶Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre F-94275, France

Communicated by Sergio Ottolenghi

Received 14 January 2016; accepted revised manuscript 12 April 2016.

Published online 27 April 2016 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.23008

ABSTRACT: Generalized glucocorticoid resistance is associated with glucocorticoid receptor (GR; *NR3C1*) mutations. Three novel heterozygous missense *NR3C1* mutations (R477S, Y478C, and L672P) were identified in patients presenting with adrenal incidentalomas, glucocorticoid excess without Cushing syndrome. Dexamethasone (DXM) binding studies demonstrated that the affinity of GR_{R477S} and GR_{Y478C} mutants, located in the DNA-binding domain (DBD) of GR, was similar to wild-type GR ($K_d = 2\text{--}3$ nM). In contrast, GR_{L672P} mutant, located in the ligand-binding domain (LBD) of GR, was unable to bind glucocorticoids and was more sensitive to protein degradation. GR subcellular distribution revealed a marked decrease in DXM-induced nuclear translocation of GR_{R477S} and GR_{Y478C} mutants, whereas GR_{L672P} remained exclusively cytoplasmic. Chromatin immunoprecipitation demonstrated impaired recruitment of DBD mutants onto the regulatory sequence of *FKBP5*. Transactivation assays disclosed the lack of transcriptional activity of GR_{R477S} and GR_{L672P}, whereas GR_{Y478C} had a reduced transactivation capacity. Three-dimensional modeling indicated that R477S lost two essential hydrogen bonds with DNA, Y478C resulted in altered interaction with surrounding amino-acids, destabilizing DBD, whereas L672P altered the H8 helix folding, leading to unstructured LBD. This study identifies novel *NR3C1* mutations with their molecular consequences on altered GR signaling and suggests that genetic screening of *NR3C1* should be conducted in patients with subclinical hypercorticism.

Hum Mutat 37:794–803, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: *NR3C1*; glucocorticoid signaling; adrenal masses; glucocorticoid resistance

Introduction

Glucocorticoids regulate many essential biological functions including metabolism, inflammatory processes, and stress by interacting with the ubiquitously expressed glucocorticoid receptor (GR) [Gross and Cidlowski, 2008]. Human GR (hGR), encoded by the *NR3C1* gene (MIM# 138040), is a ligand-dependent transcription factor. *NR3C1* mutations have been associated with primary glucocorticoid resistance (MIM# 615962), characterized by a generalized partial insensitivity to glucocorticoid action [Charmandari et al., 2008]. However, up to date, only 17 hGR mutations have been described [Bouligand et al., 2010; Nicolaidis et al., 2015; Trebble et al., 2010]. Fourteen GR mutations found heterozygous were located in the ligand-binding domain (LBD) of GR, most of them being familial and discovered in adulthood with variable clinical presentation from severe symptoms to mild or subclinical hypercorticism. Glucocorticoids synthesized by the adrenal cortex are mostly under the dependence of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA). The loss-of-function GR mutations results in the loss of the negative feedback loop of cortisol on the hypothalamus and the pituitary gland, thereby driving an increase in hypothalamic corticotropin releasing hormone (CRH) and pituitary corticotropin hormone (ACTH). Subsequently, the inappropriate ACTH secretion results in adrenal hyperplasia and increased production of adrenal steroids. Androgen excess can be responsible of hyperandrogenic signs (hirsutism, acne) [Vottero et al., 2002] or ambiguous genitalia at birth [Mendonca et al., 2002]. Arterial hypertension may constitute the first sign of primary glucocorticoid resistance syndrome, due to hyperaldosteronism [Charmandari et al., 2007], hypermineralocorticoidism or apparent mineralocorticoid excess [Bouligand et al., 2010]. This syndrome can be revealed in a context of adrenal hyperplasia, either unilateral [Zhu et al., 2011], or bilateral [Bouligand et al., 2010; Nicolaidis et al., 2014], although the underlying mechanism remains unclear. All patients have hypercortisolism with increased 24 hr urinary free cortisol (UFC) excretion and inappropriate ACTH (normal or elevated but

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

†These authors contributed equally to this work.

*Correspondence to: Marc Lombès, Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris–Sud, 63, Rue Gabriel Péri, Le Kremlin Bicêtre Cedex F-94276, France. E-mail: marc.lombes@u-psud.fr

Contract grant sponsor: French Ministry of Health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique National) (PHRC-2011-N11-01); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm); Université Paris Sud; Agence Régionale de Santé Champagne Ardennes; French Endocrine Society (SFE)/Novartis Pharma.

not suppressed concentrations). Dexamethasone (DXM) suppression test failed to completely suppress plasma cortisol demonstrating the lack of the glucocorticoid feedback inhibition to suppress ACTH.

hGR is mainly expressed as two mRNA isoforms, hGR α and hGR β , generated by alternative splicing, the latter lacking ligand binding capacity and exerting dominant negative effect upon hGR α [Bamberger et al., 1995]. It has been reported a third, minor hGR γ isoform originating from tandem splice donor site, leading to a single arginine insertion between the two zing fingers of the DNA-binding domain (DBD) of the GR [Rivers et al., 2009; Thomas-Chollier et al., 2013]. hGR α is virtually expressed in all cell types, resides predominantly in the cytoplasm, and is sequestered in an heterooligomeric, multiprotein chaperon complex (hsp90, hsp70, immunophilins) through interaction with the H1 helix of GR LBD [Xu et al., 1998], thus preventing its degradation [Cheung and Smith, 2000]. Upon glucocorticoid binding, a critical GR conformational change occurs, notably leading to the repositioning of the H12 helix of the LBD and to the activation of the two nuclear localization sequences (NL1 and NL2), facilitating binding to importins and accelerating ligand-activated GR translocation into the nucleus [Wagstaff and Jans, 2009]. Several studies suggest that GR dissociation from the chaperon complexes does not precede nuclear translocation [Elbi et al., 2004]. Within the nuclear compartment, GR homo- or heterodimerizes and acts as a transcription factor through direct binding to specific DNA sequences, referred to as glucocorticoid response elements (GREs) located in the regulatory sequences of target genes, through two highly conserved zinc finger motifs present in the DBD of GR. GR may also modulate gene transcription by tethering to other transcription factors, independently of its direct DNA binding [Jonat et al., 1990]. The proximal P-box within the first zinc finger is responsible for specific GREs recognition, whereas the second zinc finger is implicated in the dimerization interface of the DBD. hGR α interacts with nuclear receptor coactivators through multiple amphipathic LXXLL motifs and chromatin-remodeling complexes, facilitates the preinitiation complex assembly of the RNA polymerase II, allowing transcription initiation. Most GR mutations impair one or several steps of GR signaling pathway.

Recently, the first heterozygous nonsense R469X mutation of GR was discovered in a family (eight affected individuals, spanning three generations) exhibiting subclinical hypercorticism associated with bilateral adrenal incidentalomas [Bouligand et al., 2010]. This prompted us to set up a National Clinical Research Program (PHRC) referred to as Muta-GR, which aims at determining the prevalence of GR mutations in patients with adrenal incidentalomas without Cushing's syndrome. During the course of this clinical research program in which approximately 100 patients were enrolled, we identified three novel heterozygous missense *NR3C1* mutations. We have carried out the in-depth characterization of these GR mutants to investigate the defective molecular events of GR signaling, responsible for the pathophysiological consequences in these patients.

Case Reports

All patients gave their written informed consent for clinical, hormonal and genetic analyses with approval from the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Ile de France, Hôpital Bicêtre, France).

Patient #1, 30-year-old woman, was referred to the Endocrinology Department for obesity. Patient #2, 51-year-old man, was hospitalized after a road accident. Abdominal computerized tomography (CT) disclosed a left adrenal mass. Patient #3 was a 60-year-old

man. Abdominal CT performed for abdominal pain revealed bilateral adrenal hyperplasia. All of them have primary generalized glucocorticoid resistance. The *hGR* gene sequencing discovered three original heterozygous missense mutations.

Material and Methods

Sequencing *hGR* Gene (*NR3C1*)

Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes and the entire coding exons and exon-intron junctions of the *NR3C1* gene were sequenced by Sanger method, as previously described [Bouligand et al., 2010] and compared with NCBI references (NG_016367.1 RefSeqGene, NM_000176.2 Transcript and NP_000167.1 Protein).

Site-Directed Mutagenesis

PcDNA₃hGR α (c.1429C>A, p.R477S), pcDNA₃hGR α (c.1433A>G, p.Y478C), or pcDNA₃hGR α (c.2015T>C, p.L672P) were obtained using the Quick Change Site directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolly, CA) with pcDNA₃hGR α (NM_000176.2) as a template.

Cell Culture

Embryonic human kidney HEK293T and African green monkey kidney COS-7 cells were grown in DMEM (Life Technologies, Saint-Aubin, France) with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France) and penicillin/streptomycin (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France), and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Transactivation Assays

HEK293T cells were transfected with wild-type (WT) or mutated GR expressing plasmids (0.04 μ g/well), reporter luciferase plasmid pMMTV-luc (0.04 μ g/well) and pMIR β gal encoding the β -galactosidase used as normalizing vector (0.035 μ g/well) using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Saint-Aubin, France). Six hours later, the transfection medium was replaced with steroid-free DMEM medium. Twenty hours after transfection, ethanol or increasing concentration of DXM (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M) was added into the medium. Luciferase and β -galactosidase activities were measured in cell lysates as previously described [Bouligand et al., 2010].

Western Blot Analysis

Twenty hours after transfection with the corresponding plasmids, HEK293T cells were lysed and protein extracts submitted to electrophoresis. After electroblotting onto C nitrocellulose membranes, and incubation with blocking solution, immunoblotting was performed overnight at 4°C, using rabbit polyclonal anti-hGR α antibody directed against the C-ter part of the protein (PA1-516, Thermo Fisher Scientific) at 1 μ g/ml or anti-hGR α antibody directed against the N-ter part of the protein (C15200010; Diagenode, Seraing, Belgium) with the loading control (β -actin; Sigma, St Quentin-Falavier, France). Membranes were incubated with secondary antibody (Pierce; Dyelight 680 or 800). Bands were visualized and quantified using Odyssey[®] Fc, Dual-Mode Western Imaging (Li-Cor, Lincoln, NE).

DXM Binding and Scatchard Plot Representation

In vitro translated WT and mutated GR were prepared using the reticulocyte lysate method with the TnT-T7 Quick Coupled Transcription/Translation kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). One microgram of the corresponding plasmids was incubated at 30°C for 90 min. Lysates were diluted fourfold in TEGW buffer (20 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol (v/v), 20 mM sodium tungstate pH 7.4) and incubated with increasing concentrations of [³H]-DXM (1,517 GBq/mmol; Perkin Elmer) for 4 hr at 4°C, in the presence or absence of 100-fold molar excess of unlabeled DXM. Bound and unbound DXM were separated using the dextran-charcoal method. Specific [³H]-DXM was determined as the difference between total and nonspecific binding, whereas the dissociation constant K_d was calculated as previously described [Amazit et al., 2015].

Immunocytochemistry and Fluorescence Deconvolution Microscopy

Transfected COS-7 cells were treated or not for 2 hr with 10⁻⁷ M DXM and processed for immunocytochemistry as previously described [Amazit et al., 2015]. Briefly, cells were fixed, permeabilized and incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-GR antibody (AbC10-G015; Eurobio, Courtaboeuf, France) followed by 30-min incubation with an anti-rabbit Alexa 555-coupled secondary antibody (Thermo Fisher Scientific). After 10 min post-fixation, nuclear counterstaining was performed with 0.5 μg/mL DAPI (4', 6'-diamidino-2-phenylindole) for 1 min. Chambers were mounted using ProLong Gold mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Fluorescence deconvolution microscopy was performed using Image Pro Plus AMS software (Media Cybernetics Inc., Marlow, UK) on a Mono Q Imaging Retiga 2000R Fast 1394 camera (Q Imaging Inc., Surrey, British Columbia, Canada). Images were acquired with an automated upright BX61 microscope (Olympus, Rungis, France) equipped with a X100 objective (1.4 NA). A z-series of focal planes was digitally imaged and deconvolved with the three-dimensional (3D) blind iterative algorithm (Image Pro Plus AMS) to generate high-resolution images.

Automated High-Throughput Microscopy

Sequential images were acquired (20×/0.4 NA), analyzed, and quantified by the ArrayScan VTI imaging platform (Thermo Fisher Scientific). DAPI and GR fluorescence were captured using sequential acquisition. The Molecular Translocation V4 Bioapplication algorithm (vHCS Scan, version 6.3.1, Build 6586) was used to quantify the relative distribution of immunodetected GR essentially as described in Amazit, et al. [2015] and Williams, et al. [2006]. The translocation index measurement represents the average value ratio of the nuclear intensity to the cytoplasmic intensity calculated for each selected cell per well.

Chromatin Immunoprecipitation

Transfected H293T cells were incubated with 10⁻⁷ M DXM or vehicle (ethanol) for 1 and 2 hr at 37°C. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde (ElectronMicroscopy Sciences, Saint-Germain-en-Laye, France) for 10 min at room temperature. Paraformaldehyde fixation was quenched with 0.125 M glycine for 8 min. Cells were washed once with ice-cold PBS. Cell lysis and chromatin shearing were performed with the HighCell# ChIP kit (Diagenode) buffers according to the manufacturer's recommendations and using 7 μg

of the GR antibody (SC 8992X; Santa Cruz Biotechnology, INC, Heidelberg, Germany), as previously described [Le Billan et al., 2015].

qPCR

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)-resulting DNA samples were amplified by real-time qPCR by using the QuantStudio6 Flex System (Life Technologies). Each cycle was composed of 15 sec denaturation phase at 95°C, followed by 1 min hybridization and amplification phase at 60°C. Each DNA sample was analyzed in triplicate. All results are expressed as a percentage of input (Percent Input Method, ChIP analysis; Life Technologies) and expressed as means ± SEM of three independent experiments.

3D Molecular Modeling

The R477S, Y478C, and L672P mutations were introduced within the hGR DBD and LBD (Protein data bank identification 3FYL [DBD], and 1M2Z [LBD]) using the Pymol software (www.rcsb.org/pdb). For each residue, the orientation of the side chain was adjusted by using the rotamer function.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Prism 6 software (GraphPad software Inc.). Statistical significance was calculated using Mann–Whitney non-parametric *U*-tests. A value of *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Generalized Glucocorticoid Resistance in Three Independent Patients Associated with Novel Heterozygous GR Mutations

All clinical and biological parameters of three affected individuals are summarized in Figure 1A. All patients had no obvious clinical sign of Cushing's syndrome. Patient #1 was obese, whereas patients #2 and #3 were slightly overweight. They had neither hypertension nor hypokalemia. Patient #1 had no hirsutism with normal androgen concentrations. They all had a biological hypercortisolism (1.5 to 2.5-fold increased 24 hr UFC, 8 am cortisol concentration > 50 nmol/l after overnight 1 mg DXM suppression test). 8 am plasma ACTH concentrations remained normal. CT revealed normal adrenal gland for the patient #1, a left adrenal incidentaloma for patient #2, and a bilateral adrenal hyperplasia for patient #3.

Patient #1 harbored a novel heterozygous missense mutation (c.1429C>A) that resulted in arginine (R) to serine (S) substitution at amino-acid position 477 (p.R477S). Her mother, presenting with an obese phenotype, android fat distribution and facial erythrosis, carried the same heterozygous mutation. *NR3C1* sequencing of patient #2 revealed a heterozygous missense GR mutation (c.1433A > G) in the fourth exon of *NR3C1* gene, substituting a tyrosine (Y) by a cysteine (C) at amino acid 478 (p.Y478C). His daughter harbored the same mutation. As shown in Figure 1B, these two original mutations are located in the DBD, at the C-terminal end of the second zinc finger. Patient #3 had a heterozygous non-synonymous mutation in the seventh exon of *NR3C1*, introducing a change from thymidine to cytosine (c.2015T > C) which resulted in leucine (L) to proline (P) substitution at amino-acid position 672, located in

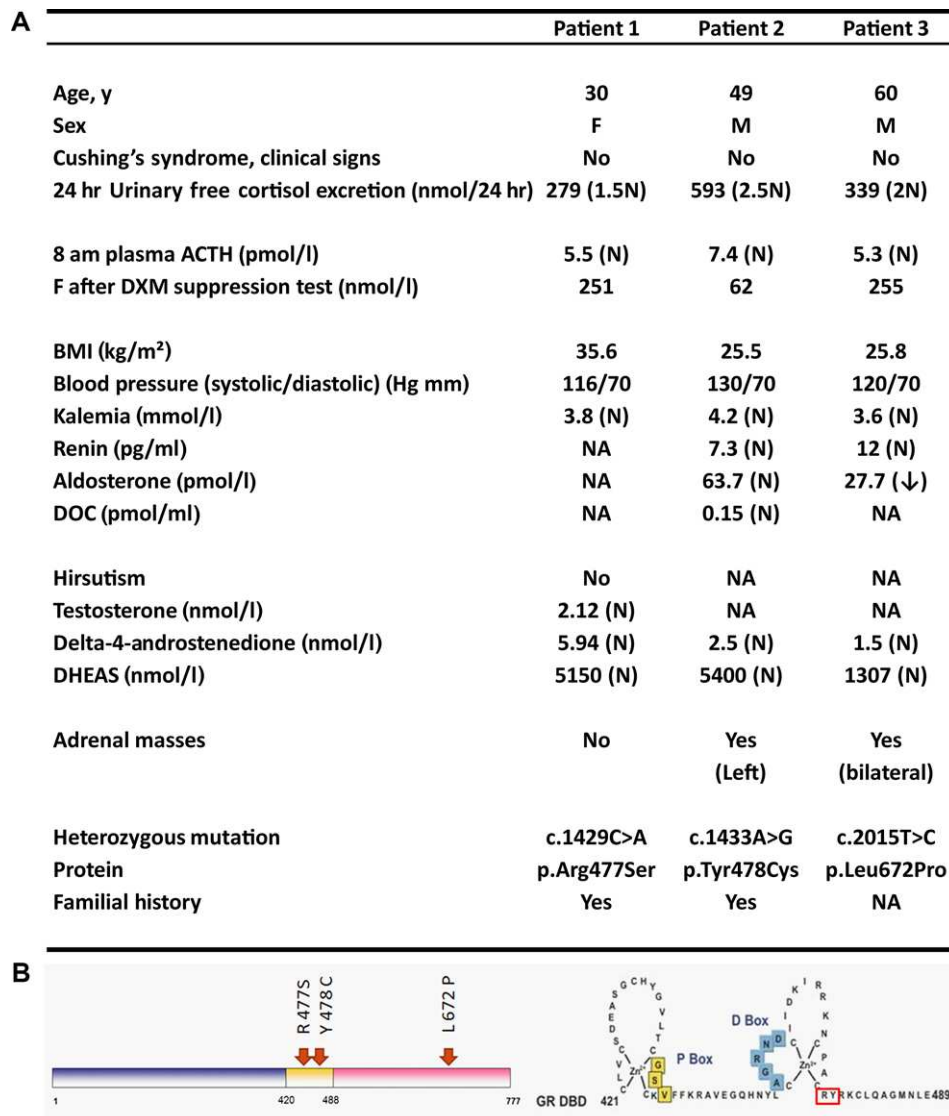


Figure 1. Clinical characteristics and hormonal parameters of the three affected patients. Identification and localization of novel heterozygous *NR3C1* mutations. **A:** Clinical and biochemical parameters of the three affected patients. *N* means that values are in the normal range; NA, data non-available; DOC, 11-deoxycorticosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate. **B:** Localization of R477S, Y478C, L672P mutations on GR protein (left panel). R477 and Y478 residues are located in the DBD, just after the second zinc finger in the DNA-binding domain (right panel). L672 residue is located in the ligand-binding domain of hGR α .

the LBD (p.L672P). These three novel *NR3C1* variants have been submitted to the LOVD database (<http://www.lovd.nl/NR3C1>).

The Functional Properties of GR Mutants

Western blot analyses demonstrated that all mutated GR proteins were fully expressed in HEK293T cells after transient transfection of corresponding plasmids (Fig. 2A), using an antibody targeting C-terminal part of hGR α . Endogenous GR protein level was hardly detected in untransfected HEK293T cells. After transfection, protein levels of overexpressed GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} mutants were very similar (Fig. 2B). In contrast, the ~100 kDa band of GR_{L672P} mutant was weak compared with controls while a second ~70 kDa band was detected. This band was not found with an antibody directed against N-terminal part of GR (Fig. 2C), suggesting a N-terminal truncated form of hGR α as recently proposed for GR

cleavage by encoding caspase 1 responsible for glucocorticoid resistance in leukemia cells [Paugh et al., 2015]. Similarly, this ~70 kDa band was not observed when GR_{L672P} mutant was expressed in the reticulocyte lysate (Fig. 2C, lower panels). DXM binding assays on GR expressed in the reticulocyte lysate revealed no difference in the maximum specific binding between GR_{WT} (451 pM) and GR_{R477S} (318 pM), or GR_{Y478C} (308 pM) (Fig. 2D). At the opposite, GR_{L672P} was unable to bind DXM. Scatchard representation of DXM binding shown in Figure 2E revealed that the affinity of GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} for DXM were in the same range with a dissociation constant K_d calculated at 1.9, 4.6, and 2.3 nM, respectively.

Subcellular Localization of GR Mutants

Nuclear translocation is one of the critical steps that convert GR into its transcriptionally active state. We thus investigated

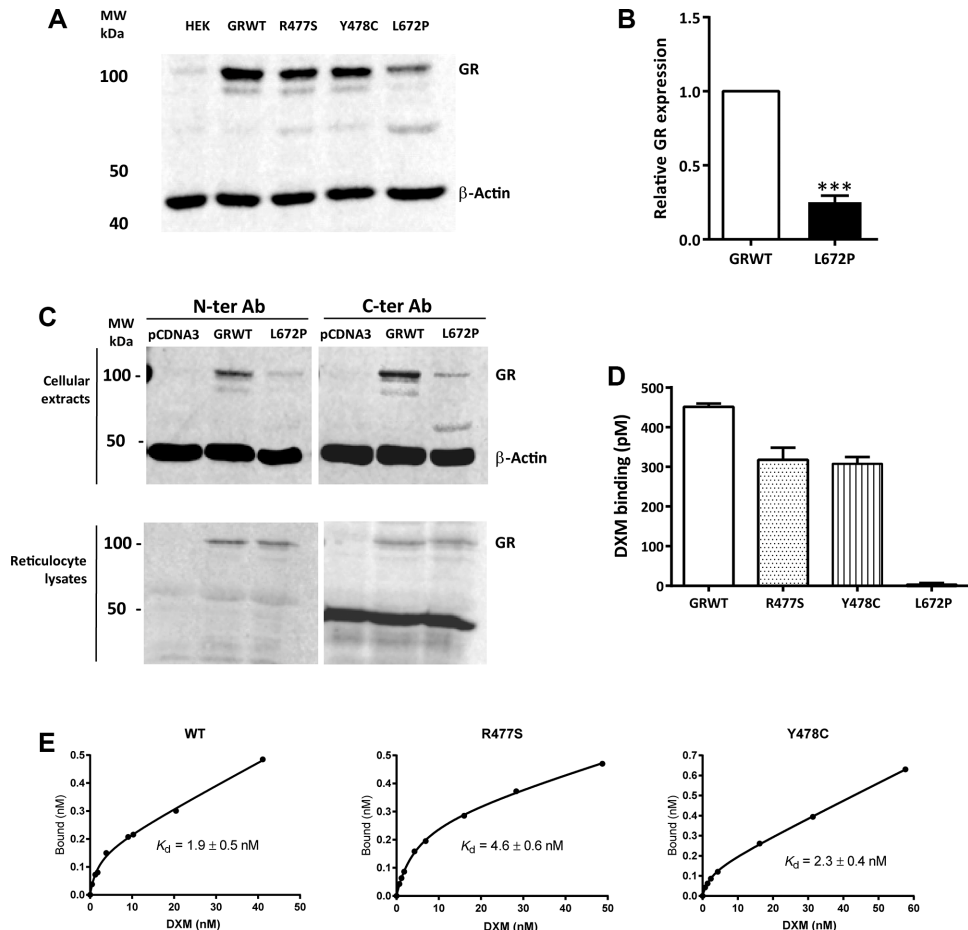


Figure 2. Protein expression and DXM Binding of mutated GR. **A:** H293T cells were transiently transfected with 0.4 μ g plasmid encoding GR_{WT}, GR_{R477S}, GR_{Y478C}, and GR_{L672P}. Transfected cells were lysed, and protein extracts analyzed by SDS-PAGE. hGR proteins were detected by Western blot analyses using a rabbit polyclonal antibody targeting hGR α C-terminal part. β -Actin was used as a loading control. Representative images of five independent experiments are shown. **B:** Quantification of GR_{WT} and GR_{L672P} protein levels. Specific bands were quantified by Odyssey[®] Fc, Dual-Mode Western Imaging. Results normalized to β -actin loading controls are mean \pm SEM of three independent experiments. **C:** Comparison of GR_{WT} and GR_{L672P} protein detection with either a N-ter Anti-GR antibody (left panel) or a C-ter anti-GR antibody (right panel). Beside the 100 kDa band of GR_{L672P}, note the presence of a 70 kDa band. A non-parametric Mann–Whitney *U* test was used to compare GR protein level. *** $P < 0.001$ versus GR_{WT}. **D:** DXM binding at saturation. One microgram of plasmids encoding GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} mutants were incubated for 90 min in the reticulocyte lysate. Lysates were diluted fourfold in TEGW buffer (20 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, 20 mM sodium tungstate, and 10% glycerol (v/v), pH 7.4) and incubated with 10^{-7} M ³H-DXM in the absence or presence of a 100-fold excess of unlabeled DXM. Specific binding was calculated as the difference between total binding and nonspecific binding. Data are means \pm SD of three independent determinations and are expressed in pM. DXM binding was not different for GR_{WT}, GR_{R477S}, GR_{Y478C}, while GR_{L672P} was not able to bind DXM ($P < 0.001$). **E:** Scatchard analysis of DXM binding in GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} expressed lysates. DXM binding was expressed as a function of total DXM concentrations and the corresponding dissociation constant value (K_d) calculated. The apparent K_d of GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} for DXM was not statistically different.

the subcellular localization of GR mutants using immunofluorescence and high-throughput microscopy quantification. As expected, unliganded GR_{WT} and all mutants were mainly localized in the cytoplasmic compartment while, upon 2 hr exposure to 10^{-7} M DXM, GR_{WT} was entirely located into the nucleus (Fig. 3A) with a nucleo-cytoplasmic index (see *Materials and Methods* section) measured at ~ 3 (Fig. 3B). In contrast, GR_{R477S} and GR_{Y478C} mutants were incompletely translocated into the nucleus with a lower nucleo-cytoplasmic ratio of 2.67 and 2.40, respectively ($P < 10^{-5}$) (Fig. 3B). Finally, GR_{L672P} mutant remains exclusively cytoplasmic upon DXM exposure (Fig. 3A), consistent with its inability to bind ligand. Collectively, these results indicate that R477S and Y478C mutations impair the ligand-induced GR nuclear translocation.

DNA Binding and Transcriptional Activity of GR Mutants

We next evaluated the ability of GR mutants to interact with DNA by CHIP experiments. As illustrated in Figure 4A, 1 hr DXM exposure leads a ninefold increase in the recruitment of GR_{WT} onto the regulatory genomic sequence of *FKBP5*, a well-known glucocorticoid target gene [U et al., 2004]. Interestingly, GR_{WT} recruitment was only enhanced by a threefold factor after 2 hr DXM exposure, consistent with the dynamic and cyclic assembly of nuclear receptors within the preinitiation complexes, already described [Metivier et al., 2003]. In sharp contrast, GR_{R477S} mutant was unable to bind DNA whatever the experimental conditions used. Likewise, no significant GR_{Y478C} mutant enrichment was observed after 1 hr DXM treatment, whereas it became slightly (1.6-fold)

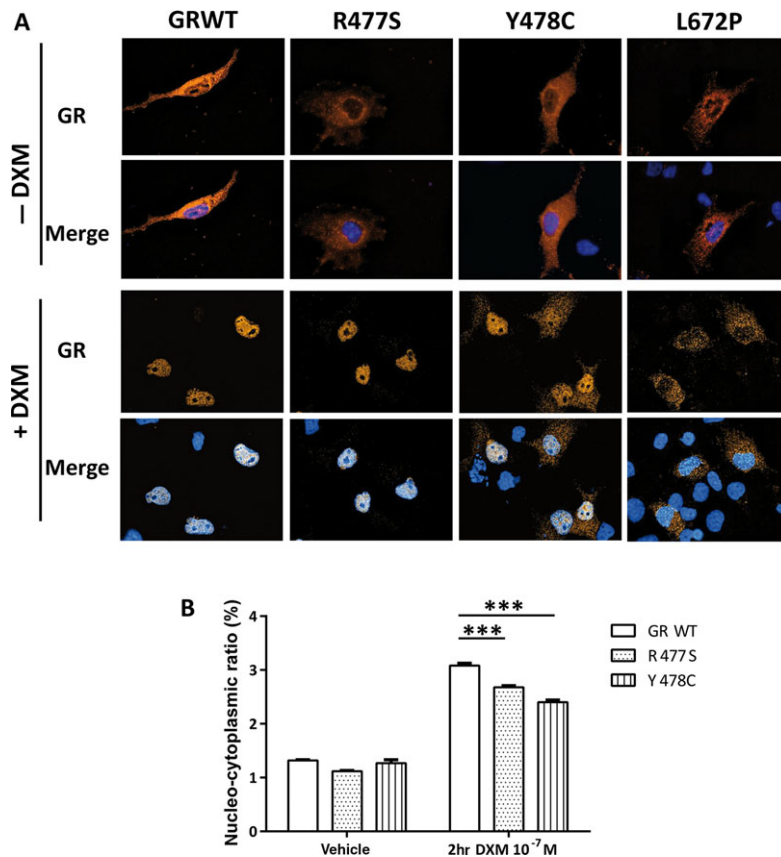


Figure 3. Impaired nuclear translocation of GR mutants. COS-7 cells were transfected with the indicated expression vector and incubated or not for 2 hr with 10^{-7} M DXM. Cells were fixed and processed for immunocytochemistry as described in the *Materials and Methods* section. **A:** Representative images of the subcellular localization of GR_{WT}, GR_{R477S}, GR_{Y478C}, and GR_{L672P} in the absence or presence of DXM. A z-series of focal planes was digitally imaged and deconvolved using Image Pro Plus AMS iterative algorithm to generate high-resolution images. DAPI staining delineates the nuclei (blue). **B:** Automated high-throughput microscopy quantification of the molecular translocation of GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} mutants. Cells were treated as described in (A) and fluorescence acquisition was performed with the ArrayScan VTI fluorescent microscope (see the *Materials and Methods* section). The translocation index (nucleo-cytoplasmic ratio) represents the average ratio of the nuclear fluorescence intensity to the cytoplasmic fluorescence intensity calculated for each transfected cell ($n > 1000$). A non-parametric Mann-Whitney *U* test was used to compare GR subcellular distribution. *** $P < 0.001$ versus GR_{WT}.

significant ($P < 0.05$) after 2 hr DXM stimulation, in agreement with the reduced ligand-dependent nuclear translocation of the GR_{Y478C}, demonstrated above (see Fig. 3B). Finally, we demonstrated that GR_{WT} transactivated mouse mammary tumor virus (MMTV)-Luc reporter gene, in a dose-dependent manner (10^{-10} to 10^{-6} M DXM), the maximum transactivation activity being achieved with 10^{-8} M DXM and an half maximal effective concentration (EC₅₀) value calculated at 5.46×10^{-10} M (Fig. 4B). As anticipated, GR_{R477S} mutant that lacks DNA binding capacity, and GR_{L672P} mutant unable to bind DXM, had no transactivation property. Consistent with the previous ChIP experiments, GR_{Y478C} mutant displayed a significant decreased ability to transactivate MMTV-Luc with an EC₅₀ being 20-fold higher than GR_{WT} EC₅₀ (9.95×10^{-9} M vs. 5.46×10^{-10} M, $P = 0.0025$). None of the three mutants exerted dominant negative effect on GR_{WT} activity (Supp. Fig. S1).

3D Molecular Modeling

Arg477 and Tyr478 are located after the second zinc finger of the DBD (Fig. 5A). As shown in Fig. 5B, Arg477 established two essential hydrogen bonds with DNA, which are totally lost with the Arg to Ser substitution (Fig. 5C). The Tyr478 forms numerous van der

Waals contacts and a hydrogen bond with the surrounding residues of the DBD (Phe445, Ala448, Val449, Leu482, and His453) creating a stabilizing network of contacts (Fig. 5A and D). Replacement of a Tyr478 by a Cys led to a loss of contacts, which consequently destabilized the 3D structure of the DBD (Fig. 5E). Leu672 is located in the H8 helix of the LBD of GR, into the hydrophobic core of the ligand-binding pocket (Fig. 5F and G). Leu672 established two stabilizing hydrogen bonds with the H8 helix, which were lost with the Pro substitution (Fig. 5H), thus conferring major conformational changes of the upper part of the LBD and an overall unstructured ligand-binding pocket.

Discussion

We have identified three novel missense heterozygous *NR3C1* mutations and characterized in details the functional consequences on hGR α signaling (summarized in Table 1).

Clinical and biological presentations of the mutated patients bring new information on how heterozygous *NR3C1* mutations associated with decreased GR signal transduction may affect normal physiology. Among 20 hGR α mutations described to date including ours, five had been discovered in a context of adrenal hyperplasia. Patients

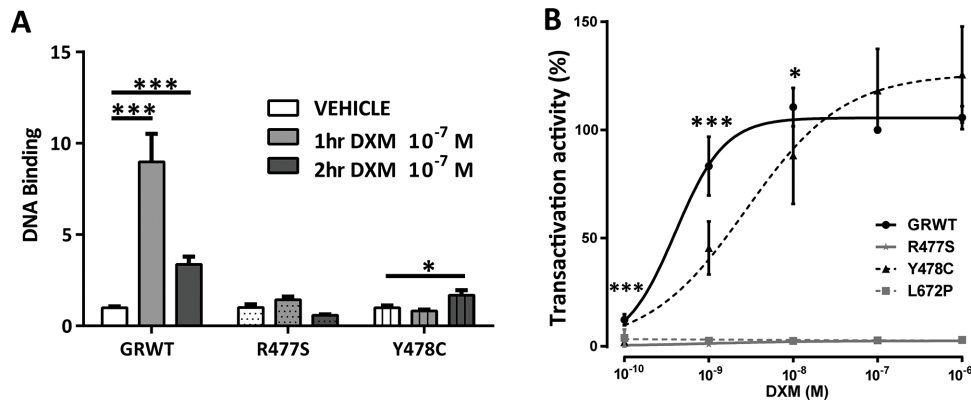


Figure 4. DNA Binding and transactivation assays of GR mutants. **A:** HEK293T cells were transiently transfected with GR_{WT}, GR_{R477S}, and GR_{Y478C} encoding plasmids and treated for 1 or 2 hr with DXM (10⁻⁷ M) or vehicle (ethanol). Cells were fixed, lysed, and chromatin immunoprecipitation was performed using an anti-GR antibody (see the *Materials and Methods* section). After elution, DNA was quantified by quantitative real time PCR, using primers for the genomic fragment encompassing GRE in the promoter region of the *FKBP5* GR target gene. Data expressed as fold induction compared with vehicle, arbitrarily set at 1, are means ± SEM of four independent experiments. Statistical significance was calculated with the Mann–Whitney non-parametric *U* tests. **B:** HEK 293T cells were co-transfected with plasmids encoding GR_{WT}, GR_{R477S}, GR_{Y478C}, and GR_{L672P}, a reporter luciferase plasmid pMMTV-luc and pMIRβ gal. Cells were treated 24 hr with increasing concentration of DXM (10⁻¹⁰ to 10⁻⁶ M). Transactivation activity is expressed relatively to the maximum transactivational activity obtained for GR_{WT} with 10⁻⁷ M DXM, arbitrarily set at 100%. Data are means ± SEM of at least six independent experiments performed in sextuplet. Statistical significance was calculated with the Mann–Whitney non-parametric *U* tests. ****P* < 0.001, **P* < 0.05.

Table 1. Functional Characteristics of the Three Novel NR3C1 Mutations

NR3C1 mutations transcript, protein	Clinical signs	Protein expression	DXM Binding	Cytoplasm-to-nuclear translocation	DNA Binding	Dominant negative effect	Transactivation	3D molecular modeling
c.1429C>A p.R477S	Obesity	Normal	Normal	Decreased	No	No	No	Loss of contacts with DNA
c.1433A>G p.Y478C	Left adrenal mass	Normal	Normal	Decreased	Weak and delayed	No	Decreased	Destabilization of the 3D DBD structure
c.2015T>C p.L672P	Bilateral adrenal hyperplasia	Decreased	No	No	No	No	No	Unstructured H8 helix

According to the NR3C1 accession number: Transcript NM_000176.2, Protein NP_000167.1.

with Y478C and L672P mutations presented with adrenal incidentalomas. We wonder whether and how GR signaling defect could affect adrenocortical cell proliferation or sensitivity to ACTH. Several lines of evidence suggest the involvement of HPA dysregulation in the pathogenesis of adrenal hyperplasia. Heterozygous GR^{+/-} knockout mice displayed adrenal gland hyperplasia and increased HPA sensitivity [Michailidou et al., 2008], in accordance with the positive regulatory loop exerted by GR on human adrenocortical H295R cell function [Asser et al., 2014]. Moreover, ectopic expression of the *pro-opio-melanocortin* (*POMC*) gene by steroidogenic cells was shown to be responsible for intra-adrenal ACTH overexpression and subsequently adrenal hyperplasia [Lefebvre et al., 2003]. ACTH concentrations in the macronodular adrenal hyperplastic tumors were 1,000-fold higher than in plasma. Accordingly, it suggested that in patients with bilateral macronodular adrenal hyperplasia, cortisol production were controlled by both aberrant membrane receptors and corticotropin, produced within the adrenocortical tissue [Louiset et al., 2013]. Patients with bilateral incidentalomas had higher ACTH and cortisol responses to the combined DXM-CRH test compared with both controls and patients with unilateral adrenal incidentaloma [Vassiliadi et al., 2015]. Altogether, our present findings and previous reports provide additional support for

an altered ACTH-GR relationship that requires further studies to explore the pathophysiologic role of GR mutations in adrenocortical function. On the other hand, the high body mass index (BMI) of the patients strongly suggest that hypercorticism, in spite of GR signaling defect, could impair adipocyte physiology and metabolic homeostasis. This obviously requires additional investigation.

Although GR_{R477S} mutant had similar affinity for DXM than GR_{WT}, this mutant exhibited a decrease in DXM-induced nuclear translocation and was unable to bind the regulatory sequence of *FKBP5*, in accordance with 3D molecular modeling and the loss of stabilizing hydrogen bonds between the Ser477 and DNA. Finally, as expected, this GR_{R477S} mutant had no transcriptional activity. A previous study showed that an Arg to His substitution at residue 477 impaired hGR functionality, owing to the lack of DNA binding [Charmandari et al., 2006]. Mutant R477H was not able to transactivate MMTV-GRE reporter gene, in accordance with the results obtained for GR_{R477S}. Moreover, another mutant R493C in mouse GR [Banuelos et al., 2015], which corresponds to a R477C mutation in hGR, had no transcriptional activity, whereas an Arg to Lys replacement at position 493 did not affect GR function. Lysine lateral chain, holder of a positive electric charge, can restore DBD–DNA interaction, and therefore the transactivation ability. Taken together,

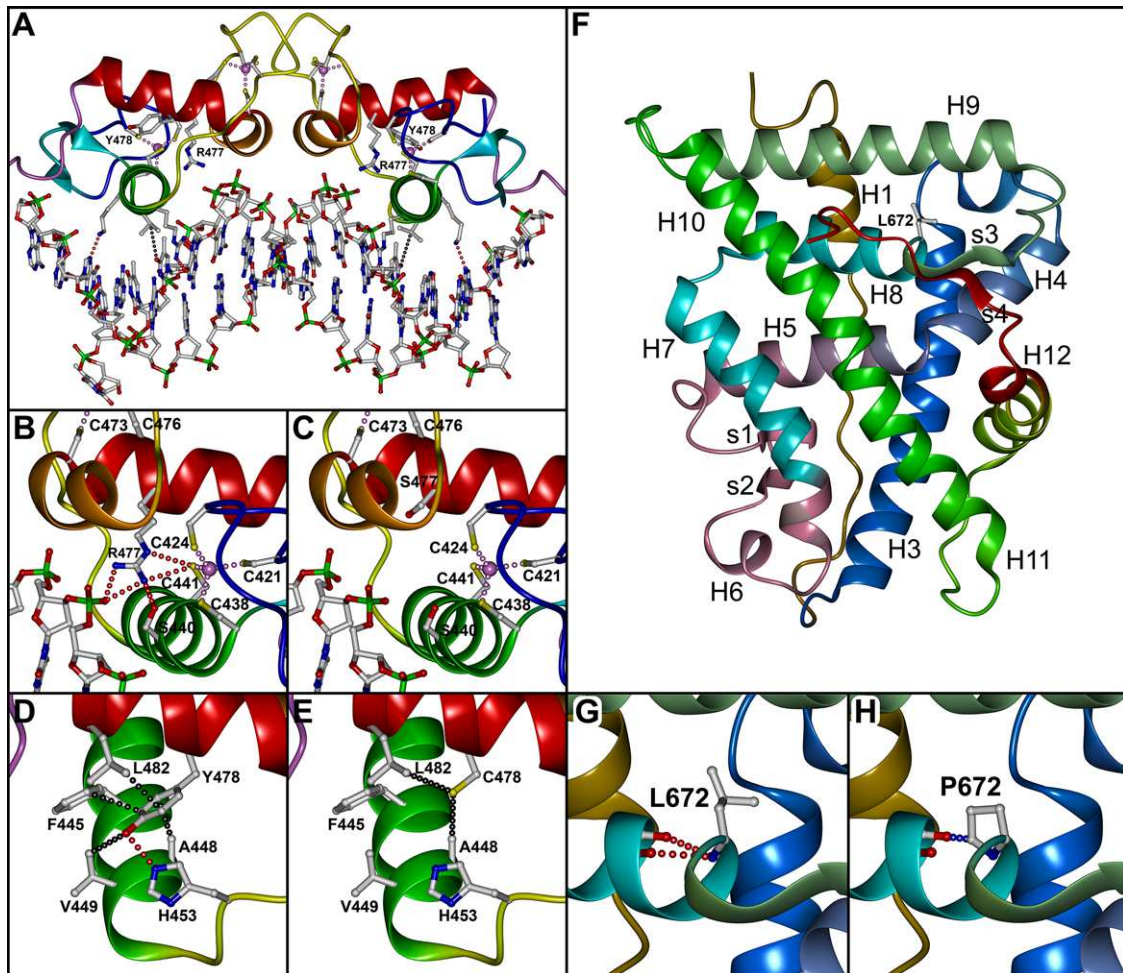


Figure 5. Three-dimensional models of the hGR LBD and DBD harboring the R477S, Y478C, and L672P point mutations. **A:** Overall view of a dimer of hGR DBD bound to an oligonucleotide (Protein data bank identification 3FYL). From the N to the C-terminus of the domain, the secondary structure elements are represented as ribbons with a blue-green-red color gradient. Are only showed residues involved in DNA recognition, in the zinc fingers and those for which a mutation was identified in this study. Close up views are provided showing the R477S (**B** and **C**) and Y478C (**D** and **E**) substitutions together with the surrounding residues. Red, light purple, and black dashed lines indicate hydrogen bonds, zinc coordination, and van der Waals contacts, respectively. **F:** Overall view of the hGR LBD (Protein data bank identification 1M2Z). Only Leu 692 is showed. Close up views showing the L692P (**G** and **H**) substitutions. Red and blue dashed lines indicate hydrogen bonds and unfavorable contacts, respectively. The figures were generated using the Pymol software.

these findings clearly demonstrate the major role of Arg477 for GR functionality.

Of interest, the two DBD GR_{R477S} and GR_{Y478C} mutants exhibited a decrease in nuclear translocation compared with GR_{WT} . All DBD mutants described to date exhibited defect in nuclear translocation. The truncated GR_{R469X} [Bouligand et al., 2010], lacking the LBD, remains in the cytoplasm compartment, while GR_{R477H} (Ruiz et al., 2001) had 2.1-fold delay in nuclear translocation. The R477S and Y478C mutations were located in the nuclear localization sequence 1 (NL1) in hGR α structure, as defined by Picard and Yamamoto [1987] and Savory, et al. [1999]. Thus, NL1 integrity seems to be absolutely required for appropriate cytoplasm-to-nuclear translocation. Indeed, Savory et al. [1999] reported in a rat GR lacking NL1 (rGRNL1-), that mutated receptor remained into the cytoplasm compartment after DXM treatment. R477S and Y478C mutations could modify NL1 structure and/or activity and thus reduce DXM-induced nuclear translocation.

An alternative hypothesis is the overexposure of the nuclear export signal (NES) that may be induced by DBD destabilization. Black

et al. [2001] have shown that Phe444 and 445 were two essential amino acids for the nuclear-to-cytoplasm GR export. 3D molecular modeling of GR_{Y478C} , demonstrated a loss in Van der Waals bond between Tyr478 and Phe445. Overexposed NES in this mutant could thus lead to an unbalanced DXM-induced GR trafficking towards the cytoplasm compartment localization. The two original DBD mutations underlined the absolute requirement of intact DBD for ligand-induced cyto-nuclear translocation.

On the other hand, GR_{L672P} mutant lost its ability to bind glucocorticoids, owing to the loss of stabilizing hydrogen bonds between Leu672 and H8 helix of the LBD. Leu to Pro substitution at residue 672 profoundly alters the folding of H8 helix, leading to an unstructured LBD. Although Leu672 does not contribute directly to the non-covalent interaction with the ligand, the loss of DXM binding in this mutant GR is the consequence of the overall destabilization of the LBD. Such destabilizing effects have already been described for the mineralocorticoid receptor (MR; *NR3C2*). The destruction of the beta sheet between the strand s3 at the C-ter of H8 and the strand s4 at the C-ter of the domain (the beta strands 3 and 4 of the

LBD) by the substitution of a proline for a leucine in the strand s4 is responsible for a complete loss of function of the receptor resulting in a syndrome of pseudohypoaldosteronism [Sartorato et al., 2004]. Moreover, L672P protein expression in HEK293T transfected cells was much lower than that of GR_{WT} and other mutated GR, probably due to a higher degradation propensity. The ~70 kDa band observed for GR_{L672P} mutant did not correspond to any hGR α A, B, C, D isoforms, previously reported by Cidlowski's group [Duma et al., 2006] but is likely related to degradation product that remains to be further identified. Our experiments suggested the essential role of the H8 helix for DXM binding. Deng et al. [2015], had introduced several mutations on the leucine repeated amino-acids 687 to 690, in the rat GR, corresponding to L672P mutation in hGR α H8 helix. Mutant L687-690A lost its transcriptional activity by impaired ligand binding and had a decreased association to heat shock protein 90 (Hsp90). Moreover, Xu et al. [1998] demonstrated that the loss of Hsp binding were responsible for a decreased steroid binding activity. In hGR_{WT}, Hsp interacts with amino acids located in LBD H1 helix, spatially very close from H8 helix. Disrupted LBD folding by Leu to Pro substitution in H8 helix could account for altered DXM binding and the lack of Hsp interaction, responsible for higher degradation propensity of GR_{L672P}. This remains to be experimentally validated.

In conclusion, we showed the essential role of the Arg477 in the GR functionality for DNA binding, the central role of the H8 helix in the DXM binding and the necessary integrity of DBD in cytoplasm-to-nuclear translocation. We identified three original GR mutations in the context of glucocorticoid resistance and believe that the prevalence of GR mutations is probably much more frequent than initially thought among patients with subclinical hypercorticism.

Abbreviations

3D, three-dimensional; ACTH, corticotropin hormone; BMI, body mass index; CHIP, chromatin immunoprecipitation; COS-7, embryonic African green monkey kidney cells; CRH, corticotropin releasing hormone; CT, computerized tomography; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DBD, DNA-binding domain; DXM, dexamethasone; EC50, half maximal effective concentration; GR, glucocorticoid receptor; GRE, glucocorticoid response element; HEK, embryonic human kidney; hGR, human GR; HPA, hypothalamic—pituitary—adrenal axis; Hsp, heat shock protein; LBD, ligand-binding domain; MMTV, mouse mammary tumor virus; MER, mineralocorticoid receptor; NES, nuclear export signal; NL, nuclear localization sequence; PHRC, National Clinical Research Program; UFC, urinary free cortisol; WT, wild-type

Author Contributions

B.D., S.T., and M.L. contributed to the study concept and design; B.D. and F.C. referred the patients; G.V., J.F., F.L.B., L.A., N.R., B.D., F.C., J.B., A.G.M., S.T., and M.L. performed the analysis and contributed to the interpretation of data; G.V., S.T., and M.L. contributed to the drafting of the manuscript and shared responsibility for the decision to submit for publication. All the authors revised the manuscript critically for important intellectual content, and also read and approved the final version submitted for publication. S.T. and M.L. were responsible for study supervision.

Acknowledgments

The authors would like to thank the associate investigators of the PHRC MUTA-GR program, notably Pr. F. Borson-Chazot (HCL, Lyon, France); Pr. P. Bouchard and Pr. S. Christin-Maitre (APHP, CHU St Antoine, Paris,

France); Pr. T. Brue (AP-HM, CHU La Timone, Marseille, France); Pr. P. Caron (CHU Larrey, Toulouse, France); Pr. O. Chabre (CHU Grenoble, France); Pr. R. Dessailoud (CHU Amiens, France); Pr. B. Estour (CHU Saint-Etienne, France); Dr. F. Illouz (CHU Angers, France); Pr. N. Jeandidier (CHU Strasbourg, France); Pr. V. Kerlan (CHU Brest, France); Pr. M. Klein (CHU Nancy, France); Pr. P. Lecomte (CHU Tours, France); Pr. H. Lefebvre (CHU Rouen, France); Pr. A. Penfornis (CHU Besançon, France); Pr. I. Tauveron (CHU ST Etienne, France); Pr. P. Touraine (AP-HP, CHU Pitié-Salpêtrière, Paris France); Pr. J. Young (CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France); Pr. C. Hoeffel (CHU Robert Debré, Reims, France); Pr. A. Tabarin (CHU Bordeaux, Pessac, France); Dr. F. Amiôt (CH Troyes, France); and Dr. D. Ancelle (CH St Lô, France). The authors are also indebted to Edith Kassa (URC, Hôpital Robert Debré Reims, France) for her help in coordinating this clinical investigation program.

Disclosure statement: The authors declare no conflict of interest.

References

- Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, Lamribet K, Viengchareun S, Fay MR, Khan JA, Hillisch A, Lombres M, Rafestin-Oblin ME, Fagart J. 2015. Finerenone impedes aldosterone-dependent nuclear import of the mineralocorticoid receptor and prevents genomic recruitment of steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem* 290(36):21876–21889.
- Asser L, Hescot S, Viengchareun S, Delemer B, Trabado S, Lombres M. 2014. Autocrine positive regulatory feedback of glucocorticoid secretion: glucocorticoid receptor directly impacts H295R human adrenocortical cell function. *Mol Cell Endocrinol* 395(1–2):1–9.
- Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. 1995. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95(6):2435–2441.
- Banuelos J, Shin SC, Lu NZ. 2015. A hotspot in the glucocorticoid receptor DNA-binding domain susceptible to loss of function mutation. *Steroids* 96:115–120.
- Black BE, Holaska JM, Rastinejad F, Paschal BM. 2001. DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals. *Curr Biol* 11(22):1749–1758.
- Bouligand J, Delemer B, Hecart AC, Meduri G, Viengchareun S, Amazit L, Trabado S, Feve B, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M, et al. 2010. Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PLoS One* 5(10):e13563.
- Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Chrousos GP. 2008. Generalized glucocorticoid resistance: clinical aspects, molecular mechanisms, and implications of a rare genetic disorder. *J Clin Endocrinol Metab* 93(5):1563–1572.
- Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Jubiz W, Mejia L, Zachman K, Chrousos GP. 2007. A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 92(10):3986–3990.
- Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Zachman K, Alatsatianos A, Chrousos GP. 2006. Functional characterization of the natural human glucocorticoid receptor (hGR) mutants hGRalphaR477H and hGRalphaG679S associated with generalized glucocorticoid resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 91(4):1535–1543.
- Cheung J, Smith DF. 2000. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol* 14(7):939–946.
- Deng Q, Waxse B, Riquelme D, Zhang J, Aguilera G. 2015. Helix 8 of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor (GR) is essential for ligand binding. *Mol Cell Endocrinol* 408:23–32.
- Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. 2006. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1–5):11–21.
- Elbi C, Walker DA, Romero G, Sullivan WP, Toft DO, Hager GL, DeFranco DB. 2004. Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):2876–2881.
- Gross KL, Cidlowski JA. 2008. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab* 19(9):331–339.
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. 1990. Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62(6):1189–1204.
- Le Billan F, Khan JA, Lamribet K, Viengchareun S, Bouligand J, Fagart J, Lombres M. 2015. Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J* 29(9):3977–3989.
- Lefebvre H, Duparc C, Chartrel N, Jegou S, Pellerin A, Laquerriere A, Ivell R, Vaudry H, Kuhn JM. 2003. Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88(7):3035–3042.

- Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Libe R, Bram Z, Groussin L, Caron P, Tabarin A, Grunenberger F, et al. 2013. Intra-adrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 369(22):2115–2125.
- Mendonca BB, Leite MV, de Castro M, Kino T, Elias LL, Bachega TA, Arnholt JJ, Chrousos GP, Latronico AC. 2002. Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4):1805–1809.
- Metivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. 2003. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115(6):751–763.
- Michailidou Z, Carter RN, Marshall E, Sutherland HG, Brownstein DG, Owen E, Cockett K, Kelly V, Ramage L, Al-Dujaili EA, et al. 2008. Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet. *FASEB J* 22(11):3896–3907.
- Nicolaides NC, Geer EB, Vlachakis D, Roberts ML, Psarra AM, Moutsatsou P, Sertedaki A, Kossida S, Charmandari E. 2015. A novel mutation of the hGR gene causing Chrousos syndrome. *Eur J Clin Invest* 45(8):782–791.
- Nicolaides NC, Roberts ML, Kino T, Braatvedt G, Hurt DE, Katsantoni E, Sertedaki A, Chrousos GP, Charmandari E. 2014. A novel point mutation of the human glucocorticoid receptor gene causes primary generalized glucocorticoid resistance through impaired interaction with the LXXLL motif of the p160 coactivators: dissociation of the transactivating and transrepressive activities. *J Clin Endocrinol Metab* 99(5):E902–E907.
- Paugh SW, Bonten EJ, Savic D, Ramsey LB, Thierfelder WE, Gurung P, Malireddi RK, Actis M, Mayasundari A, Min J, Coss DR, Laudermilk LT, et al. 2015. NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. *Nat Genet* 47(6):607–614.
- Picard D, Yamamoto KR. 1987. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J* 6(11):3333–3340.
- Rivers C, Flynn A, Qian X, Matthews L, Lightman S, Ray D, Norman M. 2009. Characterization of conserved tandem donor sites and intronic motifs required for alternative splicing in corticosteroid receptor genes. *Endocrinology* 150(11):4958–4967.
- Ruiz M, Lind U, Gåfväls M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stierna P, Wikström AC, Werner S. 2001. Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endo (Oxf)* 55(3):636–671.
- Sartorato P, Cluzeaud F, Fagart J, Viengchareun S, Lombes M, Zennaro MC. 2004. New naturally occurring missense mutations of the human mineralocorticoid receptor disclose important residues involved in dynamic interactions with deoxyribonucleic acid, intracellular trafficking, and ligand binding. *Mol Endocrinol* 18(9):2151–2165.
- Savory JG, Hsu B, Laquian IR, Giffin W, Reich T, Hache RJ, Lefebvre YA. 1999. Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 19(2):1025–1037.
- Thomas-Chollier M, Watson LC, Cooper SB, Pufall MA, Liu JS, Borzym K, Vingrom M, Yamamoto KR, Meijnsing SH. 2013. A naturally occurring insertion of a single amino acid rewires transcriptional regulation by glucocorticoid receptor isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(44):17826–17831.
- Treble P, Matthews L, Blaikley J, Wayte AW, Black GC, Wilton A, Ray DW. 2010. Familial glucocorticoid resistance caused by a novel frameshift glucocorticoid receptor mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 95(12):E490–E499.
- U M, Shen L, Oshida T, Miyauchi J, Yamada M, Miyashita T. 2004. Identification of novel direct transcriptional targets of glucocorticoid receptor. *Leukemia* 18(11):1850–1856.
- Vassiliadi DA, Tzanela M, Tsalidis V, Margelou E, Tampourlou M, Mazarakis N, Piaditis G, Tsagarakis S. 2015. Abnormal Responsiveness to Dexamethasone-Suppressed CRH Test in Patients With Bilateral Adrenal Incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 100(9):3478–3485.
- Vottero A, Kino T, Combe H, Lecomte P, Chrousos GP. 2002. A novel, C-terminal dominant negative mutation of the GR causes familial glucocorticoid resistance through abnormal interactions with p160 steroid receptor coactivators. *J Clin Endocrinol Metab* 87(6):2658–2667.
- Wagstaff KM, Jans DA. 2009. Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* 10(9):1188–1198.
- Williams RG, Kandasamy R, Nickischer D, Trask OJ Jr, Laethem C, Johnston PA. 2006. Generation and characterization of a stable MK2-EGFP cell line and subsequent development of a high-content imaging assay on the Cellomics ArrayScan platform to screen for p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol* 414:364–389.
- Xu M, Dittmar KD, Giannoukos G, Pratt WB, Simons SS Jr. 1998. Binding of hsp90 to the glucocorticoid receptor requires a specific 7-amino acid sequence at the amino terminus of the hormone-binding domain. *J Biol Chem* 273(22):13918–13924.
- Zhu HJ, Dai YF, Wang O, Li M, Lu L, Zhao WG, Xing XP, Pan H, Li NS, Gong FY. 2011. Generalized glucocorticoid resistance accompanied with an adrenocortical adenoma and caused by a novel point mutation of human glucocorticoid receptor gene. *Chin Med J (Engl)* 124(4):551–555.

2. Caractérisation de nouvelles mutations GR identifiées dans les suites du PHRC

Nous avons étudié quatre nouvelles mutations inactivatrices du GR présentes à l'état hétérozygote chez les patients. La mutation R491X, correspondant au remplacement d'une arginine en position 491 par un codon stop prématuré, la mutation Q501H correspondant au remplacement d'une glutamine par une histidine en position 501, la mutation Y660X, correspondant au remplacement d'une tyrosine par un codon stop prématuré et la mutation I757V, correspondant au remplacement d'une isoleucine par une valine en position 757 (Figure 14).

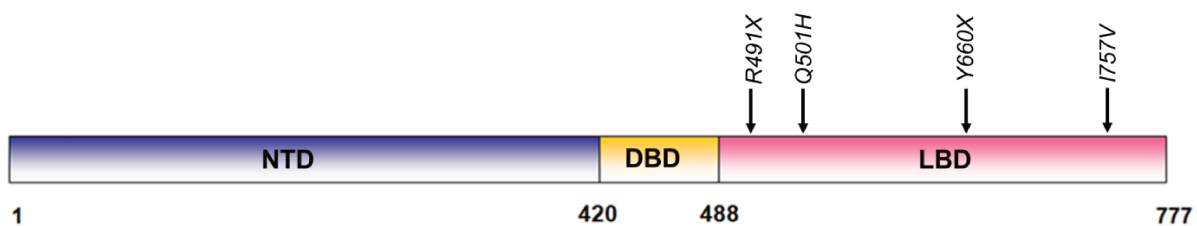


Figure 14 : Positionnement des nouvelles mutations hétérozygotes du GR sur le hGRα
NTD : Domaine N-terminal, DBD : Domaine de liaison à l'ADN et LBD : domaine de liaison au ligand

2.1 Caractéristique clinique, biologique et hormonale des patients porteurs des mutations hétérozygotes R491X, Q501H, Y660X, I757V

Les mutations R491X et Q501H ont été découvertes dans le cadre du bilan d'un incidentalome surrénalien bilatéral.

Le patient porteur de la mutation inactivatrice hétérozygote R491X a un syndrome de résistance aux GC associé à une obésité. Il n'a pas d'HTA (**Tableau 3**).

La patiente porteuse de la mutation inactivatrice hétérozygote Q501H a un axe HHS normal en dehors d'un cortisol minuit élevé. Cette patiente n'est pas en surpoids, n'a pas d'HTA et ni d'hirsutisme.

La mutation hétérozygote inactivatrice Y660X a été découverte dans les suites de la prise en charge de l'acromégalie de la patiente et devant la persistance d'un hypercortisolisme biologique. La patiente présente un syndrome de résistance à l'action des GC. Elle ne présente pas de surpoids mais une HTA associée à une kaliémie basse, actuellement traitée. La patiente présente une hyperplasie bilatérale des surrénales.

La mutation hétérozygote inactivatrice I757V a été découverte dans le cadre d'un bilan d'hirsutisme. La patiente ne présente pas de surpoids, ni d'HTA ou d'hyperplasie bilatérale des surrénales. Son bilan hormonal retrouve une absence de freinage du cortisol après prise

d'1 mg de DXM sans anomalie du CLU. La patiente a une concentration de Δ 4-androsténone augmentée mais les concentrations de testostérone, de sulfate de dehydroépiandrostérone et la 17-OH progestérone sont normales.

Mutations <i>NR3C1</i>	c.1471 C>T	c.1503 G>T	c.1980 T>G	c.2269A>G
Protéine hGR	R491X	Q501H	Y660X	I757V
Génotype	HETEROZYGOTE	HETEROZYGOTE	HETEROZYGOTE	HETEROZYGOTE
Age au diagnostique	44	60	70	23
Sexe	H	F	F	F
IMC	↗	N	N	N
Hirsutisme		NON	OUI	OUI
Tension Artérielle	N	N	↗	N
Hyperplasie Surrénalienne	Bilatérale	Bilatérale	Bilatérale	NON
ACTH	↗	N	N	N
CLU	↗	N	↗	N
Cortisol minuit		↗		↗
1 mg DXM Test	-	+	-	-
Aldostérone	N	↘		
Rénine	↘	N		
Kaliémie (mmol/l)	3,8	3,8	3,3	4,1-4,4
11-Deoxycorticostérone (DOC)	N		N	
Δ 4-androsténone				↗
17 OH Progestérone				N
SDHEA				N
Testostérone				N

Tableau 3 : Caractéristiques clinico-bio-hormonales des patients porteurs des mutations hétérozygotes R491X, Q501H, Y660X, I757V du GR

IMC : Indice de masse corporelle

CLU : Cortisol libre urinaire des 24heures

1 mg DXM test : test de freinage minute de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien ; - : absence de freination ; + : freination

Nous avons ensuite caractérisé fonctionnellement les mutants du GR. Nous avons donc réalisé une mutagenèse dirigée des différents mutants à partir d'un plasmide pCDNA₃hGR α codant le GR sauvage (GRWT) puis nous avons transfecté les différents plasmides codant les différents mutants dans des cellules HEK293T afin d'étudier l'expression protéique, la localisation subcellulaire, la transactivation d'un gène cible et enfin l'effet dominant négatif des mutants.

2.2 Expression protéique des mutants du GR

Nous avons évalué l'expression protéique des mutants R491X, Q501H, Y660X et I757V en comparaison au récepteur sauvage (GRWT) (**Figure 15**). Le GRWT est détecté sous forme d'une bande de forte intensité migrant autour de 100 kDa avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre le NTD du GR humain. Cette bande est également observée pour le mutant Q501H et est de très faible intensité pour les mutants I757V et Y660X mais également dans les cellules HEK, non transfectées, avec une très faible intensité, correspondant au GR endogène présent dans ces cellules. Pour le mutant R491X, on observe deux bandes, celle de faible intensité correspondant au GR sauvage endogène dans les cellules HEK, et une autre bande dont le poids moléculaire est plus faible que celui du GRWT, correspondant au mutant R491X en rapport avec le récepteur tronqué.

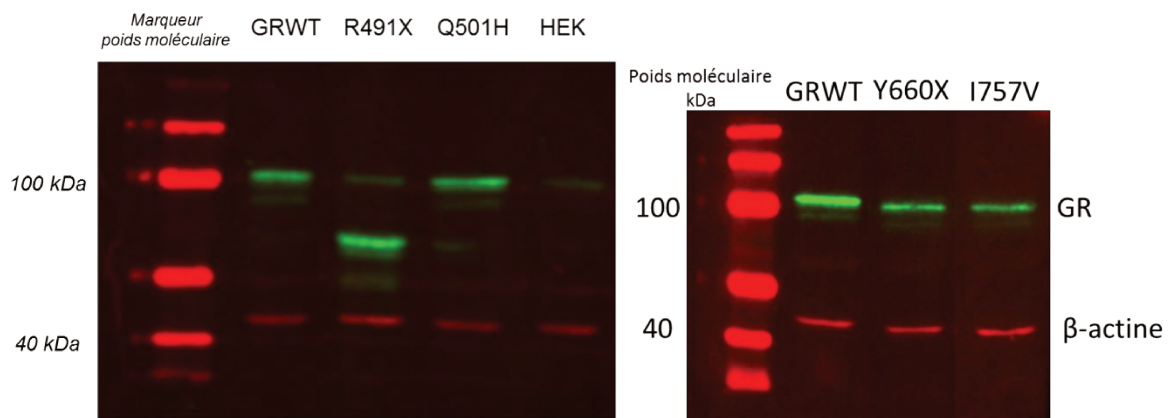


Figure 15 : Expression protéique du GR chez les GR mutants

Transfection transitoire de cellules HEK293T avec 400 ng de plasmides codant pour le GR sauvage (GRWT), pour les mutants R491X (R491X), Q501H (Q501H), Y660X (Y660X) et I757V (I757V) et analyse par Western Blot de 20 μ g de protéines avec un anticorps monoclonal de souris N-terminal dirigé contre les acides aminés 176 à 289 (sc 393232, Santa Cruz, dilué à 1/500^{ème}) et un anticorps de rabbit dirigé contre la β -actine (Sigma), dilué au 1/5000^{ème}.

Après transfection transitoire, le GR est bien traduit en protéine, qu'il soit de type sauvage (GRWT) ou porteur de mutations introduites par mutagenèse dirigée. Ces données nous permettent d'aller plus loin dans l'étude de la voie de signalisation glucocorticoïde.

2.3 Etude de la cinétique de la navette cyto-nucléaire des GR mutants

Nous avons ensuite étudié le transfert cyto-nucléaire hormono-induit de certains mutants GR. Après liaison à la DXM, le complexe GR-DXM est transféré dans le compartiment nucléaire. Nous avons donc comparé la localisation subcellulaire hormono-induite des mutants R491X et

Q501H avec celle du GRWT après 2 h d'exposition à la DXM ou au véhicule, l'éthanol avec l'aide du Dr Larbi Amazit (Inserm UMS32, Le Kremlin Bicêtre) (**Figure 16A**).

Dans les conditions contrôles, le GRWT est présent majoritairement dans le cytoplasme des cellules. La quantification par HTM (Vitellius et al. 2016) a permis une analyse plus précise de cette distribution nucléo-cytoplasmique, sur plus de 200 cellules et confirme la localisation cytoplasmique prédominante avec un rapport nucléo-cytoplasmique arbitrairement fixé à 1. Après 2 h d'exposition à la DXM, le GRWT devient majoritairement nucléaire avec un rapport nucléo-cytoplasmique à 2,2 (**Figure 16B**). Le mutant R491X, en absence d'hormone, est surtout cytoplasmique mais reste dans ce compartiment après 2 h d'exposition à la DXM (**Figure 16A**), le rapport nucléo-cytoplasmique se maintient à 1, démontrant l'absence de transfert nucléaire de ce mutant, dépourvu de LBD. Le mutant Q501H est également majoritairement cytoplasmique en absence d'hormone mais est transféré efficacement dans le noyau après 2 h d'exposition à la DXM avec un rapport nucléo-cytoplasmique à 1,8, statistiquement inférieur à celui du GRWT ($P < 0,0001$), suggérant un délai dans le transfert cyto-nucléaire de ce mutant. Des analyses cinétiques plus fines permettront d'affiner ces résultats. L'étude de la cinétique des mutants I757V et Y660X est en cours.

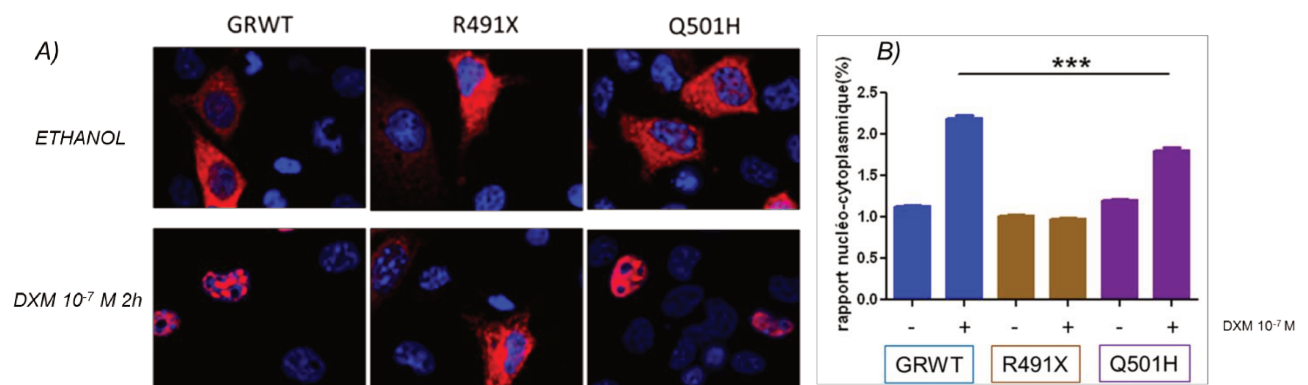


Figure 16 : Navette cyto-nucléaire hormono-induite du GRWT et des mutants R491X et Q501H.

A) Transfection transitoire de 400 ng de plasmide codant le GR sauvage et les mutants R491X et Q501H dans des cellules COS-7, images en déconvolution au grossissement 100X. En bleu : fluorescence au dapi représentant le noyau des cellules et en rouge : fluorescence représentant la présence du GR dans les cellules. B) Comparaison du rapport nucléo-cytoplasmique des mutants Q501H et R491X au GRWT en présence d'éthanol et à 2 h de DXM 10⁻⁷ M par HTM sur plus de 200 cellules, *** $P < 0,0001$.

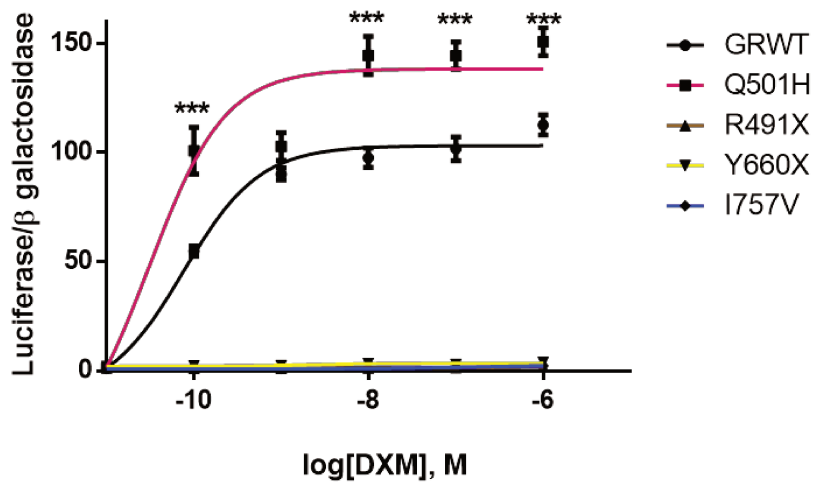
2.4 Caractérisation des fonctions de transactivation des GR mutants

Nous avons étudié la capacité des mutants à transactiver le gène rapporteur luciférase, c'est à dire à lier les GRE localisés sur le promoteur MMTV possédant 1 GRE et 3 hémiGRE (Gouilleux et al. 1991), qui contrôle l'expression de la luciférase et recrute la machinerie transcriptionnelle.

La courbe dose-réponse de DXM (**Figure 17**) montre que le mutant Q501H a une capacité de transactivation plus importante que celle du GRWT ($P < 0,0001$) pour toutes les concentrations de DXM. Néanmoins la valeur de l'EC50 obtenue pour le GRWT ($8,0 \pm 1,9 \cdot 10^{-11} \text{M}$) et le mutant Q501H ($5,1 \pm 1,8 \cdot 10^{-11} \text{M}$) n'est statistiquement pas différente.

L'étude des capacités de transactivation du gène rapporteur luciférase a révélé, que le mutant I757V a une activité transactivatrice nulle. Comme attendu, le mutant R491X, qui n'est pas transféré dans le noyau puisqu'il ne possède plus de LBD, et le mutant Y660X, porteur d'un codon stop prématuré entraînant la perte de l'hélice H12, ont des capacités transactivatrices nulles.

A)



B)

	$EC_{50} (M) \pm SEM$	P
GRWT	$8,0 \cdot 10^{-11} \pm 1,9 \cdot 10^{-11}$	
Q501H	$5,1 \cdot 10^{-11} \pm 1,8 \cdot 10^{-11}$	1,00

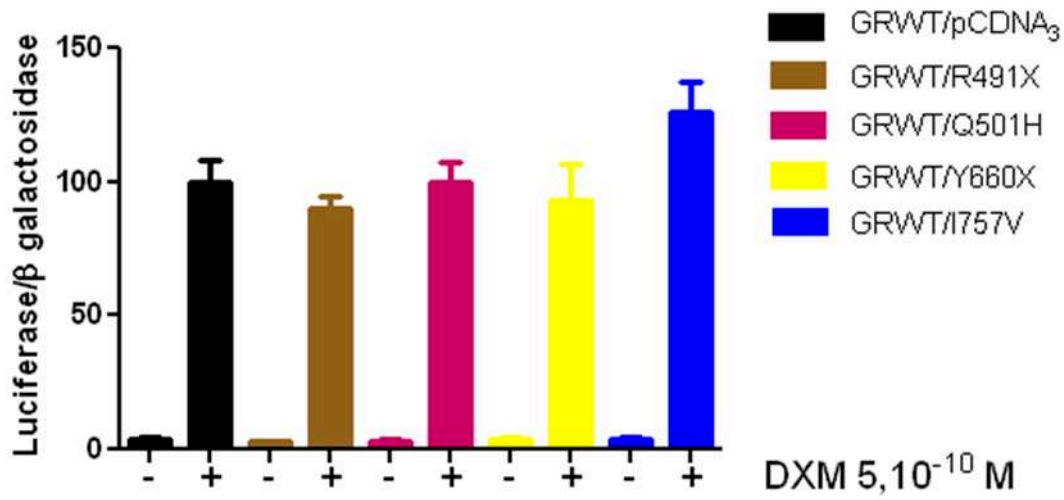
Figure 17 : Activité transactivatrice des GR mutants comparée à celle du GR sauvage

Transfection transitoire du GRWT et des différents mutants dans des cellules HEK293T de 40 ng de plasmide codant pour le GR sauvage ou les mutants, par puits de plaque 96, exposés pendant 24 h à des concentrations croissantes de DXM allant de 10^{-10} à 10^{-6} M ou d'éthanol. L'activité luciférase est normalisée sur l'activité de la β -galactosidase. Les données sont exprimées en moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en 8 réplicats, *** $P < 0,0001$ (test non paramétrique de Mann-Whitney). B) L' EC_{50} entre le GRWT ($8,0 \pm 1,9 \cdot 10^{-11}$ M) et le mutant Q501H ($5,1 \pm 1,8 \cdot 10^{-11}$ M) n'est statistiquement pas différent. Les données sont exprimées en moyennes \pm SEM de 3 expériences indépendantes

2.5 Recherche d'un effet dominant négatif des GR mutants sur le GR sauvage

Pour être au plus proche de la physiopathologie des patients (mutations présentes à l'état hétérozygotes), nous avons réalisé des co-transfections du vecteur d'expression du GRWT avec celui du mutant ou d'un plasmide vide pour maintenir la quantité d'ADN transfectée constante puis analysé et comparé la transactivation relative. Ces expériences ont exclu l'existence d'un effet dominant négatif des mutants sur le GRWT hormis à la concentration de DXM 10^{-9} M pour le mutant I757V (Figure 18 A et B), résultat dont la pertinence biologique interroge.

A)



B)

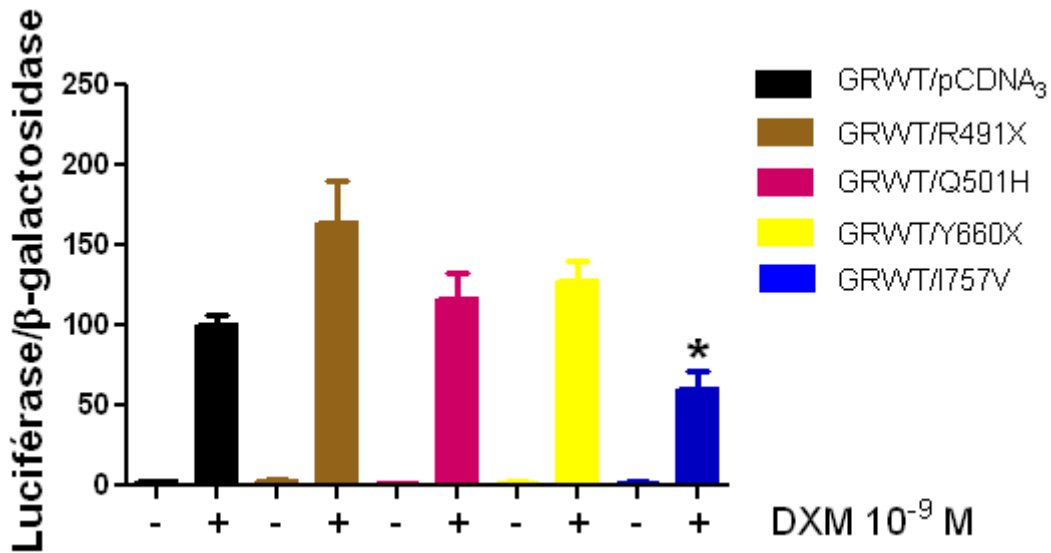


Figure 18 : Recherche d'un effet dominant négatif du GR mutant sur le GRWT

Co-tranfection transitoire dans les cellules HEK 293T de 1,5 ng de GRWT et de GR mutant ou plasmide vide (pcDNA3) / puits et traitement par DXM 5.10⁻¹⁰ M (A) et DXM 10⁻⁹ M (B). Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes réalisées en 8 réplicats, * *P*<0,05 (Anova non paramétrique).

2.6 Recherche d'un effet dominant négatif du GR β Q501H sur le GR α

Nous avons été surpris des résultats de transactivation obtenus pour le mutant Q501H dont les valeurs sont supérieures à celles obtenues avec le GR sauvage, quelles que soient les concentrations de DXM mais sans différence de l'EC50. Ces résultats diffèrent clairement de tous les résultats obtenus pour les autres mutations décrites dans le LBD. Cependant, l'apparente absence de résistance à l'action des GC observé *in vitro* est en accord avec le peu de signes cliniques de résistance présentés par la patiente porteuse de la mutation hétérozygote Q501H.

Cette mutation est positionnée dans l'exon 5 et par conséquent sur le hGR α , mais également dans la mesure où l'exon 5 est également épissé, dans le hGR β . Nous avons formulé l'hypothèse d'un effet dominant négatif supérieur de hGR β muté (β Q501H) par rapport au hGR β (β WT) sur le hGR α (α WT). Nous avons confirmé l'effet dominant négatif du hGR β sur le hGR α , mais nous n'avons pas retrouvé d'effet dominant négatif plus important de hGR β Q501H sur le hGR α , et de façon surprenante on retrouve une perte de cet effet dominant négatif en présence du mutant hGR β Q501H (**Figure 19**).

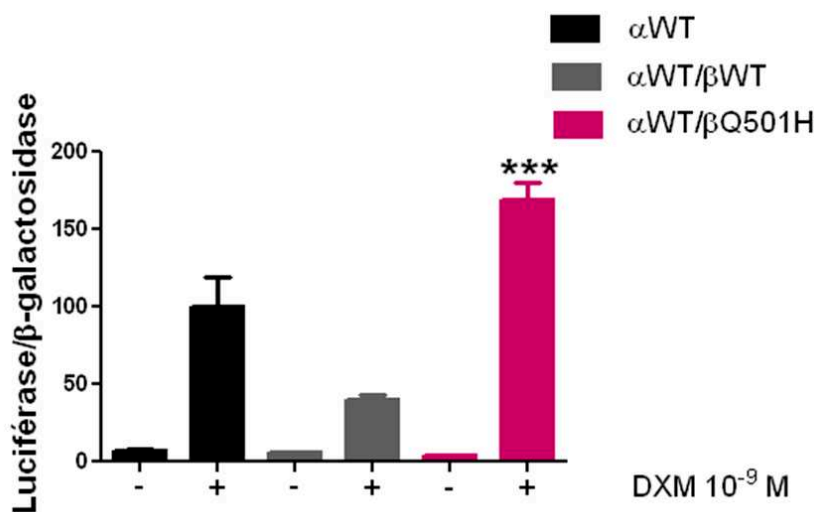


Figure 19 : Absence d'effet dominant négatif du hGR β Q501H sur GR α (α WT)

Co-transfection transitoire dans les cellules HEK293T de 1,5 ng de GRWT et de mutant ou plasmide vide (pCDNA₃)/puits. Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes, réalisées en 8 réplicats, *** $P < 0,0002$, avec le test Anova non paramétrique.

2.7 Modélisation tri-dimensionnelle du GR mutant I757V

La mutation Q501H étant située dans la région charnière, il n'a pas été possible de la modéliser car il n'existe pas de modèle structural tridimensionnel pertinent.

Pour préciser les conséquences de la mutation I757V, nous avons réalisé une modélisation tri-dimensionnelle de ce mutant en collaboration avec le Dr Jérôme Fagart (**Figure 20A, B et C**). L'Ile⁷⁵⁷ est très conservée entre les espèces mais également dans la famille des récepteurs nucléaires (**Figure 20D**). Cette isoleucine est située dans l'hélice H12, établit des contacts directs avec la poche de liaison du ligand et permet des contacts importants avec l'hélice H11 (notamment une liaison avec la Cys⁷³⁶), avec l'hélice H5, le Trp⁶⁰⁰ et l'hélice H12 (avec la Leu⁷⁵³) (**Figure 20A et 20B**). Chacun de ces contacts est aboli lors du remplacement par une valine, déstabilisant complètement la poche venant accueillir le ligand (**Figure 20C**).

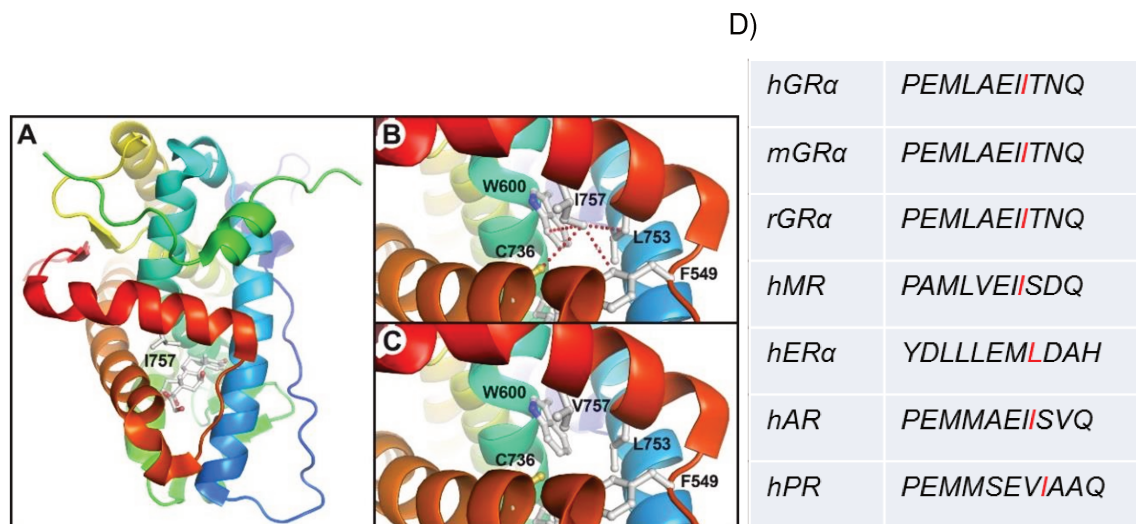


Figure 20 : Modélisation 3D de l'environnement de l'isoleucine 757 (A et B) et son remplacement par la valine 757 (C) et conservation de l'isoleucine 757 au sein des espèces et des autres récepteurs nucléaires.

A) Structure complète du LBD de hGRα (PDB 1M2Z, Bledsoe et al., Cell 2002) avec les hélices α et les feuillets β. La dexaméthasone, à l'intérieur de la poche du LBD est montrée avec ses atomes de carbone et d'oxygène colorés respectivement en blanc et rouge. B et C) Focus sur respectivement Ile⁷⁵⁷ et Val⁷⁵⁷. Des courtes liaisons de van der Waals entre l'δ-méthyl de Ile⁷⁵⁷ et les résidus autour sont illustrés par des lignes pointillées rouges, qui sont abolies, lors de la substitution par la Val⁷⁵⁷ (C). D) Conservation de l'isoleucine dans le récepteur aux glucocorticoïdes des espèces humaines (h), souris (m) et rat (r) mais également au sein des autres récepteurs nucléaires : AR, MR et PR et l'isoleucine est remplacée par une leucine, structurellement proches dans le ER.

A : Alanine, D : Acide aspartique, E : acide glutamique, H : Histidine, I : Isoleucine, L : Leucine, M : Methionine, N : Asparagine, P : Proline, Q : Glutamine, S : Sérine, T : Threonine, V : Valine, Y : Tyrosine, h : humain, m : souris, r : rat, AR : récepteur aux androgènes, ER : récepteur aux oestrogènes, MR : récepteur aux minéralocorticoïdes, PR : récepteur à la progestérone.

En résumé, l'expression protéique par WB a montré que le mutant R491X était bien une protéine tronquée comme attendu. Les mutants R491X et Y660X sont incapables de lier la DXM et de subir une translocation vers le noyau. Le mutant Q501H est exprimé en quantité équivalente au GRWT. Après liaison à la DXM, le complexe Q501H-DXM est transféré avec un léger retard dans le noyau, où le mutant Q501H est capable de lier l'ADN et de transactiver les gènes cibles. Le mutant I757V, exprimé en quantité plus faible que le GRWT, est incapable de transactiver les gènes cibles.

3. Caractérisation fonctionnelle *in vitro* de nouveaux variants du GR identifiés par NGS

Quels que soient les gènes étudiés, le séquençage nouvelle génération (NGS) a conduit à l'identification de nombreux variants génétiques dont l'implication pathogénique n'est pas du tout établie.

Le service de Génétique de l'hôpital Bicêtre (Dr Jérôme Bouligand) a mis en évidence, à l'aide d'une puce NGS ciblant le gène *NR3C1*, 6 nombreux variants hétérozygotes, faux sens, originaux du GR : F65V, correspondant au remplacement d'une phénylalanine par une valine en position 65, M86V correspondant au remplacement d'une méthionine par une valine en position 86, A229T, correspondant au remplacement d'une alanine par une thréonine en position 229, A304E, correspondant au remplacement d'une alanine par un acide glutamique en position 304, N374S, correspondant au remplacement d'une asparagine par une sérine en position 374 et R386Q, correspondant au remplacement d'une arginine par une glutamine en position 386, tous situés dans l'exon 2. Nous avons fonctionnellement caractérisé ces variants dans cet article, et les résultats de ce travail ont été publiés cette année dans le Journal of Endocrine Society (Foussier, Vitellius et al. 2019).

Article 2 : Functional Characterization of Glucocorticoid Receptor Variants Is Required to Avoid Misinterpretation of NGS Data

Foussier L, Vitellius G, Bouligand J, Amazit L, Bouvattier C, Young J, Trabado S, Lombès M

Journal of endocrine society, 2019

Functional Characterization of Glucocorticoid Receptor Variants Is Required to Avoid Misinterpretation of NGS Data

Loïc Foussier,^{1*} Géraldine Vitellius,^{1*} Jérôme Bouligand,^{1,2} Larbi Amazit,^{1,3} Claire Bouvattier,⁴ Jacques Young,^{1,5} Séverine Trabado,^{1,2} and Marc Lombès^{1,5}

¹INSERM UMR_S U1185, Fac Med Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France; ²Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, F-94275, France; ³Unité Mixte de Service 32 (UMS-32), Institut Biomédical de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, F-94276, France; ⁴Service d'Endocrinologie Pédiatrique, Assistance publique des hôpitaux de Paris, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, F-94275, France; and ⁵Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, F-94275, France

ORCID numbers: 0000-0003-3189-023X (M. Lombès).

*L.F. and G.V. contributed equally to this work.

Recent advances in genetic analysis technologies such as next-generation sequencing (NGS) have considerably increased the incidental discovery of genetic abnormalities. Six heterozygous missense mutations of the human glucocorticoid receptor (GR; encoded by the *NR3C1* gene) have been identified in the context of genetic screening of endocrine pathologies. GR, a nuclear receptor, hormone-induced transcription factor, is involved in many physiological processes. Nevertheless, the pathogenic significance of incidentally discovered mutations remains obscure. The aim of this work was to characterize these variants by evaluating their functional impact on GR signaling. Six original GR variants, located in exon 2, led to amino acid substitutions of the N-terminal domain of GR (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, and R386Q), excluding mainly the activation function tau core 1 domain, the potential site of functional interaction with transcriptional coregulators. Transient cotransfection in HEK293T cells of mutated GR-expressing vectors and a luciferase reporter established dose-response curves for dexamethasone. This excluded any major transactivation abnormality of the mutated GRs (ligand concentration leading to 50% maximal transactivation capacity \approx 0.2 nM), with maximal transactivation capacity identical to that of the wild-type (WT) GR and without modification of the potentiation of transcriptional coactivator steroid receptor coactivator 2 except in N374S. Moreover, protein expression of mutated GRs and their cytonuclear translocation studied by immunocytochemistry were almost unchanged compared with WT GR. These results underline the silent nature of these missense GR variants and call for cautious interpretation of the discovery of genetic incidentalomas by NGS in the absence of detailed characterization in order to appropriately assess their functional impact on a particular signaling pathway.

Copyright © 2019 Endocrine Society

This article has been published under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial, No-Derivatives License (CC BY-NC-ND; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Freeform/Key Words: *NR3C1*, glucocorticoid signaling, transcription, genetic incidentalomas

Since the early 2000s, improvement in genetic technologies have allowed easier and faster sequencing with high fidelity. Next-generation sequencing (NGS), also referred to as high-throughput sequencing, has drastically changed classic genetic screening compared with

Abbreviations: aa, amino acid; B_{max} , maximal transcriptional activity; DXM, dexamethasone; EC50, ligand concentration leading to 50% maximal transactivation capacity; GC, glucocorticoids; GR, glucocorticoid receptor; hGR, human glucocorticoid receptor; N/C, nuclear/cytoplasmic ratio; NGS, next-generation sequencing; *NR3C1*, nuclear receptor subfamily 3 group C member 1; NTD, N-terminal domain; SRC, steroid receptor coactivator; WT, wild-type.

earlier techniques, notably the time-consuming process of Sanger-based sequencing [1]. However, NGS technologies (*e.g.*, Illumina[®], Ion Torrent[®]) produce massive data that should be stocked and analyzed [2]. Clinical use of NGS has shortened the delay between blood sampling and results but has increased the number of both analyzable genes and patients, yet allowing earlier genetic diagnosis of patients [3, 4]. Thus, NGS has considerably changed genetic testing as a diagnostic tool—from select targeted genes to the association of known genes implicated in the pathogenicity of the disease [5, 6]. Some variants are of unknown significance according to the classifications proposed by the American College of Medical Genetics and Genomics in 2015 [7], and it is often difficult to appreciate whether they are pathogenic variants. Despite the use of predictive software examining the impact of genetic variants on protein functionality (*i.e.*, PANTHER, MutationTaster, Human Splicing Finder, PhyloP, VarSome) [7] and because three-dimensional models may not be available for some proteins, it is clear that only detailed functional characterization of the protein variants can predict the deleterious impact of genetic variation.

Recently, using an NGS gene panel composed of 84 protein-coding genes to search for genetic alterations potentially associated with specific clinical endocrine phenotypes, we incidentally discovered six heterozygous missense variants of the nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (*NR3C1*) gene encoding the human glucocorticoid receptor (hGR) isoform α . This ligand-dependent transcription factor belongs to the nuclear receptor superfamily [8] and mediates most glucocorticoid (GC) actions in a large variety of tissues. hGR α is a modular 777-amino acid protein of 97 kDa molecular weight composed of three distinct domains: the N-terminal domain (NTD), the DNA-binding domain (DBD), and the ligand-binding domain (LBD). The hinge region articulates the last two domains (Fig. 1). Fewer than 30 private loss-of-function mutations of hGR α have been reported to date, leading to GC resistance syndrome [9–12]. Up to now, two gain-of-function mutations located at the end of the NTD (D401H) and at the end of the 3'-UTR of the *NR3C1* gene (G3134T), associated with GC hypersensitivity syndrome, have been described [13, 14]. No deleterious mutation has ever been reported in the NTD of the GR. Interestingly, all six heterozygous missense variants incidentally discovered by NGS are located in the NTD of hGR α .

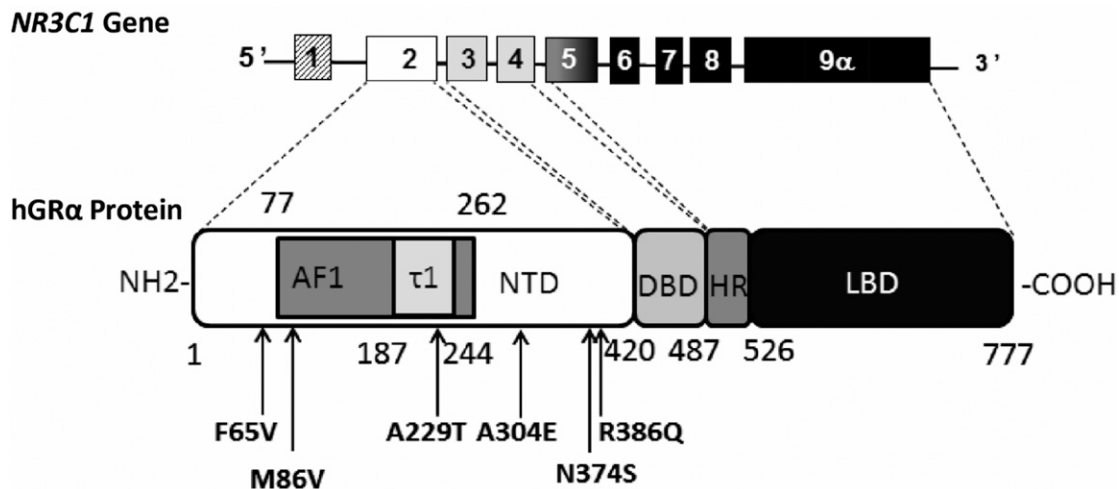


Figure 1. Schematic representation of *NR3C1* gene organization and localization of the six missense variants in the NTD of the GR α protein. The *NR3C1* gene is located in chromosome 5 in humans and contains at least 10 exons (exon 9 β is not illustrated). The first one is an untranslated exon. Exon 2, the first translated exon, encodes the entire NTD (aa 1–420) composed of the activation function 1 (AF1) domain (aa 77–262), which encompasses the tau core 1 (τ 1) domain (aa 187–244). Exons 3 and 4 encode the two zinc fingers of the DNA-binding domain (DBD; aa 421–487), whereas exons 5 to 9 encode the hinge region (HR; aa 488–526) and the ligand-binding domain (LBD; aa 527–777) of the GR α protein. All six missense genetic variants (arrows) discovered by NGS are located in the NTD.

The NTD, composed of 420 amino acids, is the longest domain of hGR α and is entirely encoded by exon 2. NTD is the target for many posttranslational modifications (*e.g.*, phosphorylation, ubiquitination, sumoylation), essential for optimal and efficient signal transduction. The tridimensional structure of the NTD is presently unsolved because of its intrinsic disorder state [15–18]. Amino acids 77 to 262 harbor a ligand-independent activation function of the hGR named *activation function 1* [19–21], which contains a major activation domain also referred to as *Tau1 core*, a short 58-aa residue domain located between amino acids 187 and 244 (Fig. 1), essential for the activation function of hGR α . The tau core 1 is mostly composed of three α -helical prestructured motifs surrounded by repressive regions [16, 18, 19, 22]. The NTD is a privileged site for interaction and binding with regulatory molecules, namely transcriptional coregulators [steroid receptor coactivator (SRC) 2 or TIF2 and SRC1] [23–25].

The purpose of this study was to perform a functional characterization of the six heterozygous missense variants of hGR α , referred to as *genetic incidentalomas*, to clarify the potential pathogenic impact of these genetic variations and to improve our understanding of some aspects of GR-mediated signaling.

1. Methods

A. Genetic Studies

Two hundred patients in the Genetic Department of Bicêtre Hospital underwent genetic screening for gonadic diseases and steroidogenesis abnormalities. None of the patients presented with overt GC resistance syndrome. All patients gave their written consent for these genetic analyses. Genomic DNA was extracted from peripheral lymphocytes, and the entire coding exons and exon-intron junctions of the following genes were sequenced with the NGS technology Illumina[®], as previously described [26]. All 84 genes are described in Table 1.

The *NR3C1* gene was compared with National Center for Biotechnology Information references (NG 016367.1 RefSeqGene, NM 000176.2 Transcript, and NP 000167.1 Protein). Of 200 individuals, six patients were found to carry an *NR3C1* variation corresponding to a heterozygous missense mutation of a single nucleotide. All variants were located in the NTD of the hGR. These patients had no other genetic variations in any of the 84 genes of the NGS panel.

B. Site-Directed Mutagenesis

pcDNA₃hGR α (c.193T>G:p.F65V), pcDNA₃hGR α (c.256A>G:p.M86V), pcDNA₃hGR α (c.685G>A:p.A229T), pcDNA₃hGR α (c.911C>A:p.A304E), pcDNA₃hGR α (c.1121A>G:p.N374S), pcDNA₃hGR α (c.1120A>G-1122C>A:p.N374E), and pcDNA₃hGR α (c.1157G>A:p.R386Q) were obtained using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La

Table 1. List of the 84 Genes Included in the NGS Panel

Genes								
AKR1C2	CYP11A1	ESR1	GALT	LATS1	MSH5	NR3C2	RSP01	WNT4
AKR1C4	CYP17A1	ESR2	GATA4	LHB	NBN	NR5A1	SOHLH2	WT1
AMH	CYP21A2	FIGLA	GDF9	LHCGR	NCOA1	PAX6	SOX3	WWOX
AMHR2	DHH	FMR1	GJA4	LHX8	NCOA2	PGR	SOX9	XPNPEP2
AR	DIAPH2	FOXA1	GPR3	LHX9	NCOA3	PGRMC1	SRD5A1	
ATM	DMC1	FOXA3	HFM1	MAMLD1	NCOR1	PITX2	SRD5A2	
ATRX	DMRT1	FOXC1	HSD17B3	MAP3K1	NCOR2	POF1B	SRY	
BHLHB9	DMRT2	FOXL2	HSD3B2	MCM8	NOBOX	POR	STAG3	
BMP15	EIF2S2	FSHB	INHA	MCM9	NR0B1	RICTOR	STAR	
CBX2	EMX2	FSHR	INHBB	MID1	NR3C1	RPTOR	TSPYL1	

Jolla, CA), with pcDNA₃hGR α (NM 000176.2) as a template. Primers used are presented in [Table 2](#).

C. Cell Culture

Embryonic human kidney HEK293T and African green monkey kidney COS-7 cells were grown in DMEM (Life Technologies, Saint-Aubin, France) with 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France) and penicillin/streptomycin (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) and were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ [27].

D. Transactivation Assays

GR-deficient HEK293T cells were transfected with wild-type (WT) or mutated GR-expressing plasmids (40 ng/well in 96-well plates), reporter luciferase plasmid pMMTV-luc (40 ng/well), and pMIR- β -gal encoding β -galactosidase as a normalizing vector (35 ng/well) using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Saint-Aubin, France). In addition, SRC2 or TIF2 or pcDNA₃ (empty plasmid) (40 ng/well) was added in some transactivation assays together with the same amount of the three previously described plasmids. Six hours later, transfection medium was replaced with steroid-free DMEM medium. Twenty-four hours post-transfection, ethanol or increasing concentrations of dexamethasone (DXM) (0.1 to 1000 nM or 5 nM DXM for the cotransfection with SRC2) were added to the medium. Luciferase and β -galactosidase activities were measured in cell lysates as previously described [27, 28].

E. Western Blot Analysis

Twenty-four hours after transfection with the corresponding plasmids, HEK293T cells were lysed and 20 μ g of the protein extracts were submitted to electrophoresis. After electroblotting onto C nitrocellulose membranes and incubation with blocking solution [5% fat-free dry milk in Tris-buffered saline containing 1% Tween 20], immunoblotting was performed overnight at 4°C using a mouse monoclonal anti-hGR α antibody directed against the NTD of the protein (SC393232, Santa Cruz Biotechnology[®]) [29] at a final concentration of 1 μ g/mL and with the anti- β -actin antibody (Sigma, St Quentin-Falavier, France) [30] used as a loading control. Membranes were incubated with secondary fluorescent antibodies (Pierce; Dyelight 680 or 800) [31, 32]. Bands were visualized and quantified using Odyssey[®] Fc, Dual-Mode Western Imaging (Li-Cor, Lincoln, NE) [27].

F. Immunocytochemistry and Fluorescence Deconvolution Microscopy

GR-deficient COS-7 cells were transiently transfected with the corresponding plasmids and treated or not with 100 nM DXM for 1 hour and then processed for immunocytochemistry as previously described [33]. Briefly, cells were fixed, permeabilized, and incubated overnight at 4°C with a mouse anti-GR antibody [29], followed by 30 minutes of incubation with an anti-mouse Alexa 555-coupled secondary antibody [34]. After 10 minutes of postfixation, nuclear counterstaining was performed with 0.5 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole for 1 minute.

Table 2. Primer Sequences Used for Site-Directed Mutagenesis to Generate the Six Genetic GR Variants

Variants	Primer Sequence
F65V	5'-CGACGCAAGACTTTTGGTTGATGTTCCAAAAGGCTCA-3'
M86V	5'-TCTGTCAAAGCAGTTCCACTCTCAGTGGGACTGTATAT-3'
A229T	5'-TTTGCTTCTCCTCTGACGGGAGAAGACGATTCA-3'
A304E	5'-CACAGTTTACTGTGTCAGGAAAGCTTCTGGAGCAA-3'
N374S	5'-GGATCTGGAGATGACAGCTTGACTCTCTGGGG-3'
R386Q	5'-CTCTGAACTTCCCTGGTCAAACAGTTTTTTCTAATGGC-3'
N374E	5'-GAGTCCCCAGAGAAGTCAATTCGTCATCTCCAGATCCTTGG-3'

The base in bold indicates the point mutation.

Chambers were mounted using ProLong Gold mounting medium (Thermo Fisher Scientific). Fluorescence deconvolution microscopy was performed using Image Pro Plus AMS software (Media Cybernetics Inc., Marlow, UK) on a Mono Q Imaging Retiga 2000R Fast 1394 camera (Q Imaging Inc., Surrey, BC, Canada). Images were acquired with an automated upright BX61 microscope (Olympus, Rungis, France) equipped with an X60 objective (1.4 NA). A *z*-series of focal planes was digitally imaged and deconvolved with the three-dimensional blind iterative algorithm (Image Pro Plus AMS) to generate high-resolution images [27].

G. Automated High-Throughput Microscopy

Sequential images were acquired (20×/0.4 NA), analyzed, and quantified by the ArrayScan VTI imaging platform (Thermo Fisher Scientific). 4',6-Diamidino-2-phenylindole and GR fluorescence was captured using sequential acquisition. The Molecular Translocation V4 Bioapplication algorithm (vHCS Scan, version 6.3.1, Build 6586) was used to quantify the relative subcellular distribution of immunodetected GR, essentially as described by [33, 35]. The translocation index measurement represents the average value ratio of the nuclear intensity of GR to the cytoplasmic intensity of GR calculated for each selected cell per well [27]. The higher this value, the more GR is translocated into the nuclear compartment.

H. Statistical Analysis

Results were expressed as mean ± SEM in the tables and figures. Statistical analyses were performed with Prism 7.0a software (Graph Pad Software, La Jolla, CA). Comparison of continuous variables among different groups was performed using ANOVA or nonparametric Kruskal-Wallis tests with Dunn posttests. When appropriate, nonparametric Mann-Whitney *U* tests were also performed. *P* values <0.05 were considered significant.

2. Results

A. Identification of the NR3C1 Genetic Variants

Among the six heterozygous genetic variants identified (Fig. 1; Table 3), three were private variants (A304E, N374S, and R386Q), indicating that they have been rarely if ever described in any databases (ExAC and 1000G), whereas the other three variants (F65V, M86V, and A229T) have already been reported. M86V has been described in nine patients, whereas the allelic frequency of A229T was at 0.0014 (165/120812) and that of F65V was at 0.0013 (153/121406) in the general population, although the latter variant is more frequently associated with the African population (0.014) (<http://exac.broadinstitute.org/>). All these variants except M86V were classified as having unknown significance according to Varsome, whereas the M86V variant was classified as likely pathogenic by Varsome. None of these variants has ever been functionally characterized. With respect to interspecies conservation, the University of California Santa Cruz Genome Browser website (<https://genome.ucsc.edu/>) indicates that all these amino acids except N374 were strictly conserved in mammals (humankind, Rhesus monkey, mouse, dog, and elephant) and in the chicken. Amino acid M86 and R386 residues were also conserved in the zebrafish, whereas M86 was also recovered in the *Xenope Nr3c1* sequence. Although there is a potential pathogenicity of these variants and that no functional characterization has been performed, the MutationTaster website (www.mutationtaster.org/) predicted that all would be disease-causing mutations except for one hGR variant (*i.e.*, N374S), which was predicted to be an *NR3C1* polymorphism (Table 3). However, the association between genetic variation and disease is generally difficult to determine for rare variants in the absence of functional characterization.

Table 3. Summary of the Genetic and Protein Characteristics of the Six Missense GR Variants

DNA Modification	Protein Modification	Amino Acid Nature's Modification	Predicted Pathogenicity (MutationTaster)	Allelic Frequency (ExAC)	Interspecies Conservation (UCSC Genome Browser)			
					Mammary	Chicken	<i>Xenope</i>	Zebrafish
exon2: c.193T>G	F65V	0	Disease causing	153/121406	+	+	-	-
exon2: c.256A>G	M86V	0	Disease causing	9/121218	+	+	+	+
exon2: c.685G>A	A229T	Apolar → polar	Disease causing	165/120812	+	+	-	-
exon2: c.911C>A	A304E	Apolar → negative	Disease causing	1/121284	+	+	-	-
exon2: c.1121A>G	N374S	0	Polymorphism	1/121308	+	-	-	-
exon2: c.1157G>A	R386Q	Positive → polar	Disease causing	0	+	+	-	+

Amino acid nature's modification = conserved nature. Allelic frequency by ExAC and interspecies conservation by University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser. Mammals correspond to human, Rhesus monkey, mouse, dog, and elephant (+ conservation and - variation of the amino acid between species), and predicted pathogenicity is by MutationTaster.

B. Functional Characterization of hGR Variants

Global functionality of the entire GR signaling pathway is well evaluated by reporter gene assays [36]. Indeed, transactivation studies indirectly reflect all GR-dependent steps, including ligand binding, transconformation, nuclear translocation of the GR-ligand complex, functional association with transcriptional coregulators, and finally induction of target gene expression. For this purpose, dose-response curves (from 0.1 to 1000 nM) of DXM, a GC agonist, were established by transiently transfecting the GRE-Luc reporter gene and the WT human GR expression vector or its genetic variants (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, and R386Q) into GR-deficient HEK293T cells.

As illustrated in Fig. 2A, the transactivation capacity of WT reaches a plateau at 100 nM DXM concentration, with a calculated ligand concentration leading to 50% maximal transactivation activity, or B_{\max} (EC50) at 0.604 ± 0.160 nM DXM (mean \pm SEM, $n = 30$ replicates from three independent experiments) (Fig. 2B). The B_{\max} of WT was arbitrarily set at 1.0. All genetic variants were able to transactivate the GRE-Luc reporter gene to the same extent as that driven by the WT (Fig. 2A). No difference in luciferase activity was observed between the WT and the F65V, M86V, and R386Q variants at any DXM concentration. Likewise, transcriptional activities of the A229T and N374S variants did not differ from that of the WT, except at the lower 0.1 nM DXM concentration, with a relative transactivation measured at 0.41 ± 0.02 ($P < 0.01$; Kruskal-Wallis) for A229T and 0.51 ± 0.03 ($P < 0.001$) for N374S, compared with 0.29 ± 0.02 for the WT. Lastly and unexpectedly, only the A304E variant had a higher transactivation capacity at any concentration of DXM tested except 1 nM (nonparametric statistical analysis of Kruskal-Wallis on 30 replicates from four independent experiences). However, the EC50 was not different from that of the WT, suggesting a conserved affinity of the ligand. In any case, no altered transcriptional activity was observed with all tested variants, excluding any major deleterious functional consequences of the substitutions.

Figure 2B summarizes the main parameters (EC50 and B_{\max}) of all genetic GR variants. The EC50 (mean \pm SEM) calculated from at least three independent experiments for each variant was in the nanomolar range, whereas the B_{\max} did not differ from that of the WT except for the A304E variant, as mentioned previously.

Owing to the heterozygous nature of the identified genetic variants, which supports biallelic expression, and given that some GR mutations have reportedly exerted a dominant negative effect [27], we next evaluated whether these variants exert adverse effects on WT GR signaling. Despite the normality of the intrinsic transactivating properties of the GR variants, dose-responses curves of DXM that were performed after cotransfection of equimolar amounts of WT and GR variant expression vector excluded any dominant negative effect of GR variants (Fig. 2C).

C. Protein Expression of the Receptor

To examine whether slight modifications of GR variant transactivation capacity may be explained by different protein expression levels, western blot analyses were performed with whole cell extracts after transient transfections in HEK293T cells. As anticipated, WT and GR variants were detected with an anti-NTD GR antibody and were recovered as an ~ 100 -kDa band (Fig. 3A). Relative expression levels were identical for each GR variant and the WT as quantified by the hGR/ β -actin ratio. Statistical analysis showed no significant difference between the GR WT and the six variants ($P = 0.46$ by Kruskal-Wallis test) (Fig. 3B). Given that western blot analyses gave only an overall estimation of the total GR cellular protein content (without exploring potential discrete modifications of their subcellular localization) and to further exclude subtle protein expression alterations, automated high-throughput microscopy—a more sensitive and quantitative approach—was used to evaluate the DXM-induced GR nuclear transfer, a major and critical step of transactivation.

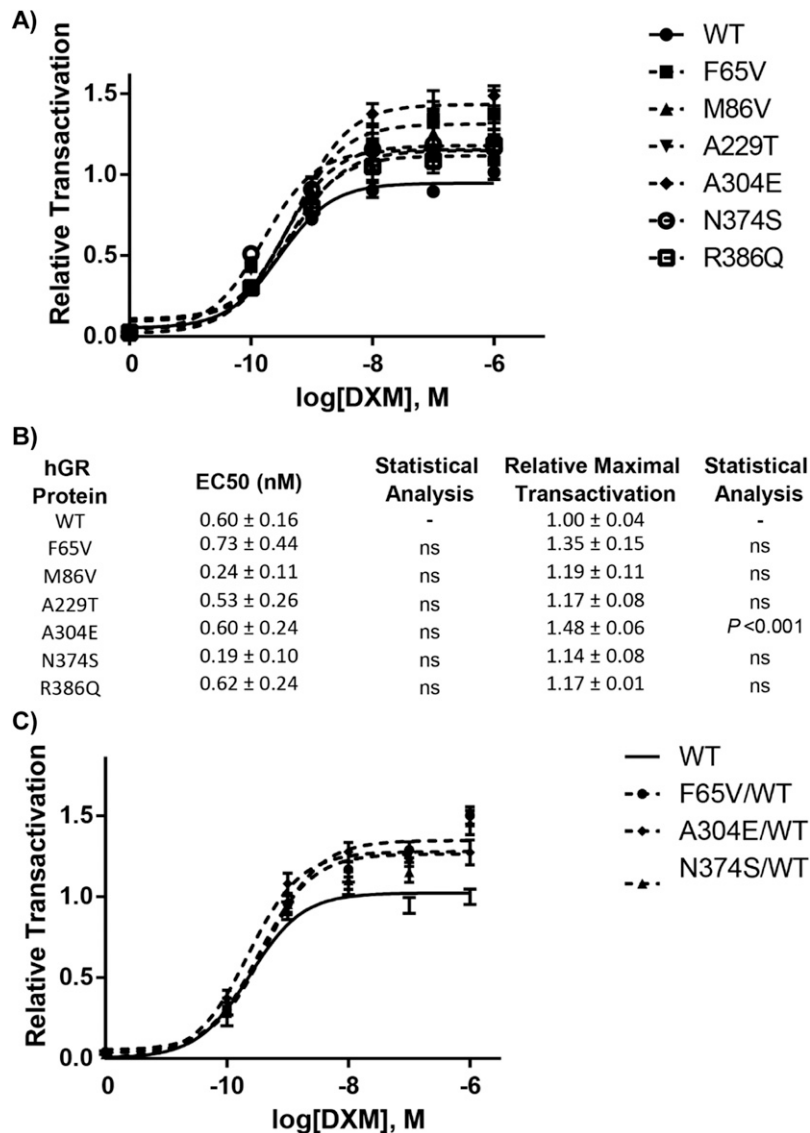


Figure 2. Dose-response curves of transcriptional activation of the GR variants compared with that of the WT receptor. (A) HEK293T cells plated in 96-well plates were cotransfected with 40 ng of plasmid encoding GR WT or GR variants (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, and R386Q), together with the reporter luciferase plasmid pMMTV-Luc, in which luciferase activity is under the control of GR response elements, and pMIR- β -gal encoding β -galactosidase. After 24-h stimulation by ethanol or increasing concentrations of DXM (10^{-10} to 10^{-6} M), enzymatic activities were measured. Transcriptional activities are expressed relative to the maximum transactivation of the WT (arbitrary set at 1). Each point represents the mean \pm SEM of at least 30 replicates performed from at least three independent experiments. Representation was fitted with the “log(agonist) vs response three parameters” function of GraphPad software. (B) Comparison of EC50 (DXM concentration inducing half-maximum transactivation) and of maximum transcriptional activity (B_{max}) of the six GR variants compared with the WT. Values are mean \pm SEM, obtained from four independent experiments (nonparametric ANOVA Kruskal-Wallis tests followed by Dunn posttests). (C) The absence of dominant negative effects of the variants on the WT is shown. HEK293T cells plated in 96-well plates were cotransfected with 40 ng of plasmid encoding GR WT or 20 ng of plasmid encoding WT plus 20 ng encoding GR variants (F65V, A304E, and N374S), together with the reporter luciferase plasmid pMMTV-Luc, in which luciferase expression is under the control of GR response elements, and pMIR- β -gal coding β -galactosidase. After 24-h stimulation by ethanol or increasing concentrations of DXM (10^{-10} to 10^{-6} M), enzymatic activities were measured. Transcriptional activities are expressed relative to the maximum transactivation of the WT (arbitrary set at 1). Each point represents the mean \pm SEM of at least 30 replicates

performed from at least three independent experiments. Representation was fitted with the “log(agonist) vs response three parameters” function of GraphPad software. EC₅₀, ligand concentration leading to 50% maximal transactivation capacity.

D. Ligand-Induced Nuclear Translocation of GR WT and Its Variants

Concomitant analysis of the fluorescence from both cytoplasmic and nuclear compartments facilitated assessment of the hormone-induced nuclear translocation for each GR variant (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, and R386Q) after transient transfection into GR-deficient COS-7 cells. **Figure 4A** shows representative images of DXM-induced nuclear transfer for the WT and F65V GR variant. In the absence of ligand, most WT and F65V GR is in the cytoplasmic compartment, whereas with 1-hour DXM stimulation, a clear-cut transfer to the nucleus was observed for both receptors. All other variants behaved similarly.

High-throughput microscopy analysis on >1500 transfected cells gave a precise quantification of subcellular GR shuttling (**Fig. 4B**). Under basal conditions (*i.e.*, in the absence of DXM), the WT and all variants displayed identical cytoplasmic localization with similar intensities, as revealed by the nuclear/cytoplasmic (N/C) fluorescence ratio. After 100 nM DXM exposure for 1 hour, a strong increase in the N/C ratio was measured for these variants, indicating an unaltered DXM-induced translocation of GR, even though the N/C ratio values were slightly lower for F65V (2.14 ± 0.03), M86V (1.71 ± 0.02), A229T (1.90 ± 0.02), A304E (1.96 ± 0.02), and N374S (1.74 ± 0.02) than for WT (2.37 ± 0.03) and R386Q (2.38 ± 0.09).

E. Transactivation Capacity in Association With a Coactivator SRC2 (or TIF2)

To more precisely explore the functional characteristics of GR variants, notably those exhibiting moderately higher transactivation capacity than the WT (*i.e.*, F65V, A229T, A304E, and N374S; see **Fig. 2**), we addressed the question of their potential increased interaction with the coactivator (SRC2 or TIF2), which is known to interact with the NTD of GR [37]. Transient transactivation assays in the presence or absence of SRC2-expressing vector (**Fig. 5A**) were performed. The basal transcriptional activity of each variant was arbitrarily set at 1, similar to that of WT as previously demonstrated (see **Fig. 2A**). Upon DXM stimulation with a 5-nM concentration, which induced approximately half-maximum transactivation potency, the presence of SRC2 significantly increased luciferase activity driven by the WT and the F65V, A229T, and A304E variants, consistent with the coactivating property of SRC2. Surprisingly, this SRC2-induced stimulation was not observed with the N374S variant (**Fig. 5A**), suggesting a pivotal role of aa N374 residue for molecular interaction with SRC2. Because phosphorylations are important posttranslational modifications, occurring mostly in the NTD and known to greatly affect hGR transactivity [38, 39], we postulated that the serine 374 residue may constitute a new phosphorylation site impairing recruitment of the coactivator SRC2. To support this hypothesis, the phospho-mimetic variant N374E hGR was generated; interestingly, it was also shown to be insensitive to SRC2 coactivation (**Fig. 5B**).

3. Discussion

With the aim of characterizing genomic variation, we demonstrated that the six heterozygous genetic missense GR variants (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, and R386Q) incidentally discovered after NGS analysis exert a normal transactivation capacity compared with that of the WT, excluding any major impacts on the GC signaling pathway as well as their association with specific diseases.

The current study has two important facets. First, it offers improved insight into GC signaling related to *NR3C1* variations and increases our understanding of certain critical steps of GR-mediated transcriptional activation. Second, it confidently assesses association

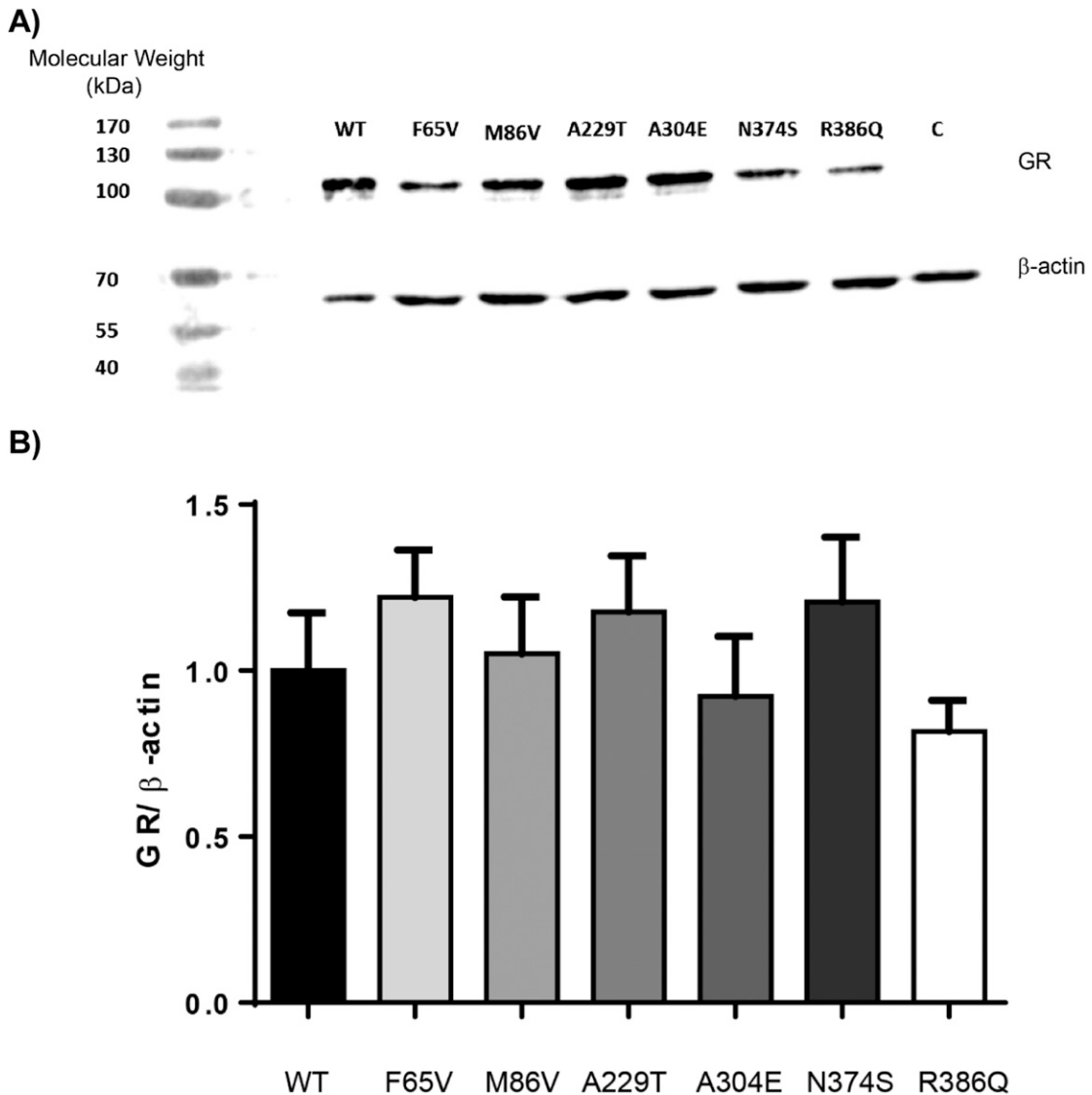


Figure 3. Protein expression of the WT and the six GR variants. (A) HEK293T cells were transiently transfected or not with a plasmid encoding the WT or the six GR variants. Twenty-four hours posttransfection, protein extracts (20 μ g) were analyzed by western blot followed by immunostaining with an antibody recognizing the NTD of GR (29; dilution 1/500) and an anti- β -actin antibody (30; dilution 1/1000). GR α protein expression was similar between the WT and the six variants but was below the detectable threshold in the untransfected cells used as control (*i.e.*, C). Representative image of three independent experiments is shown. The molecular weight marker used was PageRulerTM (Thermo Fisher Scientific). (B) Quantification of the protein signal did not reveal any statistically significant difference between the WT and the GR variants. Results are expressed as means \pm SEM.

information between a variant and the absence of disease, questioning the clinical decisions to be made following identification of such genetic alterations in the context of diagnostic uncertainty, and the potential pathogenicity of GR variants.

With respect to GC signaling, we ruled out any biologically relevant modifications in GR-mediated transcriptional activation of GR variants. Minor alterations were observed for some GR variants (F65V, A229T, A304E, and N374S); nevertheless, a potential cooperative activation of transcription through enhanced N/C interaction between the NTD and ligand-binding domain of the GR has not been explored. Although there are no absolute criteria to ascertain overactivity of GR variants [13, 40], higher endogenous GR-target gene expression

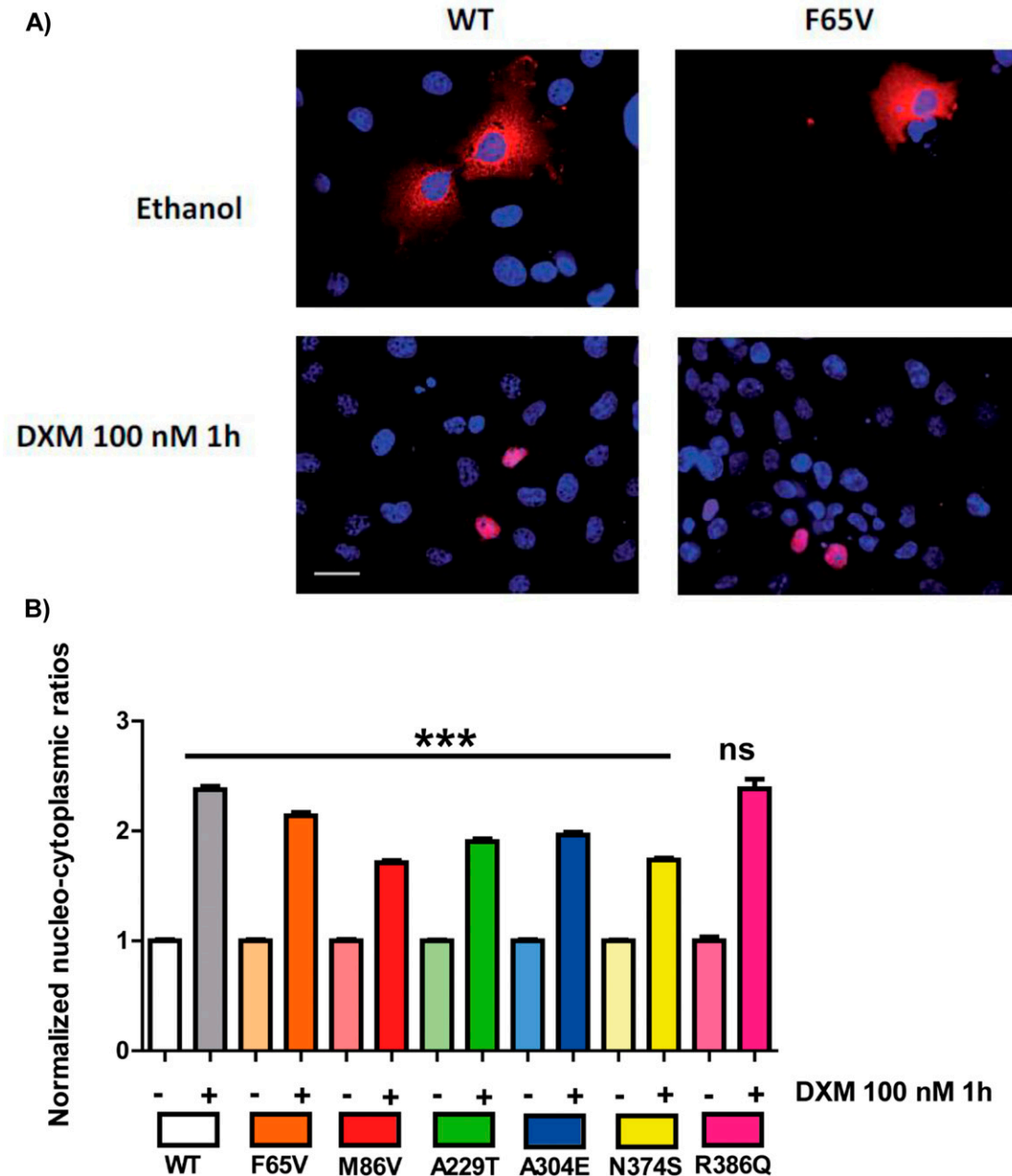


Figure 4. DXM-induced nuclear translocation of the WT and the six GR variants. COS-7 cells (grown in F6 or 100-mm petri dish flasks) were transiently transfected with 400 ng of plasmid encoding the WT or the six GR variants (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, and R386Q). After overnight recovery, cells were stimulated by ethanol (-) or 100 nM DXM (+) for 1 h and fixed and processed for immunofluorescence studies, followed by quantification analysis with high-throughput microscopy (see Methods section). (A) Representative images of cyto-nuclear translocation of the WT and F65V GR variant with ethanol (control) or with DXM for 1 h. Images obtained by deconvolution microscopy at 60 \times magnification and nuclear staining by 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue) and GR (red) using antibody [29] from Santa Cruz Biotechnology. White bar, 20 μ m. (B) Comparison of the cyto-nuclear shuttling of the six variants compared with that of the WT after quantification by high-throughput microscopy on >1500 transfected cells per condition. Results are expressed as mean \pm SEM. Nucleo-cytoplasmic ratios for each construction were normalized to the mean value arbitrarily set at 1 under basal conditions (*i.e.*, in the absence of DXM stimulation). Statistical analysis was performed by an ANOVA test followed by Bonferroni posttests. *** $P < 0.001$. ns, not significant.

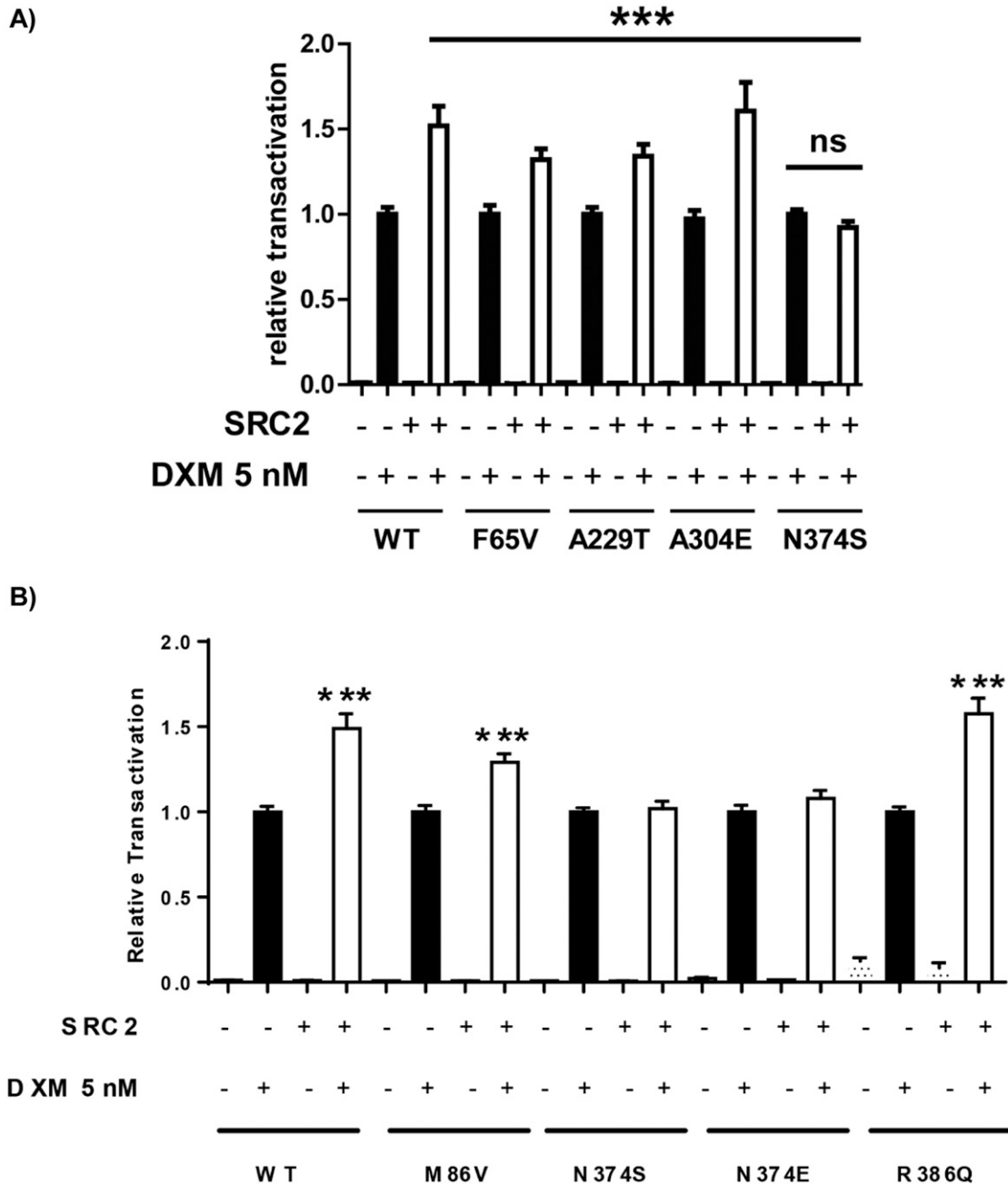


Figure 5. Effect of the coactivator SRC2 on GR transactivation. (A) HEK293T cells were plated on 96-well plates and cotransfected with 40 ng of plasmid encoding GR WT or the variants (F65V, M86V, A229T, A304E, and N374S), together with a plasmid encoding the coactivator SRC2 (40 ng/well) (+) as in the legend of Fig. 2. Cells were treated (+) or not (-) with 5 nM of DXM for 24 hours. Transcriptional activities were measured as in Fig. 2 and were expressed as mean \pm SEM of 12 replicates from three independent experiments, normalized for each construct to the transactivation value obtained after stimulation by DXM in the absence of SRC2, arbitrarily set at 1. There was no difference between the induction of transactivation by SRC2 for the WT and all the variants, except for N374S, which showed no increase in transactivation following SRC2 cotransfection. *** $P < 0.001$, nonparametric ANOVA Kruskal-Wallis test followed by Dunn posttests. (B) HEK293T cells were plated on 96-well plates and cotransfected with 40 ng of plasmid encoding GR WT or the variants (M86V, N374E, and R386Q), together with a plasmid encoding the coactivator SRC2 (40 ng/well) (+) as in the legend of Fig. 2A. Cells were treated (+) or not (-) with 5 nM of DXM for 24 hours. Transcriptional activities were measured as in Fig. 2A and were expressed as mean \pm SEM of

eight to 12 replicates from three independent experiments, normalized for each construct to the transactivation value obtained after stimulation by DXM in the absence of SRC2, arbitrarily set at 1. SRC2 cotransfection stimulated transactivation of the WT as well as that of the M86V and R386Q variants but not that of N374S and N374E variants. *** $P < 0.001$, nonparametric Mann-Whitney U tests. ns, not significant.

in appropriate cell models, as well as stronger sensitivity of DXM suppression tests in patients, may be clearly indicative of higher GR activity for a given genetic variant.

Nonetheless, apart from few examples of genetic modifications that can positively impact the human GR pathway [*i.e.*, the polymorphisms N363S, localized in the NTD (rs6195), and *BclI* (rs41423247), localized in the first intron of the *NR3C1* gene] [8], the unique gain-of-function D401H mutation of the NTD [13] and a double mutant of the 3'-UTR of exon 9 β , coupled with a polymorphism (A3669G/G3134T and *BclI*) alleviating the dominant negative effect of GR β over GR α [14], we were able to unambiguously exclude any deleterious impacts of the GR variation identified in the current study.

Of note, our characterization of GR variants led us to an unexpected result that improved our understanding of GR-mediated signaling. Surprisingly, although residue 374 was located in the NTD, it did not directly reside in the activation function 1 domain, known to constitute the interacting site with SRC2 [37]. It was proposed that this binding structurally modifies the NTD structure from intrinsic disorder to an α helical structure, leading to an activating state of the GR [37]. We hypothesized that the asparagine to serine substitution at position 374 would alter the SRC2 binding site on the GR, as it was previously demonstrated that the 201 to 360 aa deletion of hGR led to a loss of SRC2 binding to hGR [40]. To test whether the novel serine 374 residue might constitute a phosphorylation site impairing recruitment of the coactivator SRC2, the phospho-mimetic variant N374E hGR was shown to be insensitive to SRC2 coactivation. This is reminiscent of the creation of the serine 363 phosphorylation site of the N363S polymorphism (rs6195), which created an environment leading to increased coactivating capacity of the coactivator SRC2 [41, 42], as opposed to the mirror image of the serine 374, which potentially reduced SRC2 interaction (present study). Further studies are required to validate this hypothesis.

Another important feature of this study is the clinical, biological, and bioethical issue of incidentally discovered genetic GR variants. The American College of Medical Genetics and Genomics published recommendations for managing incidental findings [5] as a function of high likelihood of pathogenicity with the use of standard terminology: *pathogenic*, *likely pathogenic*, *uncertain significance*, *likely benign*, and *benign* according to the classification [7]. Two categories of genomic variation were established: One is referred to as an *actionable gene* responsible for irreversible diseases potentially prevented by specific therapeutics upon patient informed consent; the second class belongs to incidental findings, subsequently termed *secondary findings* [43], in which established and appropriate or future interventions may prevent or reduce mortality or morbidity of genetic disorders. Guidance on reporting secondary findings [44] as well as the need for functional characterization of such genetic variations remains very controversial. In this context, management of NGS data and of the discovery of multiple variants of unknown significance remains quite difficult [7, 45], especially after a recent study revealed that one-fourth of healthy volunteers carried a monogenic disease risk with uncertain clinical usefulness, as revealed by genome sequence analysis [46].

It is often necessary to avoid false variants and exclude false-positive and false-negative results [1]. The pathogenic potential of new variants, notably missense mutations, requires the careful use of shared international databases [6], examination of interspecies nucleotide conservation, and determination of variation frequency, as well as familial segregation of the variants [47]. Predicting the functionality of the translated peptide from the genetic variant may be possible through *in silico* analysis according to the localization of the mutated nucleotide, the nature of amino acid substitution in a specific domain, and the predicted modification of the secondary protein structure. *In vitro* and/or *ex vivo* analysis may help

characterize the genetic variants [48]. However, some genes or a part of genes and their translated proteins may not be structured, and their modification cannot be predicted because of an intrinsic disorder state [16], as is the case for the NTD of GR.

In the current study, all predictions from MutationTaster and Varsome were somehow incorrect, pointing to the need for functional characterization to assess the pathogenicity or benignity of new variants. Thus, *in vitro* and/or *ex vivo* analysis of the newly identified variants may exclusively help to clarify their characterization. Although some variants may change classification [7, 47, 49–52], many authors nowadays strongly recommend functional characterization of new variants.

In sum, NGS has considerably improved genetic tests and access to an important number of genes in a large number of patients. However, a large amount of new data is generated, and identification of secondary findings requires functional characterization to adjust modeling and predict pathogenicity. Thus, this latter classification often leads to new concepts and novel mechanistic issues of well-known signaling pathways, as exemplified here for GR-mediated transcriptional activation.

Acknowledgments

The authors thank Isabelle Boucly and Chrislaine Saujot (CHU Bicêtre) for their excellent technical assistance in GR mutation screening.

Financial Support: This work was supported by grants from *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Inserm) and Paris-Sud University. L.F. was the recipient of a master degree fellowship from the French Endocrine Society and HRA Pharma laboratories. G.V. is the recipient of a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this study.

Author Contributions: M.L. contributed to the study concept and design. L.F. and G.V. performed experiments and statistical analysis. J.B. performed the NGS experiments and discovered the GR variants. L.A. contributed to the imaging analyses. L.F., G.V., and M.L. contributed to the drafting of the paper. M.L. took responsibility for submitting the manuscript for publication. All authors analyzed the data and corrected and approved the final version of the manuscript.

Correspondence: Marc Lombès, MD, Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris-Sud, 63, rue Gabriel Péri, F-94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex, France. E-mail: marc.lombes@u-psud.fr.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References and Notes

- van Dijk EL, Jaszczyszyn Y, Naquin D, Thermes C. The third revolution in sequencing technology. *Trends Genet.* 2018;**34**(9):666–681.
- Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, Waterston RH. DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature.* 2017;**550**(7676):345–353.
- Tan TY, Dillon OJ, Stark Z, Schofield D, Alam K, Shrestha R, Chong B, Phelan D, Brett GR, Creed E, Jarmolowicz A, Yap P, Walsh M, Downie L, Amor DJ, Savarirayan R, McGillivray G, Yeung A, Peters H, Robertson SJ, Robinson AJ, Macciocca I, Sadedin S, Bell K, Oshlack A, Georgeson P, Thorne N, Gaff C, White SM. Diagnostic impact and cost-effectiveness of whole-exome sequencing for ambulant children with suspected monogenic conditions. *JAMA Pediatr.* 2017;**171**(9):855–862.
- Adams DR, Eng CM. Next-generation sequencing to diagnose suspected genetic disorders. *N Engl J Med.* 2018;**379**(14):1353–1362.
- Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, McGuire AL, Nussbaum RL, O'Daniel JM, Ormond KE, Rehm HL, Watson MS, Williams MS, Biesecker LG; American College of Medical Genetics and Genomics. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med.* 2013;**15**(7):565–574.
- Roy S, Coldren C, Karunamurthy A, Kip NS, Klee EW, Lincoln SE, Leon A, Pullambhatla M, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Wang C, Carter AB. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines: a joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2018;**20**(1):4–27.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines

- for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;**17**(5):405–423.
8. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M. Pathophysiology of glucocorticoid signaling. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2018;**79**(3):98–106.
 9. Vitellius G, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, Decoudier B, Guiochon-Mantel A, Lombes M, Delemer B; investigators of the MUTA-GR Study. Significant prevalence of *NR3C1* mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study. *Eur J Endocrinol*. 2018;**178**(4):411–423.
 10. Nicolaides NC, Charmandari E. Crousos syndrome: from molecular pathogenesis to therapeutic management. *Eur J Clin Invest*. 2015;**45**(5):504–514.
 11. Molnár Á, Patócs A, Likó I, Nyíró G, Rác K, Tóth M, Sárman B. An unexpected, mild phenotype of glucocorticoid resistance associated with glucocorticoid receptor gene mutation case report and review of the literature. *BMC Med Genet*. 2018;**19**(1):37.
 12. Al Argan R, Saskin A, Yang JW, D'Agostino MD, Rivera J. Glucocorticoid resistance syndrome caused by a novel NR3C1 point mutation. *Endocr J*. 2018;**65**(11):1139–1146.
 13. Charmandari E, Ichijo T, Jubiz W, Baid S, Zachman K, Chrousos GP, Kino T. A novel point mutation in the amino terminal domain of the human glucocorticoid receptor (hGR) gene enhancing hGR-mediated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;**93**(12):4963–4968.
 14. Santen RJ, Jewell CM, Yue W, Heitjan DF, Raff H, Katzen KS, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor mutations and hypersensitivity to endogenous and exogenous glucocorticoids. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;**103**(10):3630–3639.
 15. Kumar R, Thompson EB. Folding of the glucocorticoid receptor N-terminal transactivation function: dynamics and regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;**348**(2):450–456.
 16. Motlagh HN, Anderson JA, Li J, Hilser VJ. Disordered allostery: lessons from glucocorticoid receptor. *Biophys Rev*. 2015;**7**(2):257–265.
 17. Kim D-H, Wright A, Han K-H. An NMR study on the intrinsically disordered core transactivation domain of human glucocorticoid receptor. *BMB Rep*. 2017;**50**(10):522–527.
 18. Salamanova E, Costeira-Paulo J, Han K-H, Kim D-H, Nilsson L, Wright APH. A subset of functional adaptation mutations alter propensity for α -helical conformation in the intrinsically disordered glucocorticoid receptor tau1core activation domain. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj*. 2018;**1862**(6):1452–1461.
 19. Dahlman-Wright K, Almlöf T, McEwan IJ, Gustafsson JA, Wright AP. Delineation of a small region within the major transactivation domain of the human glucocorticoid receptor that mediates transactivation of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;**91**(5):1619–1623.
 20. Lavery DN, McEwan IJ. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. *Biochem J*. 2005;**391**(3):449–464.
 21. Giguère V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 1986;**46**(5):645–652.
 22. Dahlman-Wright K, Baumann H, McEwan IJ, Almlöf T, Wright AP, Gustafsson JA, Härd T. Structural characterization of a minimal functional transactivation domain from the human glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;**92**(5):1699–1703.
 23. Wallberg AE, Neely KE, Hassan AH, Gustafsson JA, Workman JL, Wright AP. Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain. *Mol Cell Biol*. 2000;**20**(6):2004–2013.
 24. Bohan SP, Yamamoto KR. Isolation of Hsp90 mutants by screening for decreased steroid receptor function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;**90**(23):11424–11428.
 25. Kakar M, Davis JR, Kern SE, Lim CS. Optimizing the protein switch: altering nuclear import and export signals, and ligand binding domain. *J Control Release*. 2007;**120**(3):220–232.
 26. Bouali N, Francou B, Bouligand J, Imanci D, Dimassi S, Tosca L, Zaouali M, Mougou S, Young J, Saad A, Guiochon-Mantel A. New *MCM8* mutation associated with premature ovarian insufficiency and chromosomal instability in a highly consanguineous Tunisian family. *Fertil Steril*. 2017;**108**(4):694–702.
 27. Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Trabado S, Lombès M. Three novel heterozygous point mutations of NR3C1 causing glucocorticoid resistance. *Hum Mutat*. 2016;**37**(8):794–803.
 28. Bouligand J, Delemer B, Hecart A-C, Meduri G, Viengchareun S, Amazit L, Trabado S, Fève B, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M. Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense

- mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PLoS ONE*. 2010; **5**(10):e13563.
29. RRID:AB_2687823, https://scicrunch.org/resolver/AB_2687823.
 30. RRID:AB_476693, https://scicrunch.org/resolver/AB_476693.
 31. RRID:AB_614946, https://scicrunch.org/resolver/AB_614946.
 32. RRID:AB_2556797, https://scicrunch.org/resolver/AB_2556797.
 33. Amazit L, Le Billan F, Kolkhof P, Lamribet K, Viengchareun S, Fay MR, Khan JA, Hillisch A, Lombès M, Rafestin-Oblin ME, Fagart J. Finerenone impedes aldosterone-dependent nuclear import of the mineralocorticoid receptor and prevents genomic recruitment of steroid receptor coactivator-1. *J Biol Chem*. 2015;**290**(36):21876–21889.
 34. RRID:AB_2633276, https://scicrunch.org/resolver/AB_2633276.
 35. Williams RG, Kandasamy R, Nickischer D, Trask OJ Jr, Laethem C, Johnston PA, Johnston PA. Generation and characterization of a stable MK2-EGFP cell line and subsequent development of a high-content imaging assay on the Cellomics ArrayScan platform to screen for p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol*. 2006;**414**:364–389.
 36. Raivio T, Palvimo JJ, Kannisto S, Voutilainen R, Jänne OA. Transactivation assay for determination of glucocorticoid bioactivity in human serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;**87**(8):3740–3744.
 37. Khan SH, Awasthi S, Guo C, Goswami D, Ling J, Griffin PR, Simons SS Jr, Kumar R. Binding of the N-terminal region of coactivator TIF2 to the intrinsically disordered AF1 domain of the glucocorticoid receptor is accompanied by conformational reorganizations. *J Biol Chem*. 2012;**287**(53):44546–44560.
 38. Carruthers CW, Suh JH, Gustafsson J-A, Webb P. Phosphorylation of glucocorticoid receptor tau1c transactivation domain enhances binding to CREB binding protein (CBP) TAZ2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;**457**(1):119–123.
 39. Khan SH, McLaughlin WA, Kumar R. Site-specific phosphorylation regulates the structure and function of an intrinsically disordered domain of the glucocorticoid receptor. *Sci Rep*. 2017;**7**(1):15440.
 40. Wang D, Wang Q, Awasthi S, Simons SS Jr. Amino-terminal domain of TIF2 is involved in competing for corepressor binding to glucocorticoid and progesterone receptors. *Biochemistry*. 2007;**46**(27):8036–8049.
 41. Russcher H, Smit P, van den Akker ELT, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SW, Koper JW. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;**90**(10):5804–5810.
 42. Feng J, Zheng J, Bennett WP, Heston LL, Jones IR, Craddock N, Sommer SS. Five missense variants in the amino-terminal domain of the glucocorticoid receptor: no association with puerperal psychosis or schizophrenia. *Am J Med Genet*. 2000;**96**(3):412–417.
 43. Scheuner MT, Peredo J, Benkendorf J, Bowdish B, Feldman G, Fleisher L, Mulvihill JJ, Watson M, Herman GE, Evans J. Reporting genomic secondary findings: ACMG members weigh in. *Genet Med*. 2015;**17**(1):27–35.
 44. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, Herman GE, Hufnagel SB, Klein TE, Korf BR, McKelvey KD, Ormond KE, Richards CS, Vlangos CN, Watson M, Martin CL, Miller DT. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics [published correction appears in *Genet Med*. 2017;**19**(4):484]. *Genet Med*. 2017;**19**(2):249–255.
 45. Kühlenbäumer G, Hullmann J, Appenzeller S. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat*. 2011;**32**(2):144–151.
 46. Vassy JL, Christensen KD, Schonman EF, Blout CL, Robinson JO, Krier JB, Diamond PM, Lebo M, Machini K, Azzariti DR, Dukhovny D, Bates DW, MacRae CA, Murray MF, Rehm HL, McGuire AL, Green RC; MedSeq Project. The impact of whole-genome sequencing on the primary care and outcomes of healthy adult patients: a pilot randomized trial. *Ann Intern Med*. 2017;**167**(3):159–169.
 47. Karbassi I, Maston GA, Love A, DiVincenzo C, Braastad CD, Elzinga CD, Bright AR, Previte D, Zhang K, Rowland CM, McCarthy M, Lapierre JL, Dubois F, Medeiros KA, Batish SD, Jones J, Liaquat K, Hoffman CA, Jaremko M, Wang Z, Sun W, Buller-Burckle A, Strom CM, Keiles SB, Higgins JJ. A standardized DNA variant scoring system for pathogenicity assessments in Mendelian disorders. *Hum Mutat*. 2016;**37**(1):127–134.
 48. Guillermin Y, Lopez J, Chabane K, Hayette S, Bardel C, Salles G, Sujobert P, Huet S. What does this mutation mean? The tools and pitfalls of variant interpretation in lymphoid malignancies. *Int J Mol Sci*. 2018;**19**(4):1251.
 49. Bell CJ, Dinwiddie DL, Miller NA, Hateley SL, Ganusova EE, Mudge J, Langley RJ, Zhang L, Lee CC, Schilkey FD, Sheth V, Woodward JE, Peckham HE, Schroth GP, Kim RW, Kingsmore SF. Carrier

- testing for severe childhood recessive diseases by next-generation sequencing. *Sci Transl Med.* 2011; **3**(65):65ra4.
50. Tabor HK, Auer PL, Jamal SM, Chong JX, Yu JH, Gordon AS, Graubert TA, O'Donnell CJ, Rich SS, Nickerson DA, Bamshad MJ; NHLBI Exome Sequencing Project. Pathogenic variants for Mendelian and complex traits in exomes of 6,517 European and African Americans: implications for the return of incidental results. *Am J Hum Genet.* 2014;**95**(2):183–193.
51. Xue W-Q, He Y-Q, Zhu J-H, Ma J-Q, He J, Jia W-H. Association of BRCA2 N372H polymorphism with cancer susceptibility: a comprehensive review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2014;**4**(1):6791.
52. Shearer AE, Kolbe DL, Azaiez H, Sloan CM, Frees KL, Weaver AE, Clark ET, Nishimura CJ, Black-Ziegelbein EA, Smith RJ. Copy number variants are a common cause of non-syndromic hearing loss. *Genome Med.* 2014;**6**(5):37.

4. Prolongement du travail et discussion

Au travers de ces deux articles, nous avons caractérisé 13 variants originaux du GR : 6 probables variants non délétères découverts en NGS et 7 mutations du GR (**Figure 21**), résumés dans le **tableau 4** ci-après.

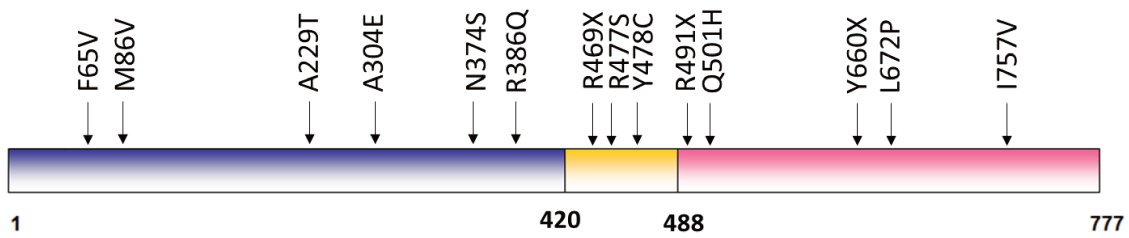


Figure 21 : Position des variants du GR identifiés par Sanger et NGS

	Résistance à l'action des GC	Localisation protéique	Expression protéique	Liaison à la DXM	Transfert cyto-nucléaire hormonal-induit	Liaison à l'ADN	Transactivation	Modélisation 3D
F65V M86V A229T A304E N374S R386Q	NON	NTD	Normale	NF	Normal à retardé	NF	Normale	NF
R477S	OUI	DBD	Normale	Comparable au GRWT	Retardé	Null	Absente	Perte de contact avec l'ADN
Y478C	OUI	DBD	Normale	Comparable au GRWT	Retardé	Retardée	↘	Déstabilisation du DBD
R491X	OUI	HR	Tronquée	Null	Pas de transfert	∅	Absente	NF
Q501H	+/-	HR	Normale	NF	Retardé	Normale (EMSA)	Normale	NF
Y660X	OUI	LBD	Diminuée (Dégradation)	Null	Pas de transfert	∅	Absente	NF
L672P	OUI	LBD	Diminuée (Dégradation)	Null	Pas de transfert	∅	Absente	Déstruction de l'hélice H8
I757V	OUI	LBD	Diminuée (Dégradation)	Null	Pas de transfert	∅	Absente	Déstruction de l'hélice H12

Tableau 4 : Résumé des caractéristiques clinique et fonctionnelles des différents variants du GR identifiés

NTD : Domaine N-terminal, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, LBD : Domaine de liaison au ligand, NF : Non Fait

Le domaine NTD du GR est un domaine très désorganisé et non modélisable, comme nous l'avons montré en introduction, et les variants découverts dans ce domaine devaient donc, pour 5 d'entre eux, être caractérisés fonctionnellement, d'après les prédictions de différents logiciels : les variants F65V, M86V, A229T, A304E et R386Q. Parmi les 6 variants identifiés, seul le variant R386Q n'avait jamais été décrit et n'était pas présent dans la base de données ExAC. Nous avons montré que ces variants n'avaient pas de retentissement majeur sur la signalisation dépendante du GR (expression protéique, navette cyto-nucléaire, transactivation, co-activation par SRC2). Il est toutefois très difficile de savoir si ces variants sont impliqués dans un état d'hypersensibilité aux GC car nous n'avons que très peu de données cliniques et biologiques sur les patients. Il est également très difficile de conclure sur une augmentation de la capacité de transactivation des gènes cibles de certains de ces variants. Certes, la plupart des variants possèdent une capacité de transactivation supérieure à celle du GR sauvage, mais il n'existe pas de différence statistiquement significative de l'EC50 des différents variants par rapport au GR sauvage. Comme attendu, tous les variants sont transférés dans le noyau en présence de DXM et voient leur activité transcriptionnelle significativement augmentée en présence du coactivateur transcriptionnel SRC2 en dehors du variant N374S.

L'exploration clinique joue un rôle primordial pour pouvoir interpréter les résultats retrouvés en NGS. Un grand nombre de données est collecté par cette nouvelle technique et de nouveaux variants sont constamment décrits. Or, comme nous l'avons démontré dans l'article précédent (Foussier*, Vitellius* et al. 2019) ainsi que par d'autres auteurs (Roy et al. 2018; Karbassi et al. 2016), les logiciels de prédiction ne sont pas toujours fiables. En l'occurrence, six des variants étudiés étaient prédits comme potentiellement pathogéniques. Néanmoins, notre étude a finalement démontré qu'aucun ne semble responsable d'une modulation de la sensibilité aux GC. De plus, récemment lors du congrès 2019 de l'ECE (European Congress of Endocrinology), l'équipe du Professeur Bertherat (Cochin) a retrouvé dans une population de 389 patients avec une hyperplasie bilatérale des surrénales, la présence du variant F65V chez 2 patients par NGS. La vigilance reste donc de mise dans le contexte de la découverte de nouveaux variants par NGS et la caractérisation fonctionnelle semble être le meilleur moyen sans équivoque pour évaluer la pathogénicité d'un variant génétique pour le gène *NR3C1*.

De manière intéressante, la caractérisation fonctionnelle de certains mutants/variants peut nous apporter des données importantes sur la fonctionnalité de certains acides aminés essentiels à la transactivation du GR.

La mutation de l'Arg⁴⁷⁷ située dans le DBD a été décrite chez 3 patients porteurs de mutations inactivatrices du GR (Molnár et al. 2018; Ruiz et al. 2001; Charmandari et al. 2006) et chez la souris (Banuelos, Shin, et Lu 2015). La caractérisation fonctionnelle que nous avons réalisée *in vitro* a montré une absence de liaison de l'ADN par ce mutant. Cette arginine n'est pas décrite comme associée à la boîte P impliquée dans la reconnaissance des GRE sur l'ADN, ni associée à la boîte D, impliquée dans la dimérisation du récepteur mais semble toutefois indispensable à l'activité du récepteur (Danielsen et al, 1989). Nous avons montré en modélisation tri-dimensionnelle que cette arginine établissait des liaisons hydrogènes avec la Ser⁴⁴⁰, acide aminé essentiel de la boîte P et que le remplacement de l'arginine par la sérine chez la patiente 1 que nous avons décrite (Vitellius et al. 2016) est responsable de la perte de ces liaisons hydrogènes et déstabilise probablement la boîte P.

Par ailleurs, la découverte de nouveaux mutants a également mis en évidence deux acides aminés importants dans le LBD, impliqués dans la fonctionnalité du GR, la leucine en position 672 et l'isoleucine 757, première fois que ces mutations du GR sont décrites. Nous avons montré que la Leu⁶⁷², située dans l'hélice H8, en dehors des acides aminés associés à la région AF2 est finalement très importante pour la stabilité du récepteur en créant des contacts très étroits avec l'hélice H1 et les protéines co-chaperons du GR (Xu et al. 1998). Nous avons montré qu'en inhibant le protéasome par le MG-132, la quantité de GR mutant L672P était équivalente à celle du contrôle suggérant une dégradation accélérée de ce mutant, probablement dûe à la perte de sa liaison aux protéines chaperons que nous aurions pu mettre en évidence par des expériences d'immunoprécipitation (données non montrées). L'Ile⁷⁵⁷ semble également être un acide aminé très important dans l'activité du GR. Elle est située dans l'hélice H12, qui joue un rôle clé de repositionnement après liaison au ligand agoniste et est très conservée entre les espèces et les récepteurs nucléaires. Elle établit des contacts très étroits avec les acides aminés de l'hélice H11.

Plusieurs mutants publiés dans la littérature sont responsables d'un effet dominant négatif sur le GR sauvage (Karl et al. 1996; Charmandari, Chrousos, et al. 2005; Charmandari et al. 2007; Vottero et al. 2002). L'absence d'effet dominant négatif des mutants, que nous avons étudié nous interroge sur le mécanisme responsable de la résistance aux GC. Pour les mutants n'ayant aucune activité transcriptionnelle, on pourrait plus facilement envisager la traduction de ce phénomène *in vivo* par l'existence d'un seul allèle GR fonctionnel responsable d'une résistance aux GC. En revanche, les explications sont plus complexes pour les mutants ayant une activité transcriptionnelle conservée. Concernant le mutant Y478C, nous avons montré une EC50 statistiquement plus élevée que celle du GR sauvage ainsi qu'une diminution du recrutement des promoteurs des gènes cibles expliquant également la résistance aux GC découverte chez le patient porteur hétérozygote de la mutation. En revanche, l'étude *in vitro*

du mutant Q501H est surprenante. Ce mutant semble transactiver un gène cible du GR de manière plus importante que le GRWT, avec un léger retard au transfert cyto-nucléaire. Nous avons exclu la transfection *in vitro* d'une quantité de plasmide plus importante en s'appuyant sur les données de WB. La présence de la mutation sur le hGR β (hGR β Q501H) semble rendre compte d'une perte de l'effet dominant négatif du hGR β exercé sur le hGR α pouvant être en accord avec l'absence d'anomalie clinico-bio-hormonale présente chez la patiente.

Nous avons pu obtenir des fibroblastes cutanés de certains patients porteurs de mutations inactivatrices du GR, constituant un modèle *ex vivo* avec une expression biallélique du GR, à partir des allèles sauvages et mutés. Nous avons donc étudié les fibroblastes de 2 patients : le patient porteur de la mutation hétérozygote R491X et la patiente porteuse de la mutation hétérozygote Q501H dont les résultats vous seront présentés dans la partie II des résultats.

Partie 2 :
Résultats de l'étude nationale française
Muta-GR

1. Résultats du Protocole Hospitalier de Recherche Clinique Muta-GR

Le propositus, âgé de 46 ans (Bouligand et al. 2010), avait été adressé au CHU de Reims dans le service d'Endocrinologie du Professeur Delemer dans le cadre d'un bilan d'HTA associé à une hyperplasie nodulaire bilatérale des surrénales de découverte fortuite, scanner effectué dans le cadre de l'exploration d'un lumbago. L'HTA avait été découverte en 2003 et le scanner abdominal (**Figure 22**) retrouvait une lésion nodulaire de la surrénale gauche mesurée à 34 x 21 mm avec une densité spontanée de 9 unités Housfields (UH), et à droite un nodule de 25 x 19 mm avec une densité spontanée à 5 UH et un autre au niveau du corps de la surrénale droite de 18 x 12 mm avec une densité spontanée à 9 UH, suggérant la bénignité de ces nodules (Fassnacht et al. 2016). Dans les antécédents de ce patient, on retrouvait deux infarctus du myocarde, dont un à l'âge de 43 ans traité par angioplastie. Lors du premier examen clinique, le patient pesait 77 kg, avec un IMC à 26.

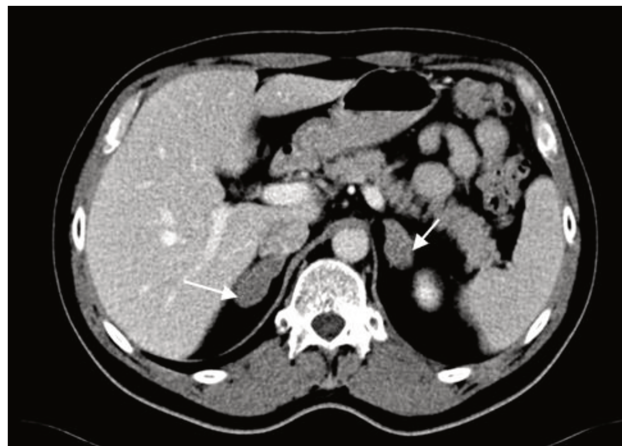


Figure 22 : Coupe axiale tomographique après injection de produit de contraste de l'abdomen du patient porteur de la mutation hétérozygote R469X.

Présence de surrénales hyperplasiques et nodulaires. Les flèches blanches indiquent la localisation des glandes surrénales.

Le bilan biologique réalisé retrouvait un hypercortisolisme associant un CLU élevé à deux fois aux limites supérieures de la normalité associé à une concentration d'ACTH non-effondrée et une absence de freinage de la sécrétion de cortisol lors d'un test de freinage minute à la DXM. Dans le cadre de la suspicion de maladie de Cushing, une IRM hypophysaire a été réalisée qui retrouvait une hypophyse de taille normale sans adénome visualisé. De manière

intéressante, l'hypercortisolisme biologique contrastait avec une absence de signe clinique de syndrome de Cushing.

Le bilan biologique d'exploration de l'HTA montrait que la kaliémie était dans les limites inférieures de la normale à 3,5 mmol/L (3,5-5), associée à une concentration de rénine plasmatique indétectable et une concentration d'aldostérone inférieure à la normale (<27 pg/mL). L'HTA à rénine basse est décrite dans le cadre de pseudohyperaldostéronisme fonctionnel regroupant le syndrome de Liddle secondaire à des mutations du canal épithélial à sodium rénal ou encore le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes (AME) secondaire à des mutations de l'enzyme rénale 11 β -HSD2 (Schild 1996; New et al. 1977). Le dosage plasmatique de DOC, habituellement décrit chez les patients porteur de mutations inactivatrices du GR comme responsable de l'HTA par activation du MR par la DOC, était normal chez ce patient, à 40 pg/mL pour des valeurs de références entre 40 et 200 pg/mL, suggérant un autre mécanisme responsable de l'HTA.

Un séquençage du GR a été réalisé suite à la suspicion d'un syndrome de résistance aux GC révélant la première mutation hétérozygote non-sens du récepteur des GC, la mutation R469X, situé dans l'exon 4 (**Figure 23**).

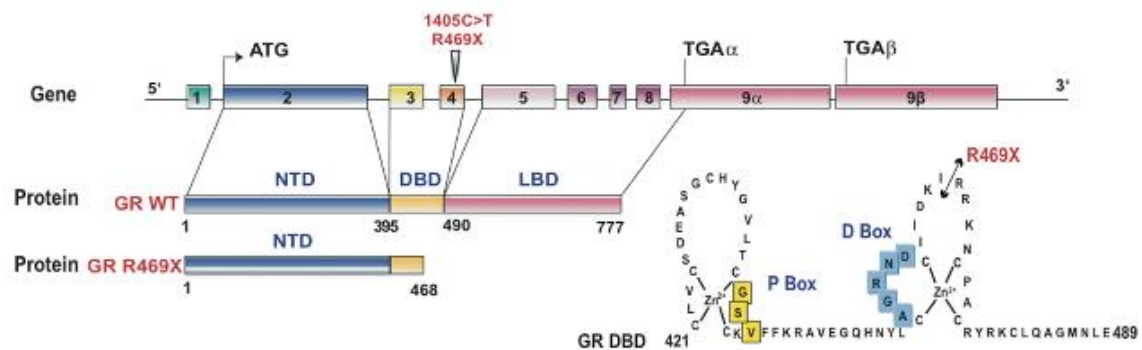


Figure 23 : Localisation de la mutation R469X sur le gène *NR3C1*.

issu de l'article de Bouligand et al. ,2010 (Bouligand et al. 2010).

La caractérisation fonctionnelle a montré *in vitro* que le mutant R469X n'avait aucune capacité transcriptionnelle car il était incapable de lier les GC. Les fibroblastes du patient, porteur de la mutation à l'état hétérozygote ont pu être obtenus et des expériences *ex vivo* ont pu être réalisées et ont montré une diminution de 50% des transcrits et de la protéine GR sauvage avec une absence d'expression du messenger et de la protéine mutée, révélant l'existence d'un mécanisme de NMD (Bouligand et al. 2010). Ce mécanisme NMD constitue un système de contrôle spécifique présent dans les cellules, qui élimine les ARNm aberrants, situés en dehors du dernier exon codant et présentant un codon stop prématuré (Noensie et al, 2001).

L'utilisation d'un inhibiteur de ce mécanisme, l'émétine, a permis le recouvrement de l'allèle muté confirmant ce mécanisme de dégradation.

Le propositus présentait plusieurs caractéristiques non habituelles du syndrome de résistance aux GC : une concentration d'ACTH sérique inappropriée, à 12 pg/mL, concentration normale contrastant avec les premiers patients décrits qui avaient des concentrations d'ACTH très élevées (Vingerhoeds et al, 1976), une HTA mais des concentrations de DOC normales et une hyperplasie bilatérale des surrénales. Cette présentation clinique inhabituelle suggérait un mécanisme physiopathologique différent de celui décrit initialement dans les syndromes de résistance aux GC, qui associent des concentrations élevées d'ACTH, considérées comme responsables de l'hyperplasie surrénalienne et élévation de la DOC et de la cortisostérone plasmatiques, ligands agonistes du MR expliquant l'HTA.

En 2008, Michailidou et al (Michailidou et al. 2008) ont publié un modèle de souris porteuses d'un seul allèle GR fonctionnel (GR^{+/-}) mimant un phénotype d'haploinsuffisance du GR. Ces souris avaient une hyperplasie bilatérale des surrénales définie par un poids des surrénales plus élevé par rapport aux souris contrôles, associée à une concentration sérique d'ACTH normale, c'est-à-dire un phénotype similaire au propositus porteur de la mutation hétérozygote R469X.

L'ensemble de ces données, suggérant une implication de l'haploinsuffisance du GR, secondaire à des mutations inactivatrices du GR dans l'hyperplasie bilatérale des surrénales, a été à l'origine du dépôt et de l'obtention d'un PHRC Muta-GR coordonné par le Professeur Brigitte DELEMER et le Docteur Marc LOMBES (ClinicalTrials.gov ; Identifiant : NCT02810496). Il s'agit d'une étude nationale multicentrique, prospective conduite d'août 2012 à octobre 2016 dont l'objectif principal était d'évaluer la prévalence des mutations inactivatrices du GR dans une population de patients présentant une hyperplasie bilatérale des surrénales associée à un hypercortisolisme biologique et/ou une HTA sans signe clinique de syndrome de Cushing. Les objectifs secondaires étaient de préciser les polymorphismes fonctionnels connus du GR dans cette cohorte de patients, de caractériser fonctionnellement les mutations originales identifiées et d'établir une corrélation génotype-phénotype. Cent patients ont été recrutés dans ce PHRC.

Dans ce travail, nous avons montré que :

- la prévalence des mutations inactivatrices du GR dans l'hyperplasie bilatérale des surrénales n'est pas aussi rare que ce que l'on pouvait initialement penser et la pathologie de syndrome de résistance aux GC semble sous-diagnostiquée.

- l'association de signes clinico-biologiques tels qu'une résistance aux GC associée à une kaliémie <4 mmol/L et un dosage d'aldostérone plasmatique normal ou bas, devrait conduire à rechercher des mutations *NR3C1* chez ces patients ainsi que leur famille.

- les patients porteurs des mutations inactivatrices du GR décrits dans cette étude ont un phénotype moins sévère que les premiers patients décrits, ce qui incite à ne pas seulement rechercher des mutations inactivatrices du GR dans la population de patients avec une concentration d'ACTH élevée.

Pour finir nous avons mis en évidence un phénotype de pseudohyperaldostéronisme (une kaliémie normale basse associée à des concentrations de rénine et/ou d'aldostérone basses) chez les patients du PHRC, associé ou non à une HTA. Les patients présentant une HTA ont tous les signes de pseudohyperaldostéronisme alors que certains patients mutés ne présentent que des altérations du système rénine-angiotensine aldostérone isolées.

Nous allons dans un premier temps présenter les résultats du PHRC Muta-GR publiés dans l'EJE (Vitellius, Trabado, Hoeffel, et al. 2018), les résultats de l'étude des fibroblastes de 2 patients : le patient porteur de la mutation hétérozygote R491X et la patiente porteuse de la mutation hétérozygote Q501H, et pour finir l'explication potentielle du mécanisme responsable du pseudohyperaldostéronisme présent chez les patients mutés.

Article 3 : Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia : results of the French MUTA-GR Study

Vitellius G, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, Decoudier B, Guiochon-Mantel A, Lombes M*, Delemer B* and investigators of Muta-GR

Eur J Endocrinol, 2018

Significant prevalence of *NR3C1* mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study

Géraldine Vitellius^{1,2}, Séverine Trabado^{1,3}, Christine Hoeffel⁴, Jérôme Bouligand^{1,3}, Antoine Bennet⁵, Frederic Castinetti⁶, Bénédicte Decoudier², Anne Guiochon-Mantel^{1,3}, Marc Lombes^{1,7,*} and Brigitte Delemer^{2,*} on behalf of investigators of the MUTA-GR Study[†]

¹INSERM UMR_S U1185, Fac Med Paris Sud, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France, ²Service d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Hôpital Robert Debré, CHU Reims, Reims, France, ³Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France, ⁴Service de Radiologie, Hôpital Robert Debré, CRESTIC, CHU Reims-URCA, Reims, France, ⁵Service d'Endocrinologie, Maladies Métaboliques et Nutrition, CHU Toulouse, Toulouse, France, ⁶Service d'Endocrinologie, CHU de la Timone, Marseille, France, and ⁷Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France

*(M Lombès and B Delemer contributed equally to this work)

[†](Details of investigators who participated in the MUTA-GR study is provided in the Acknowledgements sections)

Correspondence should be addressed to M Lombès or B Delemer
Email
marc.lombes@u-psud.fr or
bdelemer@chu-reims.fr

Abstract

Background: Recently discovered mutations of *NR3C1* gene, encoding for the GR, in patients with glucocorticoid resistance and bilateral adrenal incidentalomas prompted us to investigate whether GR mutations might be associated with adrenal hyperplasia.

Objective: The multicenter French Clinical Research Program (Muta-GR) was set up to determine the prevalence of GR mutations and polymorphisms in patients harboring bilateral adrenal incidentalomas associated with hypertension and/or biological hypercortisolism without clinical Cushing's signs.

Results: One hundred patients were included in whom *NR3C1* sequencing revealed five original heterozygous GR mutations that impaired GR signaling *in vitro*. Mutated patients presented with mild glucocorticoid resistance defined as elevated urinary free cortisol (1.7 ± 0.7 vs 0.9 ± 0.8 upper limit of normal range, $P=0.006$), incomplete 1 mg dexamethasone suppression test without suppressed 8-AM adrenocorticotrophin levels (30.9 ± 31.2 vs 16.2 ± 17.5 pg/mL) compared to the non-mutated patients. Potassium and aldosterone levels were lower in mutated patients (3.6 ± 0.2 vs 4.1 ± 0.5 mmol/L, $P=0.01$, and 17.3 ± 9.9 vs 98.6 ± 115.4 pg/mL, $P=0.0011$, respectively) without elevated renin levels, consistent with pseudohypermineralocorticoidism. *Ex vivo* characterization of mutated patients' fibroblasts demonstrated GR haploinsufficiency as revealed by below-normal glucocorticoid induction of *FKBP5* gene expression. There was no association between GR polymorphisms and adrenal hyperplasia in this cohort, except an over-representation of *BclI* polymorphism.

Conclusion: The 5% prevalence of heterozygous *NR3C1* mutations discovered in our series is higher than initially thought and encourages GR mutation screening in patients with adrenal incidentalomas to unambiguously differentiate from Cushing's states and to optimize personalized follow-up.

European Journal of
Endocrinology
(2018) 178, 411–423

Introduction

Glucocorticoids are fundamental hormones that regulate various biological functions involved in development, metabolism, inflammatory processes and stress. Their

actions are mediated by the glucocorticoid receptor (GR), an intracellular receptor protein that functions as ligand-activated transcription factor (1). Human GR

(hGR), encoded by the *NR3C1* gene (MIM#138040), located in the chromosome 5, comprises 10 exons. Alternative splicing of the hGR gene in exon 9 generates two homologous receptor isoforms: α and β (2). Exon 2 encodes for the N-terminal domain and exons 3 and 4 encode for the DNA-binding domain (DBD). Exons 5–9 encode for the ligand-binding domain (LBD). *NR3C1* loss-of-function mutations have been associated with a glucocorticoid resistance syndrome (MIM#615962). Moreover, among many *NR3C1* polymorphisms described to date, some were associated with increased (N363S, *BclI*) or decreased (ER22/23EK, *BclI*, 9 β), obesity and metabolic syndrome (N363S, *BclI*, 9 β) (3, 4).

Twenty-four loss-of-function germinal mutations in *NR3C1* have been reported and shown to impair intracellular GR signaling (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15). Fifty percent of mutated probands presented with hypertension, frequently associated with hypokalemia, while the majority of mutated women presented with hirsutism. GR mutation carriers had elevated or normal adrenocorticotrophin (ACTH) levels associated with high urinary free cortisol (UFC) and lacked negative glucocorticoid feedback loop on the hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis.

We recently discovered the first nonsense heterozygous mutation of human *NR3C1* (MIM #615962), R469X, in a context of bilateral adrenal hyperplasia incidentally discovered (16). The proband displayed no Cushing's syndrome signs but had high blood pressure with hypokalemia. Hormonal evaluations revealed a biological hypercortisolism with normal ACTH level. Functional characterization demonstrated GR haploinsufficiency. Moreover, in mouse models, Michailidou and coworkers (17) had shown that heterozygous GR^{+/-} exhibited bilateral adrenal hyperplasia but normal plasma ACTH levels. Taken together, these data led us to hypothesize that impairment in GR signaling could be related to adrenocortical hyperproliferation and/or hyperplasia.

Bilateral adrenal incidentalomas represent 15–20% of adrenal incidentalomas (18, 19, 20). This prevalence drastically increases with aging. The best known causes of bilateral adrenal masses are related to macronodular adrenal hyperplasia, potentially regulated by aberrant G protein-coupled receptors (21), familial pheochromocytoma, primary hyperaldosteronism (22), *ARMC5* gene mutation (23, 24), 21-hydroxylase deficiency, multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1), infectious diseases, non-functioning tumor or metastatic diseases (18). However, a direct relationship between adrenal incidentalomas and

altered GR signaling has never been investigated thus far nor evoked in recent published guidelines (25, 26).

In the present study, we hypothesized that GR mutations might represent a novel genetic cause of adrenocortical proliferation in the context of autonomous glucocorticoid secretion. A French National, Hospital Clinical Research Program (PHRC), Muta-GR, was set up to determine the prevalence of *NR3C1* mutations in a cohort of patients presenting with bilateral adrenal incidentalomas combined with high blood pressure (HBP) and/or biological hypercortisolism without Cushingoid features. The second aim was at evaluating common GR polymorphisms frequency in our series associated with adrenal hyperplasia compared to the general population. We discovered five novel heterozygous *NR3C1* mutations, among which three have been already functionally characterized (16, 27). All reported mutations impaired GR signaling either by glucocorticoid or DNA-binding defects leading to a clear-cut GR haploinsufficiency. The relatively high prevalence of *NR3C1* mutations in our cohort emphasizes the importance of GR genetic screening in selected patients enabling their appropriate management and to optimize their follow-up strategies.

Patients and methods

Study protocol

The study referred to as Muta-GR (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02810496) is a multicenter and transversal PHRC study. The primary objective of this study was to evaluate the prevalence of *NR3C1* mutations in patients with bilateral adrenal incidentalomas. To refine the rate of GR genetic alterations, patients with hypertension and/or biological hypercortisolism without Cushing's syndrome signs were selected. Inclusion criteria were the presence of incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia in patients with no overt signs of Cushing's syndrome. Adrenal imaging was performed in patients for unrelated reasons. Adrenal hyperplasia was radiologically characterized and defined using morphological and volumetric criteria. To date, objective characteristics of adrenal hyperplasia are only poorly specified. In the present study, adrenal hyperplasia was defined according to three main criteria: adrenal limb (medial and lateral) >5 mm (28), adrenal volume above reference values in the general population (as referred in Carsin *et al.* (29)) or the presence of adrenal nodule >10 mm. The presence of hypertension was defined as a systolic blood pressure (SBP) >140 mm Hg, diastolic blood pressure (DBP) \geq 90 mmHg

and/or patients under any current antihypertensive therapy. Hypercortisolism was assessed based on either high UFC (above reference values or upper limit of normal range (ULN)), midnight serum cortisol >50 nmol/L (30) or serum 8-AM cortisol >50 nmol/L after 1 mg dexamethasone (DXM) suppression test (1 mg DST). Nine patients had UFC above ULN, 23 had cortisol >50 nmol/L after 1 mg DST while 58 had midnight serum cortisol >50 nmol/L. Cushing's syndrome signs were evaluated by clinician endocrinologists (thin skin, hirsutism, easy bruising, faciotruncal adiposity and amyotrophy). We excluded patients with clinical Cushing's syndrome, current cancer, age under 18 years or without written patients' consent.

The study protocol conformed to the ethics guidelines in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Comité de Protection des Personnes, CPP Est III on Aug 12, 2011.

Patients

One hundred twenty-seven patients were enrolled between Aug 2012 and Oct 2016 in twenty endocrinology departments of French University Hospitals (see the list of investigators).

All investigators filled out forms listing sex, birth date, weight (kg), height (cm), SBP, DBP (mmHg) and cardiac disease (existence of heart failure or coronaropathy), dyslipidemia, current antihypertensive, anti-diabetic or anti-cholesterol medications. Body mass index (BMI) was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters.

Biochemical and hormonal analyses were collected from each center: kalemia, creatininemia, creatinuria, fasting glycaemia (8-AM), glycated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol (g/L), HDL cholesterol (g/L), LDL cholesterol (g/L), UFC, 8-AM and midnight plasma cortisol, cortisol after 1 mg DST, 8-AM ACTH level, plasma aldosterone and renin concentrations in supine position.

Imaging study

Multidetector row computed tomography (MDCT) examinations were performed in each different institution (see the list of investigators). Protocols for the acquisition of images covering the abdomen were variable in terms of intravenous administration of iodinated contrast agent and also in terms of scanning parameters, but they always included thin slices covering the abdomen. Anonymized MDCT data were transferred

to a dedicated workstation equipped with Myrian 64 Expert VL1.15.0 software (Intrasense, Montpellier, France). The maximum width of the gland (defined as the maximum width perpendicular to the long axis of the body gland, at the junction of adrenal limbs and the body) and width of the adrenal limbs (defined as the maximum thickness of the medial and lateral limbs of the gland perpendicular to the long axis of the limb) were measured as previously described by Vincent *et al.* (31). The presence of adrenal nodules >10 mm, their precise size, attenuation when recordable and degree of enhancement were noted. Nodules suspicious for non-adenomas were excluded from the study, on the basis of the consensual criteria for the diagnosis of adenoma. Adrenal gland volume was calculated according to Carsin-Vu (29), on the same workstation. The adrenal contour used for volume calculation was traced semi-automatically for all patients by one investigator, after an intense training session with an expert radiologist. The software then automatically calculated adrenal volume by summing the area on each slice. Care was taken to exclude adjacent fat. Total adrenal volume (TAV) was determined as the sum of the right and left adrenal volume measurements and expressed in cm³.

DNA analysis

Each blood sample was sent to University Hospital of Kremlin Bicêtre. Genomic DNA was extracted from white blood cells. The entire coding regions of the hGR α and the hGR β were amplified and sequenced by Sanger method with primers previously described (16). We also examined some GR SNPs: rs6189, rs6190, rs10482622, rs6195, rs41423247, rs6188 and rs6196.

Fibroblast culture

After skin biopsy, primary cultures of patients' fibroblasts were grown at 37°C with 5% CO₂ in DMEM High Glucose (4.5 g/L) (Life Technology), 2 mM glutamine, 2 mM Hepes (GIBCO), 1 mM sodium pyruvate (GIBCO), 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (GE Healthcare) and 15% fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, France).

RT-real-time qPCR

Patients' fibroblasts were washed once with ice-cold PBS. Total RNA was extracted with the TRI-reagent (Molecular Research Center, Inc., Euromedex, Mundolsheim, France), according to the manufacturer's recommendations. Total

RNA extraction, reverse transcription and real-time qPCR were performed essentially as previously described (32). cDNA samples were amplified by real-time qPCR by using the QuantStudio6 Flex System (Life Technologies). All samples were quantified in duplicate. Relative expression in a given sample was normalized to the internal reference rRNA 18S values, where the control condition values are arbitrarily set at 100%. Results are expressed as means \pm S.E.M.

Primer design for RT-qPCR assays

Primer pairs encompassing the targeted regions were designed by using NCBI's software Primer BLAST. Primers were provided from Eurogentec (www.eurogentec.com), purified by the selective precipitation optimized process (SePOP), desalted and delivered at 100 μ M concentration in water. Primer sequences were as follows: h18S Forward: GTG CAT GGC CGT TCT TAG TTG, Reverse: TGA ATG CCA CAT CTC TGC AGT; hFKBP5 Forward: CCG GAG AAC CAA ACG GAA A, Reverse: TGA ATG CCA CAT CTC TGC AGT.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm S.D. in tables and means \pm S.E.M. in figures. Statistical analyses were performed with Prism 5 software (GraphPad Software). Comparison of continuous variables among different groups was performed using Mann-Whitney *U* tests or Fisher *t* tests for categorical variables. *P* values of less than 0.05 were considered significant.

Results

Clinical, radiological and biochemical characteristics of eligible patients

One hundred and twenty-seven patients were initially enrolled. Eighteen patients were excluded after analysis of the MDCT by the radiologist because the abnormalities in terms of size and/or volume of the gland or of the presence of a macronodule were not bilateral. Nine patients were also excluded since they had neither hypertension nor biological hypercortisolism. One hundred patients were finally included in this study. Genetic analysis revealed five original heterozygous *NR3C1* mutations (see flow chart in Fig. 1).

Characteristics of all included patients are reported in Table 1. Among eligible patients, mean age was

64.2 \pm 9.2 years with a sex ratio close to 1. More than eighty-seven percent of these patients had hypertension, most of them (79%) had an antihypertensive therapy. Patients had a high BMI (29.8 \pm 6.2 kg/m²). Thirty-four percent of the patients presented with diabetes. Twenty-two percent of the patients exhibited cardiac diseases (heart failure, coronary deficiency, coronary artery disease). Total cholesterol was in the normal range with normal HDL cholesterol and LDL cholesterol levels. Thirty-four patients had elevated UFC above ULN, while 40 patients had plasma cortisol levels >50 nmol/L after 1 mg DST. Fourteen patients had both abnormalities while among them, 9 patients had also normal or high ACTH levels and 5 patients had low ACTH levels (<10 pg/mL), suggesting biological autonomous hypercortisolism.

All patients had bilateral hyperplastic adrenal glands with high average volumes of right and left adrenals, measured at 10.2 and 13.4 cm³, respectively. Hyperplasia was due to either lateral or medial limb >5 mm or adrenal adenomas >10 mm (Fig. 2) or right or left adrenocortical volumes above normal range (Table 1). Forty eight percent of patients had right adrenal hyperplasia while 75% had left adrenal hyperplasia, 71% had right nodular adrenal and 81% had left nodular adrenal.

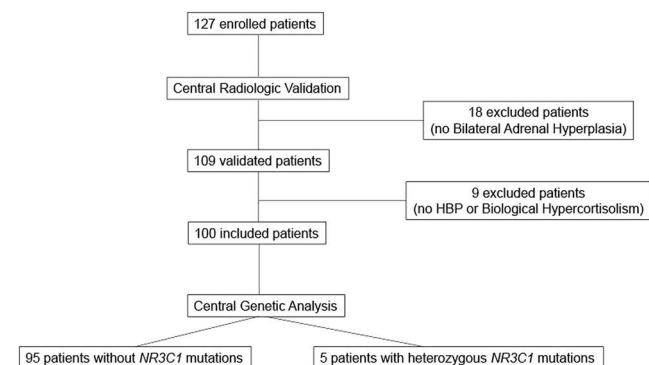


Figure 1

Flow chart of the study design. 127 patients were initially enrolled. After standardized examination of MDCT by an expert radiologist (CHU Reims), 18 patients were excluded because they had no bilateral adrenal incidentalomas. Nine patients had no clinical or biological inclusion criteria: neither hypertension (HBP) nor biological hypercortisolism. One hundred patients were finally included in the Muta-GR study. Centralized genetic analysis (CHU Bicêtre) identified 5 original heterozygous *NR3C1* mutations. HBP, high blood pressure; *NR3C1* gene encoding for the human glucocorticoid receptor (GR).

Table 1 Basal characteristics of 100 included patients.

	n (data)	All patients	Normal range
Clinical			
Age (years)	100	64.2 ± 9.2	
Sex M/W	100	52 (52.0%)/48 (48.0%)	
Hypertension	100	87 (87.0%)	
Antihypertensive treatment	100	79 (79.0%)	
BMI (kg/m ²)	98	29.8 ± 6.2	<25
Waist circumference (cm): men	15	104.7 ± 13.7	<94
Waist circumference (cm): women	15	100.7 ± 19.6	<80
Diabetes	100	34 (34.0%)	
Cardiac disease	100	22 (22.0%)	
Biological			
Kalemia (mmol/L)	95	4.1 ± 0.5	3.5–5
Fasting glycaemia (mmol/L)	82	6.2 ± 2.1	<7.8
HbA1c (%)	68	6.5 ± 1.2	<6.5
Total cholesterol (g/L)	89	1.9 ± 0.4	<2
HDL cholesterol (g/L)	86	0.5 ± 0.2	>0.45
LDL cholesterol (g/L)	85	1.1 ± 0.4	<1
Hormonology			
UFC (>N)	93	0.9 ± 0.8 N	<1
8-AM cortisol (nmol/L)	94	448 ± 218	248–635
Midnight cortisol (nmol/L)	64	160 ± 145	<50
8-AM ACTH (pg/mL)	91	17.0 ± 18.6	10–50
Cortisol after 1 mg DXM test (nmol/L)	65	104 ± 126	<50
Radiology			
Right adrenal volume (cm ³)	96	10.2 ± 5.7	2.5–5.1
Left adrenal volume (cm ³)	94	13.4 ± 6.7	2.9–6.1
Total adrenal volume (cm ³)	94	23.6 ± 10.5	5.7–11.1
Right adrenal hyperplasia	100	48 (48.0%)	
Left adrenal hyperplasia	100	78 (75.7%)	
Bilateral hyperplasia	100	48 (48.0%)	
Bilateral nodular	100	21 (21%)	
Left hyperplasia and right nodular	100	20 (20.0%)	
Left hyperplasia and elevated right adrenal volume	100	26 (26.0%)	
Right nodule >10mm	100	71 (71%)	
Left nodule >10mm	100	81 (81%)	

Clinical, biochemical, hormonal, radiological features of the 100 included patients.

BMI, body mass index; DST, dexamethasone suppression test; HbA1C, glycated hemoglobin; HDL, high density level; LDL, low density level; M/W, men/women; UFC, 24-h urinary free cortisol; ULN, upper limit of normal range.

Five heterozygous *NR3C1* mutations

Five original heterozygous *NR3C1* mutations were discovered in our series. As illustrated in Fig. 3, three patients harbored heterozygous missense mutations:

R477S (arginine (R) to serine (S) substitution at amino-acid position 477) located in the exon 4 encoding for the DBD, Q501H (glutamine (Q) to histidine (H) substitution at amino-acid position 501 in the exon 5) and L672P



Normal adrenal glands



Bilateral adrenal hyperplasia



Thin bilateral nodular adrenal

Figure 2

Radiological examples of adrenal bilateral hyperplasia. MDCT examinations. Left panel: normal adrenal glands. Bilateral adrenal hyperplasia (middle panel) and thin adrenal limb with bilateral macroadenoma (right panel) are presented. White arrows indicate the position of adrenal glands.

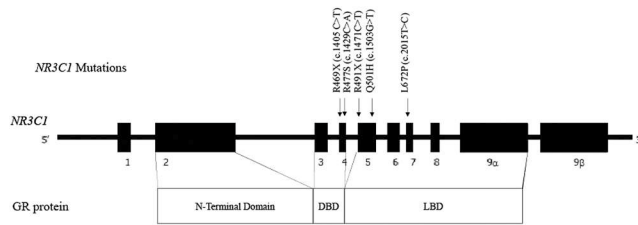


Figure 3

NR3C1 mutations identified. Localization of the 5 heterozygous GR mutations on the *NR3C1* gene with schematic representation of the exon composition. Two mutations are located in the DBD, R469X (arginine (R) to stop (X) substitution at amino-acid position 469), R477S (arginine (R) to serine (S) substitution at amino-acid position 477) and 3 mutations are located in the ligand-binding domain (LBD), R491X (arginine (R) to stop (X) substitution at amino-acid position 491), Q501H (glutamine (Q) to histidine (H) substitution at amino-acid position 501), L672P (leucine (L) to proline (P) substitution at amino-acid position 672).

(leucine (L) to proline (P) substitution at amino-acid position 672 in the exon 7) located in the LBD. Two patients carried heterozygous nonsense mutations: R469X (arginine (R) to stop (X) substitution at amino-acid position 469 in the exon 4) located in the DBD and R491X (arginine (R) to stop (X) substitution at amino-acid position 491 in the exon 5), located in the LBD. Functional *in vitro* characterization of R469X, R477S and L672P have already been reported and revealed impairment in GR signaling for all GR mutants (16, 27). Collectively, this indicates a global prevalence of GR mutations of 5% among 100 included patients.

The clinical, biological, hormonal and radiological characteristics of these mutated patients were compared to those of non-mutated patients (Table 2). Mutated patients were younger (53.2 ± 7.7 years old, means \pm s.d., $P=0.007$), but only 2 mutated patients out of five (40%) had hypertension compared to 89.5% of the non-mutated patients ($P=0.02$). The percentage of cardiovascular events was not different between non-mutated and mutated patients, likewise for cardiac risk factors (diabetic features, BMI and LDL cholesterol), except for HDL cholesterol, slightly higher (0.70 ± 0.27 g/L) in mutated patients compared to non-mutated patients (0.51 ± 0.17 g/L, $P=0.03$). As expected, higher UFC was found in mutated patients compared to the non-mutated patients (1.7 ± 0.7 vs 0.9 ± 0.8 ULN, $P=0.006$, respectively) without suppressed 8-AM ACTH levels (30.9 ± 31.2 pg/mL in mutated patients vs 16.2 ± 17.5 pg/mL), associated

with more elevated cortisol after 1 mg DST (227.4 ± 174 vs 93.4 ± 117.4 nmol/L, $P=0.035$). There was no difference for midnight plasma cortisol between mutated and non-mutated patients. Among the 5 mutated patients, 4 patients had an increased UFC, normal or high ACTH levels and elevated cortisol after 1 mg DST, consistent with glucocorticoid resistance syndrome.

Potassium levels were lower in mutated patients compared to non-mutated patients (3.6 ± 0.2 vs 4.1 ± 0.5 mmol/L, $P=0.01$). Interestingly, aldosterone levels were statistically lower in mutated patients (17.3 ± 9.9 vs 98.6 ± 115.4 pg/mL in non-mutated patients, $P=0.0011$). Renin levels were low or normal in all mutated patients except for the patient harboring R477S mutation due to angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor treatment. Therefore, low plasma renin and aldosterone levels, associated with kalemia <4 mmol/L are recurrent biological features prevailing in mutated patients of the Muta-GR cohort.

Adrenocortical morphology of mutated patients (number of nodules, adrenal hyperplasia, TAV) was not different from non-mutated patients. One patient had bilateral adrenal hyperplasia (patient with R469X mutation), one had thin bilateral nodular adrenals (patient with L672P mutation) and others had either nodular thin or right/left adrenal hyperplasia.

GR haploinsufficiency in mutated patients

We obtained fibroblasts from skin biopsies of four mutated patients (patients carrying GR R469X, R477S, R491X, Q501H mutations, since patient with GR L672P mutation was lost of follow-up). We confirmed by sequencing that these skin fibroblasts carried both normal and mutated GR alleles and thus presumably endogenously expressed both wild-type and mutated GR, notwithstanding the possibility of nonsense mediated RNA decay, previously demonstrated for GR stop mutation (16). We next evaluated directly the DXM induction of a well-known glucocorticoid-induced target gene *FKBP5* in fibroblasts' patients (Fig. 4).

After 6-h DXM exposure, expression levels of *FKBP5* mRNA were significantly lower in all mutated fibroblasts (GR^{WT/mut}) compared to non-mutated fibroblasts (GR^{WT/WT} (control): 50% for GR^{WT/R469X} (R469X) ($P<0.01$), 22.7% for GR^{WT/R477S} (R477S) ($P=0.0018$), 31.3% for GR^{WT/R491X} (R491X) ($P=0.0101$), 1.3% for GR^{WT/Q501H} (Q501H) ($P=0.0022$)). These findings provide direct support for a GR haploinsufficiency, driven by heterozygous *NR3C1* mutations, consistent with glucocorticoid resistance observed in the mutated patients.

Table 2 Clinical, biochemical, hormonal and radiologic characteristics of the non-mutated vs mutated patients.

	<i>n</i> (data)	Non-mutated patients	<i>n</i> (data)	Mutated patients	<i>P</i>	R469X	R477S	R491X	Q501H	L672P
Clinical										
Age (years)	95	64.7±8.9	5	53.2±7.7	0.007	56	50	44	60	46
Sex M/W	95	49.4% (46)/51.6% (49)	5	40% (2)/60% (3)	NS	M	W	M	W	M
Hypertension	95	89.5% (85)	5	40%	0.02	YES	YES	NO	NO	NO
Diabetes	95	35% (33)	5	20%	0.66	NO	YES	NO	NO	NO
Cardiac disease	95	22% (21)	5	20%	NS	YES	NO	NO	NO	NO
BMI (kg/m ²)	93	29.8±6.0	5	30.7±9.5	0.83	26	46.9	31.1	23.7	25.8
Biology										
Kalemia (mmol/L)	90	4.1±0.5	5	3.6±0.2	0.01	3.5	3.5	3.8	3.8	3.6
Fasting glycaemia (mmol/L)	77	6.2±2.2	5	5.4±0.7	0.5	4.8	5.1	5.5	6.5	5
HbA1C (%)	65	6.5±1.2	3	5.6±0.5	0.17	5	5.9	5.9		
Total cholesterol (g/L)	84	1.85±0.44	5	1.97±0.61	0.5	1.2	1.5	2.25	2.2	2.7
HDL cholesterol (g/L)	82	0.51±0.17	4	0.70±0.27	0.03	0.6	0.6	0.52		1.1
LDL cholesterol (g/L)	81	1.1±0.4	4	1.1±0.6	0.92	0.5	0.6	1.62		1.6
Hormonology										
UFC (ULN)	88	0.9±0.8	5	1.7±0.65	0.006	1.74	1.66	2	0.68	2.46
8-AM cortisol (nmol/L)	89	440±216	5	614±213	0.1	587	896	552	320	715
Midnight cortisol (nmol/L)	59	160±150	5	165±73	0.35	119	113	240	103	248
8-AM ACTH (pg/mL)	86	16.2±17.5	5	30.9±31.2	0.16	11.5	26	85	8	24
Cortisol >50 nmol/L after 1 mg DST (nmol/L)	60	93.4±117.4	5	227.4±174.0	0.035	119	164	463	41	350
Renin (pg/mL)	67	33.0±82.2	5	47.2±92.6	0.65	2.5	212.7	2	7	12
Aldosterone (pg/mL)	70	98.6±115.4	5	17.3±9.9	0.0011	22	16.6	20	<27	1
Radiology										
Right adrenal volume (cm ³)	91	10.5±5.8	5	8.8±3.3	0.57	12.6	6.1	7.1	5.9	12.2
Left adrenal volume (cm ³)	89	13.6±6.8	5	12.9±6.9	0.9	16.8	9.1	10.1	5.1	22.7
Total adrenal volume (cm ³)	89	24.0±10.6	5	21.7±10.1	0.63	29.4	15.2	17.9	11	34.9
Right adrenal hyperplasia	92	51.0% (47)	5	20% (1)	0.36	YES	NO	NO	NO	NO
Left adrenal hyperplasia	93	76.5% (71)	5	80% (4)	NS	YES	YES	YES	YES	NO
Right nodule >10 mm	95	71.6% (68)	5	60% (4)	0.63	YES	NO	YES	NO	YES
Left nodule >10 mm	95	81.0% (77)	5	80% (4)	NS	YES	NO	YES	YES	YES

BMI, body mass index; DST, dexamethasone suppression test; HbA1C, glycated hemoglobin; HDL, high density level; LDL, low density level; M/W, men/women; UFC, 24-h urinary free cortisol; ULN, upper limit of normal range.

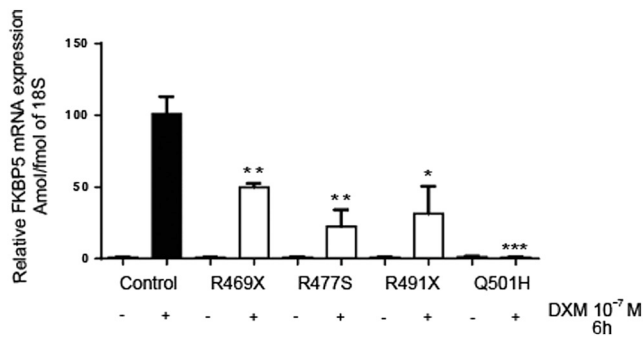


Figure 4

GR haploinsufficiency in mutated patients' fibroblasts. *Ex vivo* characterization of GR mutations in patients' fibroblasts. Patient with L672P mutation was lost of follow-up. *FKBP5* is a GR target gene. After 6-h exposure of vehicle or 10⁻⁷ M DXM, *FKBP5* mRNA expression was measured by RT-qPCR in fibroblasts and normalized with rRNA 18S. The DXM induction of *FKBP5* mRNA in patient's fibroblasts with wild-type GR (Control) was arbitrarily set at 100%. Results are mean \pm S.E.M. of two independent determinations performed in duplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ was statistically significant with non-parametric Mann-Whitney *U* tests.

GR polymorphisms

We also evaluated some common GR polymorphisms frequently described in the general population, notably ER22/23EK (rs6189 and rs6190, with minor allele frequency of 1.8% and 1.8%, respectively), rs10482622 (0.8% in the general population), N363S (rs6195, 2.1%), all located in the exon 2 and *BclI* (rs41423247, 25.5%), located in the intron 2, rs6188 located in the intron 4 and pN766N (rs6196) located in the 9 α exon (26.4% and 13.0%, respectively) (Fig. 5). Minor allelic frequencies of rs6189 and rs6190 (ER22/23EK), rs10482622, N363S, rs6188 and pN766N were calculated at 1.98, 1.98, 0.50, 0.50, 22.8 and 14.8, respectively, in the patients included in Muta-GR study (Table 3), without any difference with the general population as estimated by the exome aggregation consortium (ExaC: <https://www.exac.broadinstitute.org/> and 1000 genomes: <http://www.internationalgenome.org/>). Only *BclI* polymorphism (rs41423247) was over-represented in this cohort (38.7% vs 25.5% in the general population, $P = 0.0045$). Only one mutated patient had a heterozygous polymorphism rs6188.

Selected criteria to search for *NR3C1* mutations in eligible patients

In order to select patients with bilateral adrenal hyperplasia suitable for GR molecular investigation,

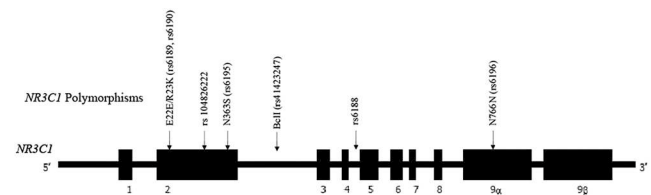


Figure 5

GR polymorphisms of 100 included patients. Localization of GR polymorphisms: ER22/23EK (rs6189, rs6190), rs10482622, N363S (rs6195) located in the exon 2, *BclI* (rs41423247) located in the intron 2, rs6188 located in the intron 4, N766N (rs6196) located in the exon 9 α .

we searched for the common clinical and/or biological features of mutated patients. Clinically, as expected, none of them had any Cushing's syndrome signs. Four out of 5 mutated patients had only mild glucocorticoid resistance syndrome. However, all mutated patients presented with kalemia < 4.0 mmol/L contrasting with plasma aldosterone levels below the lower limit of normal values. Finally, as depicted in Fig. 6, among 100 included patients in the Muta-GR study, the initial prevalence of GR mutations evaluated at 5% (5/100 patients), increased up to 16% (5/32 patients) in those with bilateral adrenal hyperplasia AND low or normal aldosterone levels AND kalemia < 4 mmol/L. Of importance, the prevalence of GR mutations increased up to 44% (4/9 patients) if one takes into account the four following criteria: Bilateral adrenal hyperplasia and glucocorticoid resistance syndrome (elevated UFC or elevated 8.00 AM cortisol after 1 mg DST) and low aldosterone levels and kalemia < 4 mmol/L.

Discussion

We identify 5 heterozygous GR mutations in patients presenting with bilateral adrenal hyperplasia associated with biological hypercortisolism or hypertension without Cushing's syndrome signs among 100 included patients in the Muta-GR study. Therefore, the prevalence of *NR3C1* mutations in the Muta-GR patients is 5%. Up to date, only 26 GR loss-of-function mutations (including ours) have been reported in the literature, which leads us to believe that the prevalence of *NR3C1* mutations is largely underestimated.

Historically, the first GR mutation was described in a patient with severe hypertension and hypokalemia associated with a glucocorticoid resistance syndrome characterized by high UFC and high 8-AM ACTH level, consistent with the lack of negative feedback of cortisol

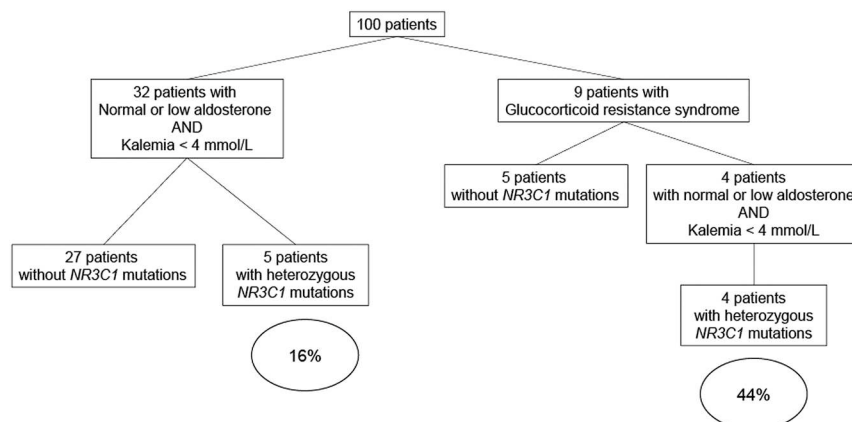
Table 3 GR polymorphisms.

SNP polymorphism	Nucleotides	Protein	n (data)	ExaC or 1000 genomes	P
rs6189	c.66G>A	E22E	95		
GG			5		
GA			1.98%	1.8% (2216/126280)	0.64
Carrier of allele A					
rs6190	c.68G>A	R23K	96		
GG			4		
GA			1.98%	1.8% (2216/126280)	0.62
Carrier of allele A					
rs10482622	c.879G>A	K293K	99		
GG			1		
GA			0.50%	0.8% (941/121252)	0.96
Carrier of allele A					
N363S (rs6195)	c.1088A>G	N363S	99		
AA			1		
AG			0.50%	2.1% (2163/121268)	0.2
Carrier of allele G					
<i>BclI</i> (rs41423247)	c.1184+646C>G		35		
CC			44		
CG			14		
GG			38.70%	25.5% (1275/5008)	0.0045
Carrier of allele G					
rs6188	c.1469-16G>T		61		
GG			36		
GT			3		
TT			22.80%	26.4% (31472/119366)	0.16
Carrier of allele T					
rs6196	c.2298A>G	pN766N	73		
AA			24		
AG			3		
GG			14.80%	13% (15723/121026)	0.56
Carrier of allele G					

ER22/23EK polymorphism corresponds to two linked polymorphisms in codons 22 and 23 GGA.GAG to GAA.AAG leading to one amino acid change ER to EK (4). The rs10482622 is a T→C: 12 patients were heterozygous (TC) and 3 patients homozygous (CC) for this polymorphism. N363S is the result of a A→G change. One patient carries this polymorphism. *BclI* polymorphism (rs41423247) is a C to G change. 38.7% of Muta-GR patients carry this polymorphism. The rs6188 polymorphism is the result of the changing of G→T. Thirty-six patients were heterozygous (GT) and 3 patients homozygous (TT). pN766N (rs6196) is the result of an A→G substitution: 24 patients were heterozygous (AG) and 3 were homozygous (GG).

on HPA axis (33, 34). Likewise, patients carrying the thirteen GR loss-of-function mutations, subsequently described up to 2010 (6, 7, 8, 10, 12, 13, 15), exhibited an overt glucocorticoid resistance phenotype. Obviously,

our present study underscores the large variety of clinical, biological and radiological signs that could be associated with GR mutations. One patient (Q501H mutation carrier) had only an elevated midnight plasma cortisol

**Figure 6**

High prevalence of *NR3C1* mutations in selected patients. Among 100 included patients, 32 patients had normal or low aldosterone levels associated with kalemia <4mmol/L resulting in a prevalence of GR mutations increased to 16%. Nine patients also had glucocorticoid resistance syndrome, leading to the prevalence of GR mutations increased up to 44% in such patients.

level but with preservation of the negative feedback loop on HPA axis. Although increased ACTH levels have been regularly reported in some cases as a direct consequence of glucocorticoid resistance, this does not seem to be the case for 4 out of 5 patients of our study since only one patient had high 8-AM ACTH level (R491X mutation carrier). However, the ACTH level values, not evaluated within the very same center, should be interpreted with an extreme caution given the unstable nature of this hormonal analyte (35) and the absence of reliable and standardized measurements (36). Altogether, our data indicate that the generalized glucocorticoid resistance syndrome seems to be relatively mild in patients harboring GR loss-of-function mutations, compared to the first cases described to date. The main differential diagnosis of mild glucocorticoid resistance could be the pseudo-Cushing syndrome, whose diagnosis relies on moderately elevated UFC (below twice the ULN) and partial failure of 1 mg DST in obese, poorly controlled diabetic, depressed or alcoholic patients (37). Four out of five mutated patients, reported in the present study, presented with these clinical and biochemical features suggesting that *NR3C1* sequencing should be performed in some atypical pseudo-Cushing patients to confirm glucocorticoid resistance.

Furthermore, all mutated patients in the Muta-GR study showed alteration in the mineralocorticoid pathway. Indeed, low aldosterone levels with normal or low renin levels with or without hypertension sharply contrast with low plasma potassium levels. The first glucocorticoid-resistant patient described in 1976 had hypertension with hypokalemia, which was interpreted as a direct consequence of increased plasma deoxycorticosterone (DOC) and corticosterone concentrations due to overstimulation of adrenal glands by ACTH hypersecretion (33, 34). Interestingly, DOC levels were in the normal range in the 3 patients in whom these were measured (R469X (16), R477S (27) and R491X) carrier patients. Low urinary tetrahydrocortisone (THE)/tetrahydrocortisol (THF) ratio were found in all affected GR 469X carriers, suggesting an impairment of renal 11- β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11- β HSD2) activity (16). Indeed, 11- β HSD2 enzyme metabolizes cortisol into cortisone, thus preventing cortisol to bind and activate the renal mineralocorticoid receptor (MR), responsible for sodium retention, volume expansion and HBP. Few cases of 11- β HSD2 deficiency have been described in a context of ectopic ACTH syndrome (38) and *HSD11B2* gene mutations (39). Moreover, *HSD11B2* gene seems to be a glucocorticoid-inducible target gene since human placental 11- β HSD2 mRNA expression increased after DXM

stimulation that was inhibited by GR antagonist RU486 (40), suggesting the involvement of GR in the regulation of 11- β HSD2 activity. Taken together, we propose that altered GR signaling may be responsible for a decreased 11- β HSD2 activity, leading to inefficient glucocorticoid breakdown. As a result, elevated cortisol concentrations in mutated patients could induce illicit occupation and activation of the unprotected MR which, in turn, could lead to hypokalemia despite low plasma aldosterone levels, in the context of apparent mineralocorticoid excess or pseudohypermineralocorticism.

Herein, we demonstrate GR haploinsufficiency in mutated patients and propose that it could be a potential cause of bilateral adrenal hyperplasia. Indeed, several authors already demonstrated the expression of GR in the normal adrenal gland (41) and its involvement in different pathologies such as adrenocortical carcinomas (42) or nodules of primary pigmented nodular adrenocortical disease tissues (43).

One recurrent pathophysiological mechanism evoked for bilateral adrenal hyperplasia in the context of GR loss-of-function mutations was the ACTH overstimulation of the adrenal glands. This was comforted by various human and mouse studies. A single case of bilateral adrenal hyperplasia was reported in a 7-year-old boy with high ACTH level associated with heterozygous GR mutation (13). Invalidation of the *Nr3c1* gene in mice was accompanied by an enlarged size of adrenal glands and disorganized adrenocortical cells (44). As expected, although most of GR^{-/-} mice died 1–2h postnatally, they presented with high corticosterone and ACTH levels consistent with altered HPA regulation. However, heterozygous GR^{+/-} mice also had larger adrenal glands (17) but normal ACTH levels, precluding an exclusive role of high circulating ACTH levels in the pathogenesis of adrenal hyperplasia. In our study, the majority of mutated patients had normal ACTH levels with no hirsutism in women and no elevated plasma DOC levels, ruling out a simple ACTH overstimulation of the adrenal glands. Along this line, a positive ultrashort regulatory loop exerted by glucocorticoids via GR on steroidogenesis was reported in human adrenocortical H295R cells, independently of ACTH signaling (45). Collectively, the mechanisms by which GR haploinsufficiency may lead to bilateral adrenal hyperplasia remain to be elucidated but clearly cannot be simply restricted to a chronic ACTH overstimulation, even though we have not explored the potential role of intra-adrenal endogenous ACTH release, recently reported (46).

The second objective of the Muta-GR study was to evaluate *NR3C1* polymorphism frequencies associated

with adrenal hyperplasia compared to the general population. *BclI* polymorphism (rs41423247) was over-represented in the Muta-GR cohort compared to the general population, in contrast to Tzanela *et al.* (47), who did not detect higher frequency of bilateral masses in *BclI* carriers among 95 patients with adrenal incidentalomas. Nevertheless, despite the number of Muta-GR patients, a direct relationship between bilateral adrenal incidentaloma and minor allelic frequencies of some common GR polymorphisms (rs6189, rs6190, rs10482622, rs6195, rs41423247, rs6188 and rs6196) has not been established. This contrasts with other studies that have suggested a role of these polymorphisms in unilateral adrenal incidentaloma (47, 48). Altogether, except *BclI*, no association was found between the presence of such polymorphisms and bilateral adrenal hyperplasia in our series.

There are several limitations of this multicenter study. Indeed, MDCT examinations were performed in each independent center on different MDCT units and with various protocols of image acquisitions so that the axial section thickness was different among the centers and the measures of adrenal volume could have been slightly impacted by these differences (29). However, analysis of adrenal hyperplasia's appearance with manual measurements of adrenal limbs and bodies, as well as assessment of the presence of nodules and calculation of adrenal glands volume was centralized and performed by a single operator. Moreover, biochemical and hormonal analyses were performed in each center with inherent methodological differences and variations in normal ranges, impeding direct value comparison especially for some specific hormones as mentioned earlier. This led us to express some results such as UFC, normalized to the ULN.

Our study has direct clinical implications. Indeed, identification of *NR3C1* mutation in a patient presenting with adrenal hyperplasia and alteration of cortisol secretion excludes false diagnosis of preclinical Cushing's syndrome or pseudo-Cushing's syndrome. Molecular screening could be extended to the direct family members. This has also important consequences on the follow-up and management of such patients, in whom no further invasive test should be proposed, adrenocortical surgery should be excluded while appropriate pharmacological strategies (mineralocorticoid antagonists) could be envisioned. The pathophysiological significance and the precise clinical pathogenesis of *NR3C1* mutations remain to be clearly established. However, one has to take into account the presence of pseudohypermineralocorticism

associated with these genetic alterations, especially with respect to its potential impact on cardiovascular system.

In conclusion, we discovered 5 original heterozygous GR mutations in a population of 100 patients with bilateral adrenal hyperplasia associated with biological hypercortisolism and/or hypertension without Cushing's syndrome signs. Most of mutated patients harbored a mild generalized glucocorticoid resistance and a pseudohypermineralocorticism. We suggest that *NR3C1* genetic alterations should be systematically searched in selected patients notably those presenting with eligible criteria, as well as in pseudo-Cushing patients for the benefit of both the patients and their families.

Declaration of interest

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

Funding

G V is the recipient of a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was supported by the French Ministry of Health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique National) (PHRC-2011-N11-01) and grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and Paris Sud University.

Author contribution statement

B D and M L contributed to the study concept and design. Investigators referred the patients. G V performed the analysis. C H supervised C T examination. G V performed statistical analysis. J B analyzed G R mutations and polymorphisms. G V, S T, C H, B D and M L contributed to the drafting of the paper and shared the responsibility to submit the manuscript for publication. All authors analyzed the data, corrected and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments

List of investigators in the MUTA-GR study: Dr F Amiot-Chapoutot (CH Troyes, France); Dr D Ancelle (CH St Lô, France); Dr F Bertoin (CHU Reims, France); Prof. T Brue (CHU Marseille, France); Prof. P Caron (CHU Toulouse, France); Prof. F Borson-Chazot (HCL, Lyon, France); Prof. S Christin-Maitre (CHU St Antoine, Paris, France); Prof. O Chabre (CHU Grenoble, France); Prof. R Dessailoud (CHU Amiens, France); Prof. B Estour (CHU Saint-Etienne, France); Dr H Grulet (CHU Reims, France); Dr F Illouz (CHU Angers, France); Prof. N Jeandidier (CHU Strasbourg, France); Prof. V Kerlan (CHU Brest, France); Prof. M Klein (CHU Nancy, France); Prof. A Penfornis (CHU Besançon, France); Dr P Pierre (CHU Tours, France); Prof. A Tabarin (CHU Bordeaux, Pessac, France); Prof. P Touraine (CHU Pitié-Salpêtrière, Paris, France); Prof. M C Vantghem (CHRU Lille, France); Prof. J Young (CHU Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France).

The authors would like to thank Dr Coralie Barbe and Edith Kassa (CHU Reims) who helped us to manage the Muta-GR study. They thank Isabelle Boucly (CHU Bicêtre) for excellent technical assistance in GR mutation screening and Neila Belassaoui (CHU Bicêtre) for GR polymorphism determination. They also are indebted to Dr Alexandre Buffet (CHU Toulouse) for providing us with the skin biopsy of one patient and Dr Eric Pussard (CHU Bicêtre) for LCMSMS measurements of steroidomic profiling in one patient. G V is the recipient of a doctoral fellowship from the 'Fondation pour la Recherche Médicale' (FRM).

References

- Gross KL & Cidlowski JA. Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2008 **19** 331–339. (<https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.07.009>)
- Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M & Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *Journal of Clinical Investigation* 1995 **95** 2435–2441. (<https://doi.org/10.1172/JCI117943>)
- Koper JW, van Rossum EFC & van den Akker ELT. Glucocorticoid receptor polymorphisms and haplotypes and their expression in health and disease. *Steroids* 2014 **92** 62–73. (<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.07.015>)
- Russcher H, Smit P, van den Akker ELT, van Rossum EFC, Brinkmann AO, de Jong FH, Lamberts SWJ & Koper JW. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 5804–5810. (<https://doi.org/10.1210/jc.2005-0646>)
- Karl M, Lamberts SW, Koper JW, Katz DA, Huizenga NE, Kino T, Haddad BR, Hughes MR & Chrousos GP. Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid receptor mutation. *Proceedings of the Association of American Physicians* 1996 **108** 296–307.
- Ruiz M, Lind U, Gåfväls M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stiernä P, Wikström AC & Werner S. Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clinical Endocrinology* 2001 **55** 363–371. (<https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2001.01323.x>)
- Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D & Chrousos GP. Familial glucocorticoid resistance caused by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1993 **76** 683–689. (<https://doi.org/10.1210/jcem.76.3.8445027>)
- Mendonça BB, Leite MV, de Castro M, Kino T, Elias LLK, Bachega TAS, Arnhold IJP, Chrousos GP, & Latronico AC. Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 1805–1809. (<https://doi.org/10.1210/jcem.87.4.8379>)
- Treble P, Matthews L, Blakley J, Wayte AWO, Black GCM, Wilton A & Ray DW. Familial glucocorticoid resistance caused by a novel frameshift glucocorticoid receptor mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** E490–E499. (<https://doi.org/10.1210/jc.2010-0705>)
- Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI & Chrousos GP. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *Journal of Clinical Investigation* 1991 **87** 680–686. (<https://doi.org/10.1172/JCI115046>)
- Nader N, Bachrach BE, Hurt DE, Gajula S, Pittman A, Lescher R & Kino T. A novel point mutation in helix 10 of the human glucocorticoid receptor causes generalized glucocorticoid resistance by disrupting the structure of the ligand-binding domain. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 2281–2285. (<https://doi.org/10.1210/jc.2009-2463>)
- Charmandari E, Raji A, Kino T, Ichijo T, Tiulpakov A, Zachman K & Chrousos GP. A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005 **90** 3696–3705. (<https://doi.org/10.1210/jc.2004-1920>)
- Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Jubiz W, Mejia L, Zachman K & Chrousos GP. A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2007 **92** 3986–3990. (<https://doi.org/10.1210/jc.2006-2830>)
- Vottero A, Kino T, Combe H, Lecomte P & Chrousos GP. A novel, C-terminal dominant negative mutation of the GR causes familial glucocorticoid resistance through abnormal interactions with p160 steroid receptor coactivators. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 2658–2667. (<https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8520>)
- McMahon SK, Pretorius CJ, Ungerer JPP, Salmon NJ, Conwell LS, Pearen MA & Batch JA. Neonatal complete generalized glucocorticoid resistance and growth hormone deficiency caused by a novel homozygous mutation in Helix 12 of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2010 **95** 297–302. (<https://doi.org/10.1210/jc.2009-1003>)
- Bouligand J, Delemer B, Hecart AC, Meduri G, Viengchareun S, Amazit L, Trabado S, Fève B, Guiochon-Mantel A, Young J *et al.* Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PLoS ONE* 2010 **5** e13563. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013563>)
- Michailidou Z, Carter RN, Marshall E, Sutherland HG, Brownstein DG, Owen E, Cockett K, Kelly V, Ramage L, Al-Dujaili ES *et al.* Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet. *FASEB Journal* 2008 **22** 3896–3907. (<https://doi.org/10.1096/fj.08-111914>)
- Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Greganin M, Macri C & Boscaro M. Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998 **83** 55–62. (<https://doi.org/10.1210/jcem.83.1.4501>)
- Kastelan D, Kraljevic I, Dusek T, Knezevic N, Solak M, Gardijan B, Kralik M, Poljicanin T, Skoric-Polovina T & Kastelan Z. The clinical course of patients with adrenal incidentaloma: is it time to reconsider the current recommendations? *European Journal of Endocrinology* 2015 **173** 275–282. (<https://doi.org/10.1530/EJE-15-0199>)
- Paschou SA, Kandaraki E, Dimitropoulou F, Goulis DG & Vryonidou A. Subclinical Cushing's syndrome in patients with bilateral compared to unilateral adrenal incidentalomas: a systematic review and meta-analysis. *Endocrine* 2016 **51** 225–235. (<https://doi.org/10.1007/s12020-015-0776-6>)
- Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J & Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews* 2001 **22** 75–110. (<https://doi.org/10.1210/edrv.22.1.0420>)
- Zennaro MC, Fernandes-Rosa F, Boulikroun S & Jeunemaitre X. Bilateral idiopathic adrenal hyperplasia: genetics and beyond. *Hormone and Metabolic Research* 2015 **47** 947–952. (<https://doi.org/10.1055/s-0035-1565198>)
- Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, Barreau O, Lefèvre L, Sibony M, Guignat L *et al.* ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *New England Journal of Medicine* 2013 **369** 2105–2114. (<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304603>)
- Emms H, Tsiros I, Cranston T, Tzagarakis S & Grossman AB. Do patients with incidentally discovered bilateral adrenal nodules represent an early form of ARMC5-mediated bilateral macronodular hyperplasia? *Endocrine* 2016 **53** 801–808. (<https://doi.org/10.1007/s12020-016-0988-4>)
- Hong AR, Kim JH, Park KS, Kim KY, Lee JH, Kong SH, Lee SY, Shin CS, Kim SW & Kim SY. Optimal follow-up strategies for adrenal incidentalomas: Reappraisal of the 2016 ESE-ENSAT guidelines in real clinical practice. *European Journal of Endocrinology* 2017 **177** 475–483. (<https://doi.org/10.1530/EJE-17-0372>)

- 26 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. *European Journal of Endocrinology* 2016 **175** G1–G34. (<https://doi.org/10.1530/EJE-16-0467>)
- 27 Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Trabado S *et al.* Three novel heterozygous point mutations of NR3C1 causing glucocorticoid resistance. *Human Mutation* 2016 **37** 794–803. (<https://doi.org/10.1002/humu.23008>)
- 28 Lingam RK, Sohaib SA, Vlahos I, Rockall AG, Isidori AM, Monson JP, Grossman A & Reznick RH. CT of primary hyperaldosteronism (Conn's syndrome): the value of measuring the adrenal gland. *American Journal of Roentgenology* 2003 **181** 843–849. (<https://doi.org/10.2214/ajr.181.3.1810843>)
- 29 Carsin-Vu A, Oubaya N, Mulé S, Janvier A, Delemer B, Soyer P & Hoeffel C. MDCT linear and volumetric analysis of adrenal glands: normative data and multiparametric assessment. *European Radiology* 2016 **26** 2494–2501. (<https://doi.org/10.1007/s00330-015-4063-y>)
- 30 Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB & Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet* 2006 **367** 1605–1617. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68699-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68699-6))
- 31 Vincent JM, Morrison ID, Armstrong P & Reznick RH. The size of normal adrenal glands on computed tomography. *Clinical Radiology* 1994 **49** 453–455. ([https://doi.org/10.1016/S0009-9260\(05\)81739-8](https://doi.org/10.1016/S0009-9260(05)81739-8))
- 32 Le Billan F, Khan JA, Lamribet K, Viengchareun S, Bouligand J, Fagart J & Lombès M. Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB Journal* 2015 **29** 3977–3989. (<https://doi.org/10.1096/fj.15-274266>)
- 33 Vingerhoeds AC, Thijssen JH & Schwarz F. Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1976 **43** 1128–1133. (<https://doi.org/10.1210/jcem-43-5-1128>)
- 34 Chrousos GP, Vingerhoeds A, Brandon D, Eil C, Pugeat M, DeVroede M, Loriaux DL & Lipsett MB. Primary cortisol resistance in man. A glucocorticoid receptor-mediated disease. *Journal of Clinical Investigation* 1982 **69** 1261–1269. (<https://doi.org/10.1172/JCI110565>)
- 35 Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ & Yandle TG. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clinical Biochemistry* 2001 **34** 107–112. ([https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(01\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(01)00196-5))
- 36 Pecori Giraldi F, Sacconi A, Cavagnini F & Study Group on the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis of the Italian Society of Endocrinology. Assessment of ACTH assay variability: a multicenter study. *European Journal of Endocrinology* 2011 **164** 505–512. (<https://doi.org/10.1530/EJE-10-0962>)
- 37 Findling JW & Raff H. Diagnosis of endocrine disease: differentiation of pathologic/neoplastic hypercortisolism (Cushing's syndrome) from physiologic/non-neoplastic hypercortisolism (formerly known as pseudo-Cushing's syndrome). *European Journal of Endocrinology* 2017 **176** R205–R216. (<https://doi.org/10.1530/EJE-16-0946>)
- 38 Stewart PM, Walker BR, Holder G, O'Halloran D & Shackleton CH. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in Cushing's syndrome: explaining the mineralocorticoid excess state of the ectopic adrenocorticotropin syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995 **80** 3617–3620. (<https://doi.org/10.1210/jcem.80.12.8530609>)
- 39 Morineau G, Sulmont V, Salomon R, Fiquet-Kempf B, Jeunemaitre X, Nicod J & Ferrari P. Apparent mineralocorticoid excess: report of six new cases and extensive personal experience. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006 **17** 3176–3184. (<https://doi.org/10.1681/ASN.2006060570>)
- 40 van Beek JP, Guan H, Julian L & Yang K. Glucocorticoids stimulate the expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human placental trophoblast cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 5614–5621. (<https://doi.org/10.1210/jc.2004-0113>)
- 41 Paust HJ, Loeper S, Else T, Bamberger AM, Papadopoulos G, Pankoke D, Saeger W & Bamberger CM. Expression of the glucocorticoid receptor in the human adrenal cortex. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 2006 **114** 6–10. (<https://doi.org/10.1055/s-2005-873007>)
- 42 Tacon LJ, Soon PS, Gill AJ, Chou AS, Clarkson A, Botling J, Stalberg PLH, Skogseid BM, Robinson BG, Sidhu SB *et al.* The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 **94** 4591–4599. (<https://doi.org/10.1210/jc.2009-0546>)
- 43 Bourdeau I, Lacroix A, Schürch W, Caron P, Antakly T & Stratakis CA. Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003 **88** 3931–3937. (<https://doi.org/10.1210/jc.2002-022001>)
- 44 Cole TJ, Blundy JA, Monaghan AP, Kriegelstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K & Schütz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes and Development* 1995 **9** 1608–1621.
- 45 Asser L, Hescot S, Viengchareun S, Delemer B, Trabado S & Lombès M. Autocrine positive regulatory feedback of glucocorticoid secretion: glucocorticoid receptor directly impacts H295R human adrenocortical cell function. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014 **395** 1–9. (<https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.012>)
- 46 Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Libé R, Bram Z, Groussin L, Caron P *et al.* Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *New England Journal of Medicine* 2013 **369** 2115–2125. (<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215245>)
- 47 Tzanela M, Mantzou E, Saltiki K, Tampourlou M, Kalogeris N, Hadjidakis D, Tsagarakis S & Alevizaki M. Clinical and biochemical impact of BCL1 polymorphic genotype of the glucocorticoid receptor gene in patients with adrenal incidentalomas. *Journal of Endocrinological Investigation* 2012 **35** 395–400. (<https://doi.org/10.3275/7840>)
- 48 Damjanovic SS, Antic JA, Ilic BB, Cokic BB, Ivovic M, Ognjanovic SI, Isailovic TV, Popovic BM, Bozic IB, Tatic S *et al.* Glucocorticoid receptor and molecular chaperones in the pathogenesis of adrenal incidentalomas: potential role of reduced sensitivity to glucocorticoids. *Molecular Medicine* 2012 **18** 1456–1465. (<https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00261>)
- 49 Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, Mondok A, Borgulya G, Panczel P, Prohaszka Z *et al.* Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 2796–2799. (<https://doi.org/10.1210/jc.2006-0066>)

Received 26 December 2017

Revised version received 9 February 2018

Accepted 14 February 2018

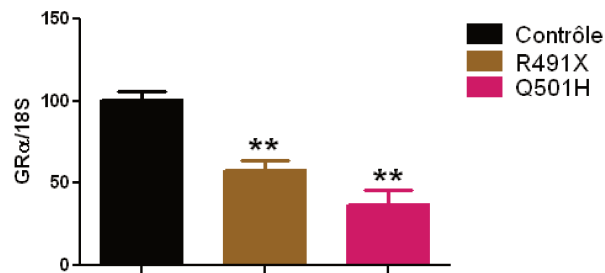
2. Poursuite de la caractérisation *ex vivo* des mutants du GR

Nous avons pu obtenir et mettre en culture les fibroblastes de certains patients porteurs des mutations inactivatrices hétérozygotes du GR : R491X et Q501H. Les fibroblastes ont été isolés après biopsies cutanées. Nous avons utilisé des fibroblastes contrôles d'un patient témoin possédant un GR dépourvu de mutation (TE2). Nous avons vérifié la présence de mutation à l'état hétérozygote dans chacun des fibroblastes et vérifié l'absence de mutation du GR dans les fibroblastes contrôles (séquençage Sanger).

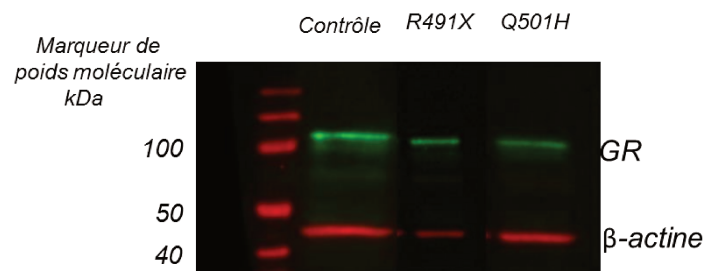
2.1 Mise en évidence de l'haploinsuffisance du GR

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression en messager et en protéine du GR dans les fibroblastes des patients porteur de la mutation hétérozygote R491X et Q501H. Nous avons mis en évidence une diminution d'expression du GR chez les 2 patients ($57,7 \pm 6,5$ % pour R491X, $P=0,0022$ et $36,8 \pm 9,0$ % pour Q501H, $P= 0,0095$) en messager (**Figure 24A**) mais également en protéine (**Figure 24B et C**).

A)



B)



C)



Figure 24 : Expression en messager et en protéine du GR dans les fibroblastes des patients porteur des mutations R491X et Q501H

A) Expression relative de l'ARNm du GR dans les fibroblastes des patients mutés mesurée par RT-qPCR. L'expression relative des ARNm est exprimée en attomol du *NR3C1*/femtomole de l'ARNr 18S. La valeur de 100 % est attribuée arbitrairement à l'expression du GR dans les fibroblastes témoins. Diminution de l'expression du GR dans les fibroblastes des patients porteurs des mutations R491X et Q501H. Représentatif de 3 échantillons, ** $P < 0,01$ (Test non paramétrique de Mann Whitney).

B) Expression protéique du GR (anticorps dirigé contre la partie N-terminale du GR SC-393232, dilué au 1/500ème) (en vert) et de la β-actine (en rouge) dans les fibroblastes d'un patient contrôle et de deux patients porteurs des mutations R491X et Q501H. Western blot représentatif de 2 échantillons pour le mutant R491X et 9 pour le mutant Q501H.

C) Quantification relative du GR normalisée sur la β-actine après Western Blot. Les résultats sont représentatifs de 2 échantillons indépendants pour R491X et 9 échantillons indépendants pour Q501H (moyenne ± SEM). *** $P < 0,001$ (Test non paramétrique de Mann Whitney).

Nous avons ensuite étudié l'expression de 3 gènes cibles endogènes du GR : le gène *SGK1*, *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*, dont la fonction la plus connue est le maintien du canal ENaC à la membrane apicale des cellules rénales (Náray-Fejes-Tóth et al. 2000) dont l'induction est maximale 30 min après stimulation par les GC, *PER1*, gène de l'horloge circadienne (Z. Nagy et al. 2016), dont l'induction est maximale après 4 h d'exposition à la DXM puis reste stable pendant 4 h et *FKBP5*, protéine co-chaperon du GR (Vermeer et al. 2003), dont le niveau d'expression augmente progressivement après l'induction par DXM et est maximale à 8 h puis diminue ensuite.

Nous avons étudié l'induction de ces gènes cibles après 30 min et 6 h d'exposition à 10^{-7} M DXM dans les fibroblastes des patients mutés en comparaison des fibroblastes témoins. Les fibroblastes témoins et mutés ont été préalablement incubés dans du milieu de culture déstéroïdé pendant 24 h puis traités pendant 30 min ou 6h soit par le véhicule (éthanol servant de contrôle) soit 10^{-7} M de DXM.

L'induction de l'ARNm de *SGK1* (**Figure 25A**) de tous les fibroblastes mutés est similaire à celle du contrôle. L'étude de l'ARNm de *PER-1* (**Figure 25B**) montre qu'il n'existe pas de diminution d'induction du gène, après 6 h d'exposition à la DXM par rapport au contrôle. On retrouve une franche diminution d'induction de l'ARNm de *FKBP5* (**Figure 25C**) pour tous les mutants après 6 h d'exposition à la DXM par rapport au contrôle, respectivement 35,5 % pour R491X ($P=0,03$) et de 5,3% pour le mutant Q501H ($P=0,0004$). La diminution d'induction de *FKBP5* dans tous les fibroblastes mutés suggère fortement l'existence d'un mécanisme d'haploinsuffisance du GR, signant la résistance de la cellule à l'action des GC. Cependant, la variabilité de la réponse des différents gènes cibles, semble indiquer une résistance à l'action des GC gène spécifique.

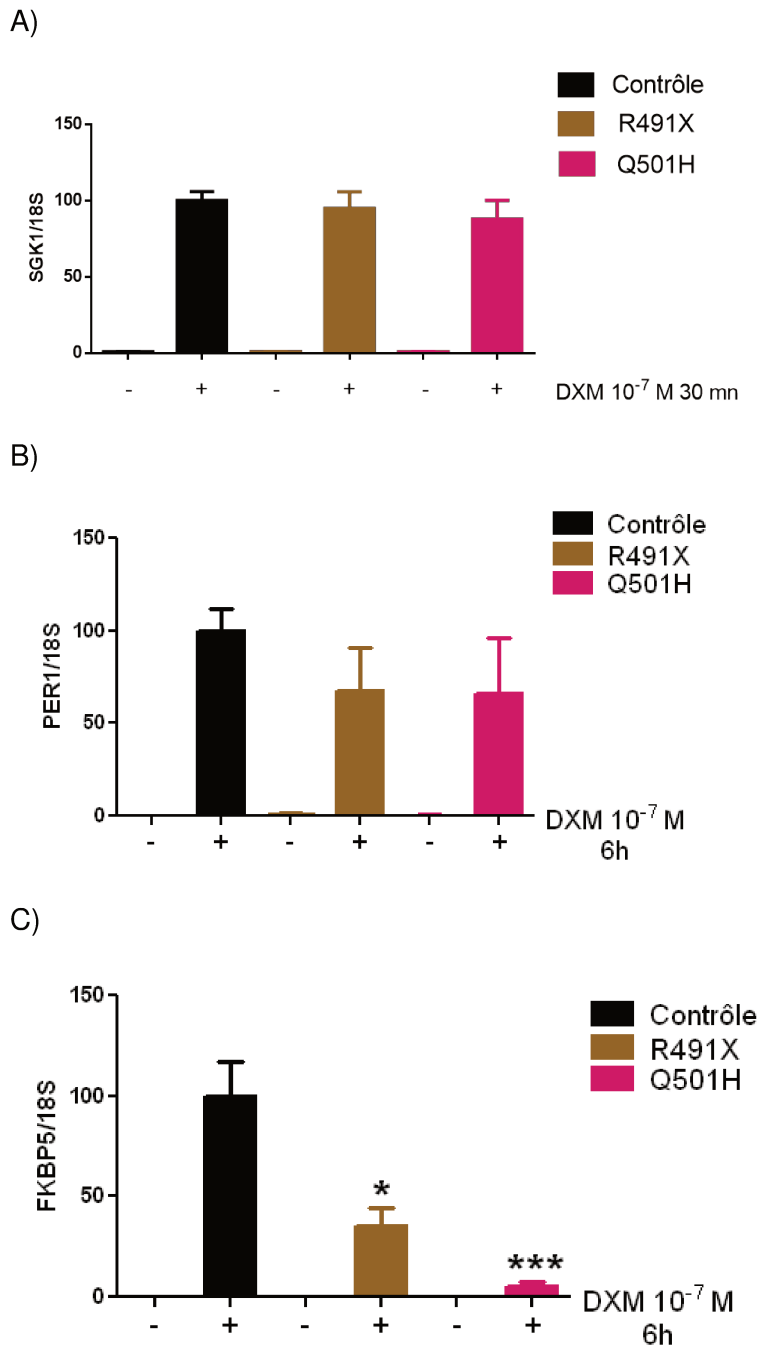


Figure 25 : Etude de l'expression de gènes cibles endogènes du GR

A, B, C) Après extraction des ARN totaux, nous avons rétrotranscrit l'ARNm en ADN complémentaire puis réalisé une PCR quantitative (qPCR). L'expression relative des ARNm de *SGK1*, *PER1* et *FKBP5* est exprimée en attomole du gène d'intérêt /femtomole de l'ARNr 18S. La valeur de 100 % est attribuée arbitrairement à l'expression relative de *SGK-1*, *PER-1* et *FKBP5* dans les fibroblastes témoins. Résultats représentatifs d'au moins 2 expériences indépendantes avec pour chaque expérience trois échantillons par condition, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ (Test non paramétrique de Mann Whitney).

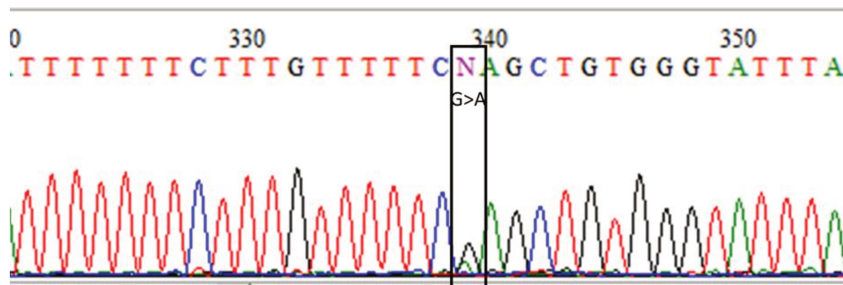
2.2 Etude du mécanisme de non-sense mRNA Decay du mutant R491X

La mutation hétérozygote GR R491X est à l'origine d'un codon stop prématuré, localisé en dehors du dernier exon codant. L'ARNm codant l'allèle muté pourrait être rapidement dégradé par le mécanisme de NMD. L'existence de ce mécanisme sur *NR3C1* a déjà été démontrée par notre équipe pour un autre mutant GR, R469X (Bouligand et al. 2010).

Le séquençage de l'ADN génomique des fibroblastes retrouve la présence de la mutation hétérozygote (**Figure 26A**), correspondant au remplacement d'une cytosine par une thymine, alors que le séquençage du transcrit ne retrouve que l'allèle sauvage non muté (**Figure 26B**), suggérant bien l'existence d'un mécanisme de dégradation anticipé de l'ARNm muté aberrant.

A)

ADN génomique reverse du patient porteur de la mutation



B)

ADN complémentaire du patient porteur de la mutation R491X

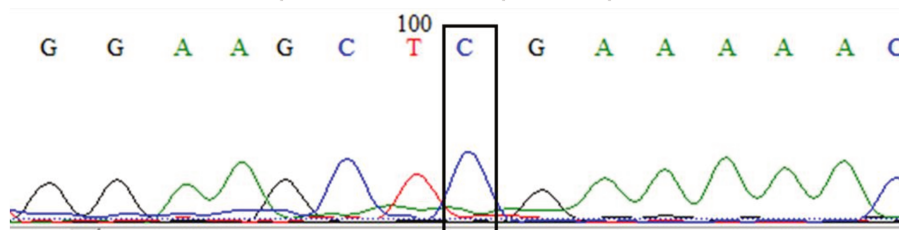


Figure 26 : Etude du mécanisme de Non-Sense Mediated mRNA Decay (NMD) sur le mutant R491X

A) Identification de la présence de la mutation hétérozygote correspondant au remplacement d'une cytosine par une thymine en position 1471 à partir de l'ADN génomique des fibroblastes du patient.

B) Séquençage de l'ADN complémentaire, issu des fibroblastes du patient porteur de la mutation R491X, après traitement par éthanol seul. Présence uniquement de l'allèle sauvage.

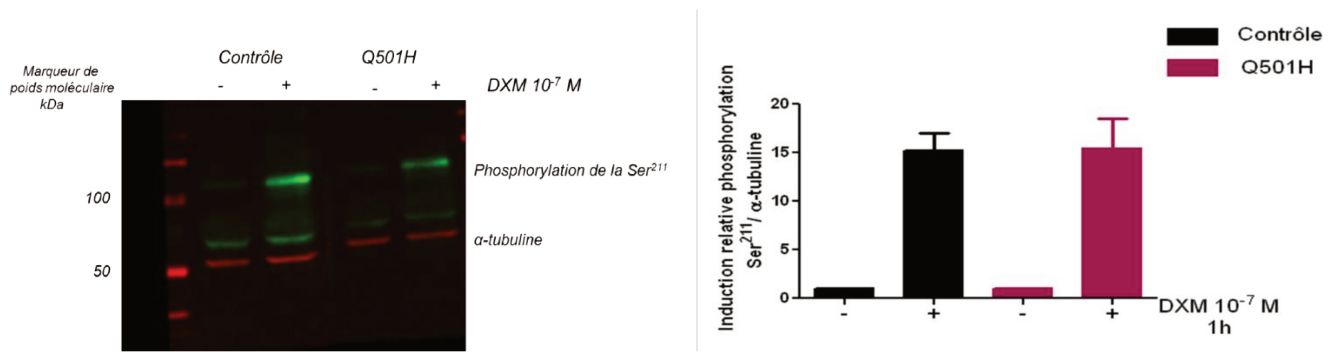
2.3 Etude de l'haploinsuffisance du mutant Q501H

Nous avons poursuivi la caractérisation du mécanisme d'haploinsuffisance du mutant Q501H en explorant d'éventuelles modulations de la phosphorylation du GR dans les fibroblastes de sujet témoin et du propositus muté. En effet, nous savons que le GR peut être phosphorylé sur les Ser²⁰³, Ser²¹¹ et Ser²²⁶. Or il a été montré que les mutations de ces résidus sérines sont responsables d'une diminution de la capacité de transactivation du GR (W. Chen et al. 2008). De plus, Chen *et al.*, ont rapporté que le niveau de phosphorylation de la serine Ser²¹¹ était un déterminant important de l'activité du récepteur.

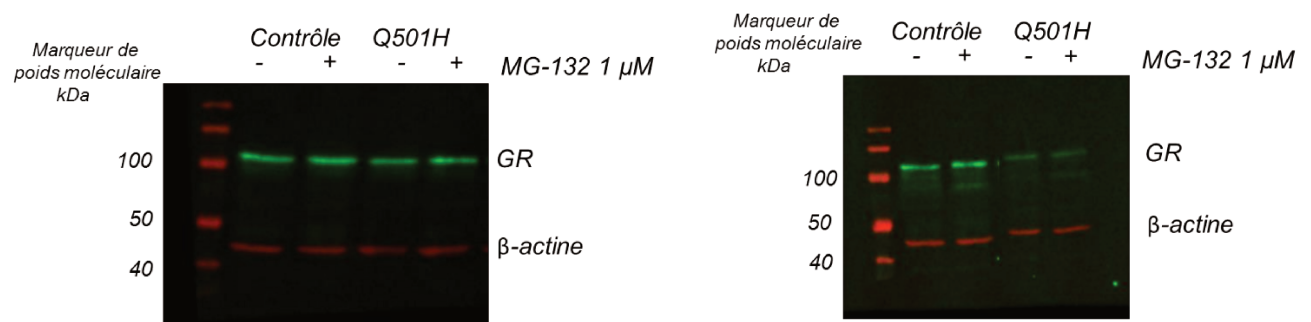
Nous avons évalué la capacité de phosphorylation du résidu sérine en position 211, après extraction protéique et WB. Après 1 h de traitement à 10⁻⁷ M DXM, GR WT est phosphorylé au niveau de la Ser²¹¹ avec un rapport GR-Ser²¹¹ / α -tubuline à 15,3 \pm 2,2, signant une activation du récepteur sauvage (contrôle). En comparaison, le rapport de l'induction de la phosphorylation de la Ser²¹¹ dans les fibroblastes du patient porteur de la mutation Q501H semble comparable à celui du contrôle 16,3 \pm 3,6, $P=0,8$ sur n=6 échantillons, (**Figure 26A**), excluant une anomalie de phosphorylation ligand-dépendante du récepteur muté par rapport au GR sauvage et donc excluant l'implication de ce mécanisme dans l'haploinsuffisance identifiée pour GR Q501H.

L'haploinsuffisance du mutant GR Q501H, ne semblant pas être associée à un défaut de phosphorylation du GR, nous avons émis l'hypothèse une dégradation protéique accélérée permettant d'expliquer la diminution d'expression protéique observée en WB. Afin d'explorer la possibilité d'une dégradation protéique accélérée du mutant GR Q501H par le protéasome, nous avons utilisé un inhibiteur du protéasome, le MG132, à la concentration de 1 μ M pendant 16 h. Les résultats, présentés dans la **Figure 27B**, sont difficilement interprétables car nous n'avons pas mis en évidence une augmentation de GR dans les fibroblastes contrôles alors qu'il est bien établi que le GR est dégradé dans le protéasome (Miranda et al. 2013). De plus, à l'état basal, c'est-à-dire en présence de véhicule (DMSO), l'expression de GR Q501H muté dans les fibroblastes est extrêmement variable : une fois effondrée en accord avec l'haploinsuffisance démontrée dans la **Figure 24B** et une fois une expression normale au même niveau que le GR sauvage **Figure 27B et C**. Ces variations importantes empêchent toute interprétation des résultats et invitent à reproduire les expériences. Néanmoins, il semble raisonnable d'exclure à priori une dégradation accélérée du mutant Q501H par le protéasome.

A)



B)



C)

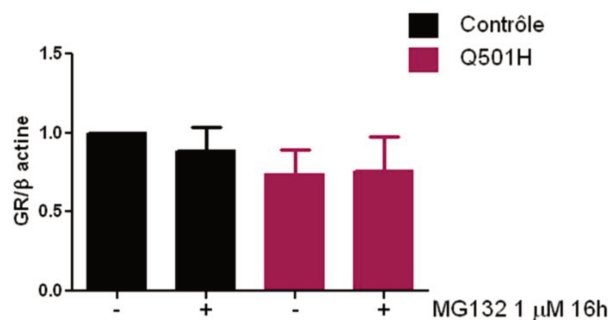


Figure 27 : Etude de l'haploinsuffisance du mutant Q501H

A) Expression et quantification relative du signal de la Ser²¹¹ phosphorylée (en vert), anticorps dilué au 1/1000ème (Cell Signaling) et de l' α -tubuline (en rouge), issus des fibroblastes d'un patient contrôle et du patient porteur de la mutation Q501H (Q501H) après traitement des fibroblastes pendant 1h par DXM 10⁻⁷ M. WB représentatif de n=10 échantillons.

B) Expression protéique du GR (anticorps dirigé contre la partie N-terminale du GR SC-393232, dilué au 1/500ème) (en vert) et de la β -actine (en rouge) issus des fibroblastes d'un patient contrôle et du patient porteur de la mutation Q501H après traitement par MG-132 1 μ M pendant 16 h. Western blot représentatif de 6 échantillons.

C) Traitement par inhibiteur du protéasome à 1 μ M MG-132 pendant 16 h ou véhicule (DMSO) des fibroblastes contrôles (contrôle) ou porteur de la mutation hétérozygote Q501H (Q501H). Quantification relative de signal GR/ β -actine, représentatif de 6 échantillons.

En conclusion, nous avons montré que les deux mutations hétérozygotes du GR R491X et Q501H étaient responsables d'une haploinsuffisance d'intensité variable en fonction du gène cible étudié. De manière intéressante, les mécanismes à l'origine de cette haploinsuffisance semblent aussi répondre à des mécanismes distincts spécifiques de la mutation en cause. Nous avons démontré que le transcrit de l'allèle porteur de la mutation R491X subit un mécanisme de NMD, responsable de la perte d'expression en ARN messenger et en protéine de l'allèle muté.

En ce qui concerne l'haploinsuffisance du mutant GR Q501H, nous avons exclu plusieurs hypothèses. Nous avons d'abord exploré l'existence d'un effet dominant négatif du GR β Q501H mutant sur le GR α sauvage (**Figure 19**). Nous n'avons pas mis en évidence d'effet dominant négatif plus important du GR β Q501H mutant par rapport au GR β WT sur le GR α . Nous avons ensuite exploré l'hypothèse d'une accélération de la dégradation par le protéasome en comparaison au GR sauvage mais les résultats ne sont pas exploitables rendant toute conclusion définitive impossible bien que nous ayons la conviction que le mutant Q501H ne semble pas plus dégradé dans le protéasome. D'autres mécanismes de dégradation existent dans la cellule, que nous n'avons pas exploré dans ce travail de thèse comme le mécanisme d'autophagie (Klionsky et *al.* 2000). Nous avons également démontré que le GR présent dans les fibroblastes Q501H subissait une phosphorylation sur la Ser²¹¹ identique à celle retrouvée dans les fibroblastes contrôles. Evidemment, d'autres phosphosérines sont importantes pour la fonctionnalité du GR, que nous n'avons pas étudiées dans ce travail.

Finalement, l'étude des fibroblastes apporte des éléments supplémentaires à l'étude des mécanismes de résistance mis en jeu par les mutations présentes chez les patients.

3. Etude du mécanisme de pseudohyperaldostéronisme chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR

Dans le travail relatif à l'étude MUTA-GR, nous avons mis en évidence chez tous les patients porteurs d'une mutation hétérozygote du GR, une altération du système rénine-angiotensine-aldostérone, soit une aldostéronémie basse (<27 pg/mL) soit une réninémie basse (2-12 pg/mL). Bien que l'on ne dispose d'aucun renseignement sur la balance hydrosodée chez ces patients, nous avons voulu explorer le lien potentiel entre la présence d'une mutation hétérozygote perte de fonction du GR et les anomalies du système rénine-angiotensine-aldostérone.

Une revue de la littérature nous a conduit à déceler que ces anomalies du SRAA sont présentes chez 45% de patients porteurs de mutations inactivatrices du GR (**Tableau 5**). L'HTA, lorsqu'elle est présente, est systématiquement associée à une hypokaliémie et une rénine basse, mais certains patients avec une tension artérielle normale présentent également une kaliémie normale basse et une rénine basse.

Mutations	Type de mutations	Age au diagnostique	Sexe	HTA	ACTH	CLU	Aldosterone	Renine	kaliémie mmol/l	Corticostérone	11-Deoxycorticostérone (DOC)	Transactivation
V423A	HETEROZYGOTE	9	H	↗	↗	N						↘
I465Sfs*22	HETEROZYGOTE	55	F		↗	↗	N	↘				NA
R469X	HETEROZYGOTE	46	H	↗	N	↗	↘	↘	3,5		N	NULLE
R477H	HETEROZYGOTE	41	F	N		↗	↗					NULLE
R477S	HETEROZYGOTE	30	F	N	N	↗			3,8		N	NULLE
R477C	HETEROZYGOTE	12	F	N	↗	↗						
Y478C	HETEROZYGOTE	49	H	N	N	↗	N	N	4,2			↘
R491X	HETEROZYGOTE	44	H	N	↗	↗	N	↘	3,8		N	NULLE
Q501H	HETEROZYGOTE	60	F	N	N	N	↘	N	3,8			↘
T556I	HETEROZYGOTE	53	H	N	↗	↗	N	↘				↘
I559N	HETEROZYGOTE	33	H	↗								↘
V571A	HOMOZYGOTE	9	F	↗	↗		↘		1,1-1,9			↘
V575G	HETEROZYGOTE	70	H	N		↗						↘
H588Leufs*5	HETEROZYGOTE	41	F	N	N	↗						NA
Δ612GR	HETEROZYGOTE	20	F		↗	N	N	↘	N			NULLE
4 bp deletion	HETEROZYGOTE	26	F	N	↗	↗			N			
D641V	HOMOZYGOTE	48	H	↗	↗	↗			↘	↗	↗	NULLE
L672P	HETEROZYGOTE	60	H	N	N	↗	↘	N	3,6			NULLE
G679S	HOMOZYGOTE	19	H	↗	↗	↗	N	↘	↘		N	↘
G679S	HETEROZYGOTE	31	F	N								
R714Q	HETEROZYGOTE	2	F	↗	↗	↗	N	↘	2,6			↘
R714Q	HETEROZYGOTE	31	F		↗	↗						
H726R	HETEROZYGOTE	30	F		↗	↗						↘
V729I	HOMOZYGOTE	6	H	N	↗	↗	↘	↘	4,4	N	↗	↘
F737L	HETEROZYGOTE	7	H	↗	↗				2,6			↘
I747M	HETEROZYGOTE	18	F	N		↗						↘
L773P	HETEROZYGOTE	29	F	↗	↗	↗						↘
L773X	HETEROZYGOTE	27	H	↗	↗		↘	↘	3,3-3,6			NULLE
TG deletion	HOMOZYGOTE	nourrisson	H	↗	↗		N	↘				NULLE

Tableau 5 : Résumé clinique des patients porteurs de mutations hétérozygotes du GR et le retentissement de ces mutations sur l'hypertension artérielle.

HTA : hypertension artérielle

↘ ; Diminuée ↗ : Augmentée ; N : normale ; H : homme ; F : femme

Le dosage des métabolites urinaires du cortisol (**Figure 28**) chez le patient porteur de la mutation hétérozygote R469X ainsi que les membres de sa famille de plus de 30 ans ont révélé des valeurs de tétrahydrocortisone (THE) /tétrahydrocortisol (THF) à 0,92, très en-dessous des valeurs de référence estimées entre 1,5 et 2,5.

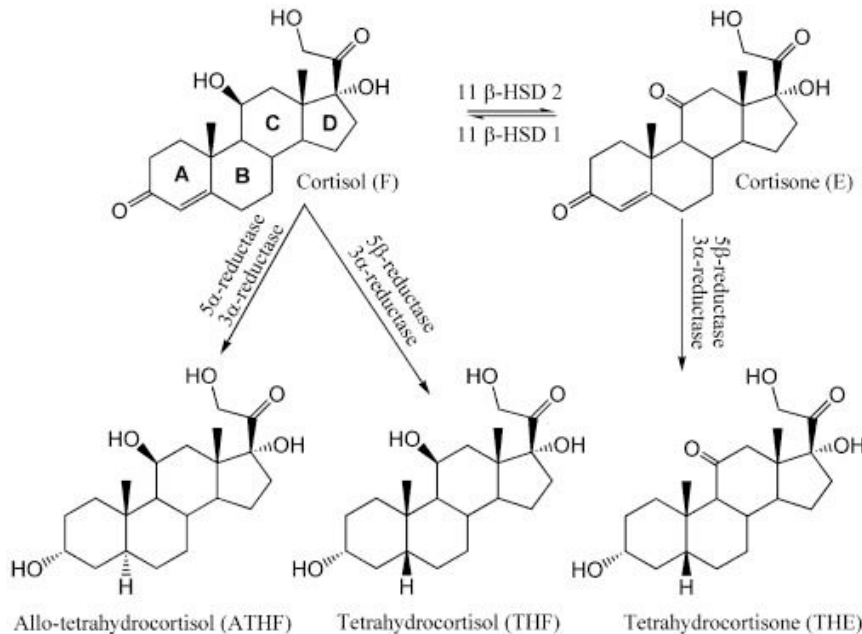


Figure 28 : Métabolites urinaires du cortisol

D'après Cuzzola et al, 2014

Plusieurs métabolites du cortisol peuvent être dosés. L'allo THF, le THF et le THE permettent d'évaluer l'activité des enzymes 11β-HSD2 et 11β-HSD1.

Pendant longtemps l'élévation du rapport urinaire (THF+ allo-THF)/THE a été utilisé comme un index global de l'activité des enzymes 11β-HSD1 et 2 (Stewart et al. 1995) alors que le rapport urinary free cortisol (UFF)/ urinary free cortisone (UFE) (Palermo et al. 1996) reflète l'activité rénale uniquement de l'enzyme 11β-HSD2, tout comme le rapport THE/THF que nous avons mesuré.

Chez le propositus porteur de la mutation hétérozygote R469X, cette mesure est en faveur d'une diminution d'activité de la 11β-HSD2 rénale.

Les diminutions d'activité de cette enzyme ont été décrites dans le cadre de mutations inactivatrices du gène *HSD11B2* responsables du syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes ou lors de l'inhibition de cette enzyme par la réglisse ou encore lorsque les concentrations circulantes de cortisol dépassent les capacités de métabolisation de l'enzyme, notamment lors de syndrome de Cushing paranéoplasique où les concentrations de cortisol sont très importantes à plus de 30 N (Stewart et al. 1995).

Nous nous sommes alors demandé si le gène *HSD11B2* n'était pas un gène cible direct du GR, comme cela avait déjà été proposé dans les cellules trophoblastiques et pulmonaires (van Beek et al. 2004; Suzuki et al. 2003). Pour répondre à cette question, nous avons cloné le promoteur *HSD11B2* humain et effectué des expériences de transfection transitoire utilisant un plasmide contenant un gène rapporteur dont l'expression est placée sous le contrôle d'un fragment de promoteur *HSD11B2*. Nous avons également étudié des cellules humaines MCF7 issues d'un cancer mammaire, exprimant de manière endogène ce gène *HSD11B2* (Voisin et al. 2017).

Article 4 : Impaired 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in
Glucocorticoid Resistant Patients

Vitellius G, Delemer B, Caron P, Chabre O, Bouligand J, Pussard E, Trabado S, Lombès M

J Clin Endocrinol Metab, 2019

Impaired 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Glucocorticoid-Resistant Patients

Géraldine Vitellius,¹ Brigitte Delemer,² Philippe Caron,³ Olivier Chabre,⁴ Jérôme Bouligand,^{1,5} Eric Pussard,^{1,5} Séverine Trabado,^{1,5*} and Marc Lombes^{1*}

Q:1,2,3

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche_S U1185, Faculty of Medicine at Université Paris-Sud, University Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France; ²Service d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Hôpital Robert Debré, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, Reims, France; ³Service d'Endocrinologie, Pôle Cardio-Vasculaire et Métabolique, Centre Hospitalier Universitaire de Larrey, Toulouse, France; ⁴Endocrinologie, Pavillon des Écrins, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Grenoble, France; and ⁵Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, F-94275, France

ORCID numbers: 0000-0003-3189-023X (M. Lombes).

Context: Six patients carrying heterozygous loss-of-function mutations of glucocorticoid (GC) receptor (GR) presented with hypercortisolism, associated with low kalemia, low plasma renin, and aldosterone levels, with or without hypertension, suggesting a pseudohypermineralocorticoidism whose mechanisms remain unclear. We hypothesize that an impaired activity of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2; encoded by the *HSD11B2* gene), catalyzing cortisol (F) inactivation, may account for an inappropriate activation of a renal mineralocorticoid signaling pathway in these GC-resistant patients.

Objective: We aim at studying the GR-mediated regulation of *HSD11B2*.

Design: The *HSD11B2* promoter was subcloned and luciferase reporter assays evaluated GR-dependent *HSD11B2* regulation, and 11 β -HSD2 expression/activity was studied in human breast cancer MCF7 cells, endogenously expressing this enzyme.

Results: Transfection assays revealed that GR transactivated the long (2.1-kbp) *HSD11B2* promoter construct, whereas a defective 501H GR mutant was unable to stimulate luciferase activity. GR-mediated transactivation of the *HSD11B2* gene was inhibited by the GR antagonist RU486. A threefold increase in *HSD11B2* mRNA levels was observed after dexamethasone (DXM) treatment of MCF7 cells, inhibited by RU486 or by actinomycin, supporting a GR-dependent transcription. Chromatin immunoprecipitation further demonstrated a DXM-dependent GR recruitment onto the *HSD11B2* promoter. 11 β -HSD2 activity, evaluated by the cortisone/F ratio, quantified by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, was 10-fold higher in the supernatant of DXM-treated cells than controls, consistent with a GR-dependent stimulation of 11 β -HSD2 catalytic activity.

Conclusion: Collectively, we demonstrate that 11 β -HSD2 expression and activity are transcriptionally regulated by GR. In the context of GR haploinsufficiency, these findings provide evidence

that defective GR signaling may account for apparent mineralocorticoid excess in GC-resistant patients. (*J Clin Endocrinol Metab* 104: 1–12, 2019)

Glucocorticoids (GCs) are steroid hormones essential for many biological functions, such as metabolism, growth, development, cell differentiation, and stress responses (1). Most of their functions are mediated by the GC receptor (GR), a nuclear receptor encoded by the *NR3C1* gene [Mendelian Inheritance in Man (MIM) #138040], located in chromosome 5 in humans. The GC resistance syndrome (online MEM #615962) is a rare clinical disorder comprising generalized, severe-to-moderate insensitivity to GC action associated with GR loss-of-function mutations. The first GR mutation was postulated in 1976 (2), and up until now, only 27 GR mutations have been described (3–5). Patients with GR mutations presented with a wide range of clinical signs, ranging from drastic phenotypes, with neonatal hypoglycemia and severe dehydration, to milder phenotypes, more recently described (6).

We recently identified five original heterozygous GR loss-of-function mutations among 100 patients presenting with incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia associated with hypertension and/or biological hypercortisolism, defined as either high urinary-free cortisol [UFF; above reference values] or upper limit of normal range, midnight serum cortisol (F) > 50 nM or serum 8-AM F > 50 nM after 1 mg dexamethasone (DXM) suppression test but without Cushing syndrome signs in Multicenter French Clinical Research Program (Muta-GR study) (3). All of these mutated patients had a GC resistance syndrome with a mild elevated UFF level (1.7 N compared with 30 N for the first patient described). We demonstrated on *ex vivo* fibroblast models that heterozygous GR missense or nonsense mutations were responsible for haploinsufficiency with a variable decrease in GR target gene expression (*FKBP5*), according to mutations. Interestingly, in the Muta-GR study, we noted that most of mutated GR patients displayed functional signs of hypermineralocorticoidism with a low kalemia, associated or not with hypertension, but a normal or low plasma aldosterone concentration. This prompted us to investigate the mechanisms of such a pseudohypermineralocorticoidism associated with *NR3C1* mutations in light of the recent literature. Among the 29 mutated patients, 11 patients were reported with high blood pressure (7–17). Based on available information, we noticed that 6 out of 15 mutated patients had a low aldosterone level, 8 out of 10 a low renin level, whereas 7 out of 15 had a low kalemia (≤ 3.5 mM). One patient with a homozygous GR loss-

of-function mutation had high plasma corticosterone and 11-deoxycorticosterone (DOC) levels accounting for hypertension (18). Excess of mineralocorticoid agonist compounds (DOC, corticosterone), initially thought to be associated with GC resistance syndrome, was generally proposed as the result of unsuppressed ACTH stimulation. However, a recent description of patients with milder phenotype (3, 7) and novel, accurate steroid measurements with mass spectrometry (MS) technologies (19) revealed normal DOC levels (four out of six patients) yet associated with clinical or biological signs of hypermineralocorticoidism. However, the pathophysiological mechanisms of the pseudohypermineralocorticoidism in a context of a GC resistance syndrome still remain under debate.

Electrolyte homeostasis is mainly controlled by the renin-angiotensin-aldosterone system (20). Aldosterone, synthesized and secreted by the adrenal cortex, is regulated by angiotensin II, serum potassium level, and renin, which are released in response to decreased renal perfusion pressure (21). Aldosterone, after binding to the mineralocorticoid receptor (MR), encoded by the *NR3C2* gene (MIM #600983) in aldosterone-sensitive distal nephron (distal tubules and cortical collecting ducts), increases potassium excretion and the activity of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel and of the sodium-potassium ATPase responsible for sodium retention. Aldosterone is the natural ligand of MR, although F has the same affinity for MR (22), but circulating F levels are ~ 100 to 1000 times higher than that of aldosterone (23). The 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2), encoded by the *HSD11B2* gene and mostly expressed in epithelial tissues (kidney, colon, placenta), constitutes a major MR-protecting mechanism (24). The 11 β -HSD2 catalyzes the interconversion of active F to inactive cortisone (E) and is therefore a gatekeeper for MR, playing a crucial role in GC metabolism affecting GC signaling in a large variety of target cells (25). Deficiency of 11 β -HSD2 has been described in pseudohypermineralocorticoidism, secondary to apparent mineralocorticoid excess (AME); in patients with congenital mutations of *HSD11B2* (26) (MIM #218030); observed in patients with licorice intoxication or pharmacological inhibition of 11 β -HSD2 (27); or in a context of ectopic ACTH syndrome (28), where defective 11 β -HSD2 allows excess F to bind and activate MR (29). Some authors have described that in families carrying *HSD11B2* mutations, activity of the 11 β -HSD2

enzyme may be reflected by measurement of the urinary F metabolites, *i.e.*, a ratio of tetrahydrocortisone/tetrahydrocortisol (25). The biological and hormonal abnormalities, discovered in patients with GR mutations, suggested a pseudohypermineralocorticism, and we hypothesized an illicit F occupancy of the MR as a result of an impairment of renal 11 β -HSD2 activity, secondary to GR haploinsufficiency.

The aim of the current study was to evaluate in the context of mutated GR patients the GR-dependent regulation of 11 β -HSD2. We examined the transactivating properties of GR on *HSD11B2* promoter regions, studied the expression and activity of this enzyme in human MCF7 cells, and provided evidence that GR transcriptionally activated **HSD11B2**, which may, at least in part, account for pseudohypermineralocorticism in GC-resistant patients.

Patients and Methods

Subjects

Five mutated GR patients were initially discovered during the Muta-GR study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02810496), a multicenter clinical research program (3). GR mutations were identified by the Sanger method. The presence of hypertension was defined as systolic blood pressure >140 mmHg, diastolic blood pressure \geq 90 mmHg, and/or patients under any current anti-hypertensive therapy (3). The study protocol conformed to the ethics guidelines in accordance with the Declaration of Helsinki, was approved by the Comité de Protection des Personnes Est III on 12 August 2011. A patient with a heterozygous Y660X mutation was incidentally discovered during her follow-up by an endocrinologist. Blood samples were analyzed in each hospital. Serum F, DOC, E, and corticosterone levels were quantified with liquid chromatography (LC)-tandem MS (MS/MS) (19).

HSD11B2 reporter gene constructs

Short (0.5 kbp) and long (2.1 kbp) *HSD11B2* promoter regions were amplified by PCR from human genomic DNA by using forward and reverse primers in which *Xho*I and *Hind*III restriction sites were introduced at their 5'-ends for the 0.5-kbp promoter region and *Kpn*I and *Hind*III for the 2.1-kbp promoter region, respectively. DNA sequences were introduced into the PGL4.16 vector (Promega, Madison, WI) containing the gene for Firefly luciferase, as previously described (30, 31). Construct sequences were verified by sequencing (Eurofins, Ivry sur Seine, France).

Site-directed mutagenesis

pcDNA₃hGR α Q501H (c.1503 G>T, p.Q501H) was obtained using the Quick Change Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) with pcDNA₃hGR α (NM_000176.2) as a template.

Cell culture

Human embryonic kidney (HEK)293T cells (32) and human breast cancer MCF7 cells (33) (ATCC®HTB-22™) were

grown in DMEM-F12 (Life Technologies, Saint Aubin, France), 10% fetal calf serum (Biowest, Nuaille, France), and penicillin/streptomycin (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Transactivation assays

HEK293T cells (32) were transfected with wild-type (WT; pcDNA₃hGR α) or mutated GR-expressing plasmids (pcDNA₃hGR α Q501H; 0.04 μ g/well of 96-well plates), a reporter **HSD11B2**-luciferase plasmid (0.04 μ g/well), and pMIR Q:11 β -galactosidase (β -gal) encoding the β -gal used as a normalizing vector (0.035 μ g/well) using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Saint Aubin, France). Six hours after transfection, medium was replaced with steroid-free medium. Twenty-four hours post-transfection, cells were treated with ethanol or increasing concentrations of DXM (10^{-8} to 10^{-6} M), associated with or without GR antagonist RU486 (10^{-6} M). Luciferase and β -gal activities were measured in cell lysates, as previously described (7).

RNA extraction and real-time quantitative PCR

MCF7 cells (33) were treated with ethanol or 10^{-7} M DXM at different periods of time. Cotreatment with actinomycin D (10^{-6} M) or RU486 (10^{-6} M) was also performed. Total RNA was extracted with the TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc., Euromedex, Mundolsheim, France), according to the manufacturer's recommendations. Total RNA extraction, reverse transcription, and real-time quantitative (q)PCR were performed essentially as previously described (7). cDNA samples were amplified by real-time qPCR by use of the QuantStudio 6 flex system. All samples were quantified in duplicates. Relative expression in a given sample was normalized to the internal reference *36B4* mRNA values, where the control condition values are arbitrarily set at 1. Results are expressed as means \pm SEM of at least six independent samples performed in duplicates.

Primer design for real-time qPCR assays

Primer pairs encompassing the targeted regions were designed by using Primer Blast software (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD). Primers were provided from Eurogentec (Seraing, Belgium), purified by the selective precipitation-optimized process, desalted, and delivered at a 100- μ M concentration in water. Primer sequences are available [see Vitellius *et al.* (31)].

Chromatin immunoprecipitation assays

MCF7 cells (33), previously starved from steroids the preceding 24 hours, were incubated with 10^{-7} M DXM or vehicle for 1 hour at 37°C. Cells were fixed with 1.1% paraformaldehyde for 5 minutes at room temperature. Paraformaldehyde fixation was quenched with 0.125 M glycine for 5 minutes, as previously described (34). Cells were rinsed once with ice-cold PBS. Cell lysis and chromatin shearing were performed with iDeal ChIP for transcription factor buffers (Diagenode, Seraing, Belgium), according to the manufacturer's recommendations and using 7 μ g of the GR antibody [SC393232X (35)]; rabbit control IgG, provided in the kit, was used as a negative immunoprecipitation control, as previously described (34). DNA samples obtained were amplified by

qPCR, using primers encompassing targeted regions of the *HSD11B2* promoter with a putative identified GC response element (GRE) (31).

Results of qPCR were expressed as fold recruitment, normalized to input samples, and expressed as means \pm SEM of three independent experiments.

Assessing 11 β -HSD2 activity by LC-MS/MS

MCF7 cells (33) were treated with ethanol or 10⁻⁷ M DXM for 24 hours. After PBS washes, cells were treated with 10⁻⁷ M F for an additional 24-hour period. Cell supernatants were recovered to quantify F and E concentrations by using the LC-MS/MS method (19). Results are expressed as E/F ratio and are means \pm SEM of six independent measurements.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Statistical significance was calculated using nonparametric Mann-Whitney *U*-tests. A value of *P* < 0.05 was considered significant.

Results

Characteristics of patients with heterozygous GR mutations

Table 1 summarizes clinical, biochemical, and hormonal characteristics of six patients carrying heterozygous GR mutations. Three patients harbored a heterozygous nonsense GR mutation (R469X, R491X, Y660X), whereas the others carried a heterozygous missense GR mutation (R477S, Q501H, L672P). Patients with heterozygous R469X, R477S, and Y660X mutations displayed high blood pressure and were under anti-hypertensive therapy, with normal–low or low kalemia, low plasma renin level (except the patient harboring the R477S mutation, treated by angiotensin-converting enzyme inhibitor), and normal–low plasma aldosterone concentration (except for the patient harboring the Y660X mutation who was under aldosterone antagonist therapy). Interestingly, plasma DOC levels were in the normal range for all patients in whom this steroid concentration was measured. Patient with the heterozygous R469X mutation had, in addition, low urinary F ratio metabolites (7). The patient with a Y660X mutation was treated by anti-hypertensive drugs that render difficult accurate interpretation of biological parameters. This patient had a below-normal plasma E/F ratio but normal urinary-free E (UFE)/UFF metabolite (36) values, as measured by LC-MS/MS. Patients harboring Q501H and L672P mutations were normotensive, associated with normal kalemia and plasma renin level but low aldosterone level.

The patient with the heterozygous R491X mutation was normotensive with normal kalemia but low plasma aldosterone and renin levels, whereas his plasma DOC and corticosterone concentrations were in the normal

range. The plasma E/F ratio was low for the patient harboring the R477S mutation but normal for the patient harboring the heterozygous R491X mutation (37). *Ex vivo* experiments on patients' fibroblast cultures allowed us to explore the integrity of DXM-induced GC signaling. Indeed, after 6 hours of DXM treatment, we observed that the endogenous GR target gene *FKBP5* mRNA levels were induced in fibroblasts of patients carrying the heterozygous GR mutation but statistically lower than that observed in fibroblasts of control patients. These data are consistent with a GR haploinsufficiency, which was much more pronounced in fibroblasts carrying the heterozygous Q501H GR mutation (Table 1).

GC stimulates *HSD11B2* promoter activity

To explore whether GR haploinsufficiency may be involved in the pathogenesis of pseudohypermineralocorticoidism and to determine if altered GR signaling might impact 11 β -HSD2 expression, we first examined the potential GR-dependent regulation of the *HSD11B2* gene. We subcloned a 2.1-kbp human *HSD11B2* promoter sequence into a luciferase reporter gene plasmid and studied the ability of GR to transactivate a *HSD11B2*-driven reporter gene. Transient cotransfection assays were performed with a *HSD11B2* promoter-reporter plasmid and a plasmid encoding WT or mutant GR (plasmid encoding for Q501H GR) in HEK293T cells (32) (Fig. 1A and 1C). Twenty-four hours after treatment with increasing DXM concentrations, luciferase activity dose dependently increased in the presence of WT GR and reached a plateau with a maximum activity at 10⁻⁷ M (2.135 \pm 0.200-fold) compared with vehicle condition (*P* < 0.0001). *HSD11B2* promoter-driven luciferase activity was totally inhibited by cotreatment with the GR antagonist RU486 (Fig. 1B). pcDNA₃hGR α Q501H encoding the Q501H GR mutant is associated with a robust haploinsufficiency on the *ex vivo* patient fibroblast model (see Table 1) but retains the ability to transactivate the mouse mammary tumor virus-driven reporter gene upon transient transfection (31) in sharp contrast with other GR mutants (R469X, R477S, R491X, Y660X, and L672P) that were unable to transactivate the mouse mammary tumor virus-driven reporter gene (38). However, when such a defective Q501H GR was transfected with the *HSD11B2* promoter construct, luciferase activity was no longer stimulated by DXM treatment (Fig. 1C), consistent with a GR-dependent activation of the *HSD11B2* promoter.

GC stimulates *HSD11B2* mRNA levels in MCF7 cells

To investigate further whether GR might affect endogenous *HSD11B2* expression and 11 β -HSD2 activity,

Table 1. Clinical, Biochemical, and Hormonal Characteristics of Patients Harboring Heterozygous GR Mutations: Identification of GR Haploinsufficiency in the Corresponding Skin Fibroblasts

	Patient Mutations	R469X	R477S	R491X	Q501H	Y660X	L672P	Normal Range
Clinical	Sex	M	F	M	F	F	M	
	Age at Diagnosis	46	50	44	60	70	46	
	High Blood Pressure	+	+	–	–	+	–	
Biochemical	Anti-hypertensive Treatment	+	+	–	–	+	–	
	K ⁺ , mM	ACE inhibitor	ACE inhibitor			Aldosterone antagonist and ACE inhibitor		
Hormonal	Renin, pg/mL	3.5	3.5	3.8	3.8	3.3	3.6	3.5–4.5
	Aldosterone, pg/mL, nM	2.5	212.7	2	7	NA	12	3.0–33.0
	DOC, ng/mL, nM	22 (0.061)	16.6 (0.046)	20 (0.055)	<27 (<0.075)	110 (0.305)	1 (0.003)	97–626 (0.269–1.737)
	Cortisol, ng/mL, nM	0.04 (0.012)	0.069 (0.021)	0.051 (0.015)	NA	0.02 (0.06)	NA	0.04–0.2 (0.012–0.61)
	Cortisol, ng/mL, nM	NA	2.2 (6.35)	3.6 (10.39)	NA	4.91 (14.17)	NA	<3.9 (<11.20)
	8-AM serum F, ng/mL, nM	213 (587)	213 (587)	135 (371)	116 (320)	216 (595)	259 (715)	90–230 (248–632)
	Plasma E, ng/mL, nM	NA	24.0 (66.5)	27.5 (76)	NA	26.4 (73.2)	NA	10.1–32.6 (28.1–90.4)
	Plasma E/F ratio	NA	0.113	0.204	NA	0.122	NA	0.14–0.22
	Urinary F metabolites	THE/THF: 0.92	NA	NA	NA	UFE/UFF: 1.77	NA	THE/THF: 1.5–2.5; UFE/UFF: 1.68–2.02
	Ex vivo experiments	% DXM inhibition on FKBP5	50%	77.3%	68.7%	98.7%	NA	NA

The estimation of GR haploinsufficiency was determined in patients' fibroblasts, as assessed by the inhibition of mRNA levels of FKBP5 in response to 6 hours DXM treatment compared with 100% induction in control fibroblasts. Conversion to International System of Units: ng/mL = [1/molar mass (MIM)] × 10³ nM; pg/mL = (1/MIM) nM; aldosterone: 360.44 g/mol; corticosterone: 346.46 g/mol; F: 362.42 g/mol; E: 360.45 g/mol; DOC: 330.46 g/mol. Normal range of plasma E/F ratio, according to Eisenhofer et al. (37).

Abbreviations: ACE, angiotensin-converting enzyme; F, female; K⁺, plasma potassium concentration; M, male; NA, not available; THE/THF, tetrahydrocortisone/tetrahydrocortisol (normal values: 1.5–2.5); UFE/UFF, urinary-free E/UFF [normal values: 1.68–2.02 from (36)]; +, presence of high blood pressure or an anti-hypertensive treatment; –, absence of such conditions.

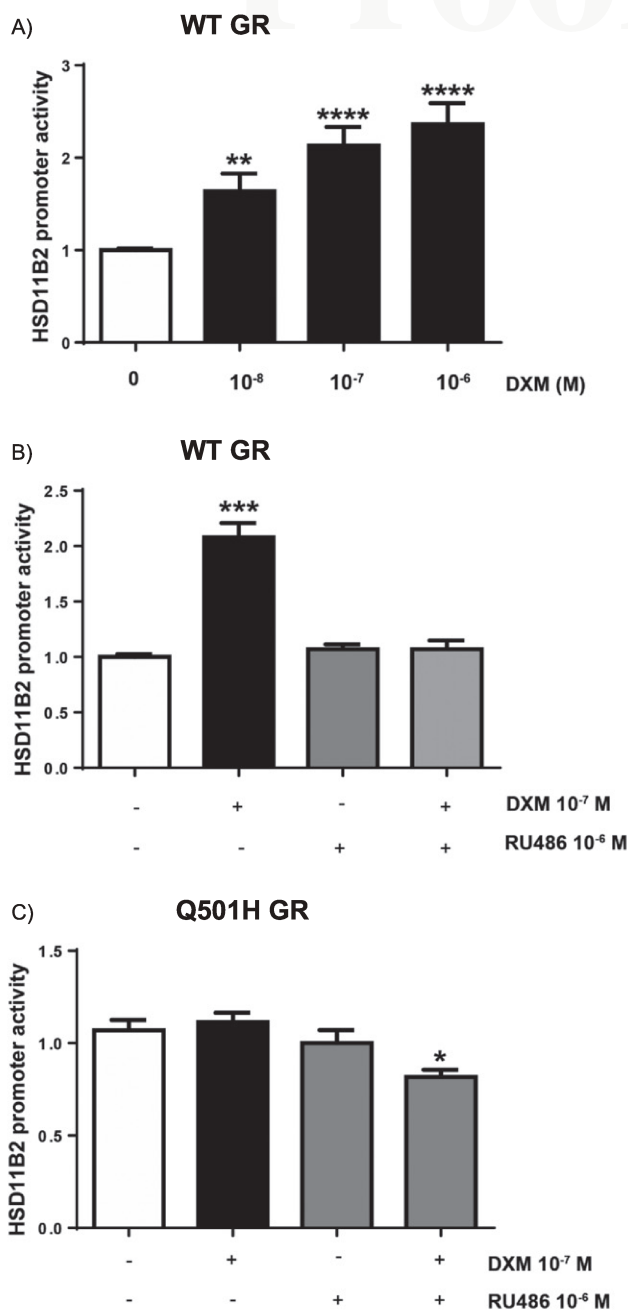


Figure 1. The human *HSD11B2* promoter is inducible by DXM. (A) HEK293T cells were cotransfected with plasmids encoding WT GR, luciferase reporter gene driven by human *HSD11B2* promoter construct, and β -gal plasmids. Cells were treated with increasing concentrations of DXM for 24 hours. Luciferase activity was normalized to β -gal. Data are means \pm SEM of four independent experiments. Transcriptional activity is expressed relative to the basal transcriptional activity obtained for vehicle, arbitrarily set at one. Statistical significance was calculated with the nonparametric Mann-Whitney *U* tests, compared with the vehicle condition. **** P < 0.0001 and ** P < 0.01. (B) HEK293T cells were cotransfected as above with WT GR expressing plasmid and treated with DXM (10^{-7} M) or vehicle in the presence or absence of RU486 (10^{-6} M) for 24 hours. Transcriptional activity is expressed relative to the basal transcriptional activity obtained for vehicle, arbitrarily set at one. Data are means \pm SEM of two independent experiments performed in eight independent determinations. Statistical significance was calculated with the nonparametric Mann-Whitney *U* tests, compared with each vehicle condition. **** P < 0.001. (C)

we studied GR-dependent *HSD11B2* regulation in human breast cancer MCF7 cells (33), a cell-based system previously shown to express substantial *HSD11B2* (39) but very little *HSD11B1* expression (31). Expression of both GR and *HSD11B2* was confirmed by RT-PCR in MCF7 cells (31). A time-dependent increase in the *HSD11B2* mRNA expression was measured in MCF7 cells (33) treated with 10^{-7} M DXM, reaching a significant 3.46 ± 0.34 -fold factor at 24 hours (P < 0.001) and a maximum induction at 4.77 ± 0.77 -fold at 48 hours (P < 0.001) compared with vehicle condition, arbitrarily set at one (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B, *HSD11B2* mRNA induction was GR dependent, as DXM-induced *HSD11B2* expression was totally abolished in the presence of the GR antagonist RU486. We further demonstrated that DXM-*HSD11B2* induction was the result of transcriptional activation, as shown by the lack of the DXM effect when cells were treated with the transcription inhibitor actinomycin D for 6 hours, consistent with a GR-dependent transcriptional activation of the *HSD11B2* gene in these human cells.

Q:12

DXM treatment increases 11 β -HSD2 activity in MCF7 cells

We next wondered whether DXM-stimulated endogenous *HSD11B2* mRNA expression was translated into an increase of 11 β -HSD2 activity, owing to the possibility of a dissociation between *HSD11B2* mRNA and protein activity (40). As a result of the lack of robust anti-11 β -HSD2 antibody, we were unable to demonstrate an increased 11 β -HSD2 protein level. However, 11 β -HSD2 catalytic activity was evaluated by the examination of the enzymatic conversion of F to E in human MCF7 cells by LC-MS/MS. To this aim, MCF7 cells (33) were preincubated or not with DXM (10^{-7} M) for 24 hours and subsequently treated with F for an additional 24-hour period, after which F and E concentrations were measured in the cell supernatants by LC-MS/MS. As illustrated in Fig. 3A, when cells were treated with vehicle, F concentration was measured at 103.2 ± 27.0 nM, whereas it was reduced to 9.0 ± 3.1 nM when cells were pretreated with DXM, consistent with an almost complete F inactivation after 24 hours of DXM treatment in MCF7 cells. Thus, the E/F ratio was increased at 7.60 ± 1.30 (P = 0.0022), whereas it was at 0.78 ± 0.19 under basal conditions in untreated MCF7 cells, demonstrating a DXM-dependent increase in endogenous 11 β -HSD2 activity.

Q:13

Figure 1. (Continued). HEK293T cells were cotransfected as above with defective Q501H GR-expressing plasmid and treated as described above. Data are means \pm SEM of two independent experiments performed in eight independent determinations. Statistical significance was calculated with the nonparametric Mann-Whitney *U* tests, compared with each vehicle condition. * P < 0.05.

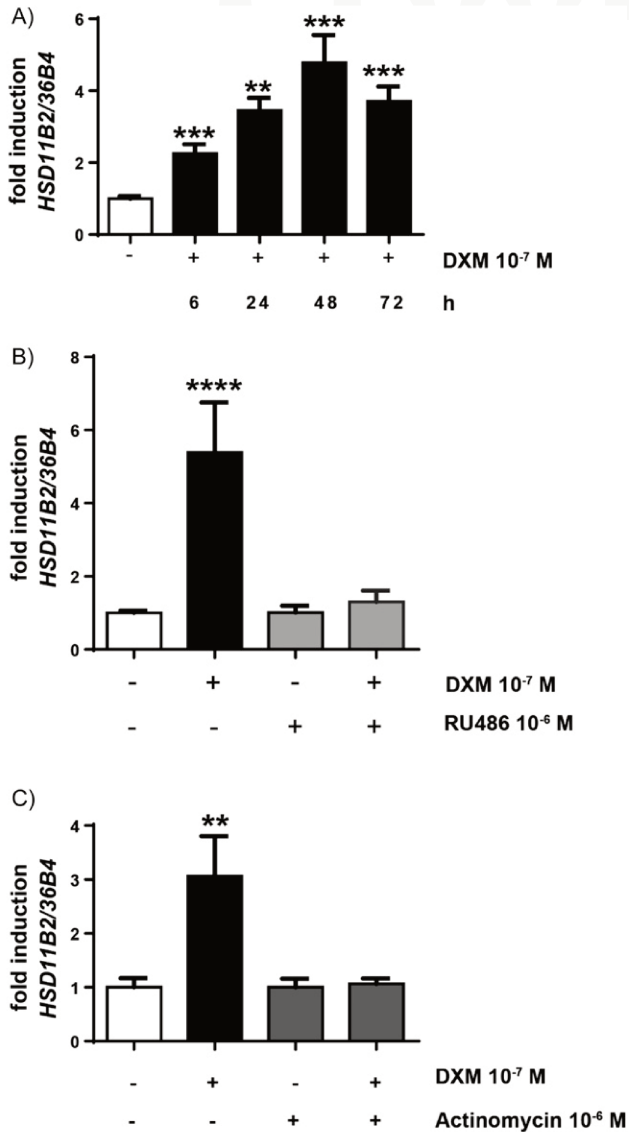


Figure 2. **HSD11B2** mRNA expression was induced by DXM in human MCF7 cells. (A) Time-dependent induction of **HSD11B2** mRNA levels. MCF7 cells were treated for different periods of time (from 0 to 72 hours) with vehicle or 10⁻⁷ M DXM, and 11 β -HSD2 expression was determined by qRT-PCR, as described in Patients and Methods. Relative expression is normalized to the basal expression, arbitrarily set at one. Data are means \pm SEM of three independent determinations, compared with vehicle condition. ***P < 0.01 and ****P < 0.0001, nonparametric Mann-Whitney U tests. (B) GR-dependent induction of 11 β -HSD2 in MCF7 cells. MCF7 cells were treated with vehicle or with DXM 10⁻⁷ M for 24 hours in the presence or absence of the GR antagonist RU486 at 10⁻⁶ M. Data are means \pm SEM of three independent determinations, compared with each vehicle condition. ****P < 0.0001, nonparametric Mann-Whitney U tests. (C) MCF7 cells were treated with vehicle or DXM 10⁻⁷ M in the presence or absence of actinomycin 10⁻⁶ M for 6 hours. Data are means \pm SEM of three independent determinations, compared with each vehicle condition. **P < 0.005, nonparametric Mann-Whitney U tests.

GR binding to GREs on the **HSD11B2** promoter

To induce gene transcription, GR may directly interact with GREs located onto target gene promoters. A GRE is defined as a 15-bp motif composed of two inverted, 6-bp

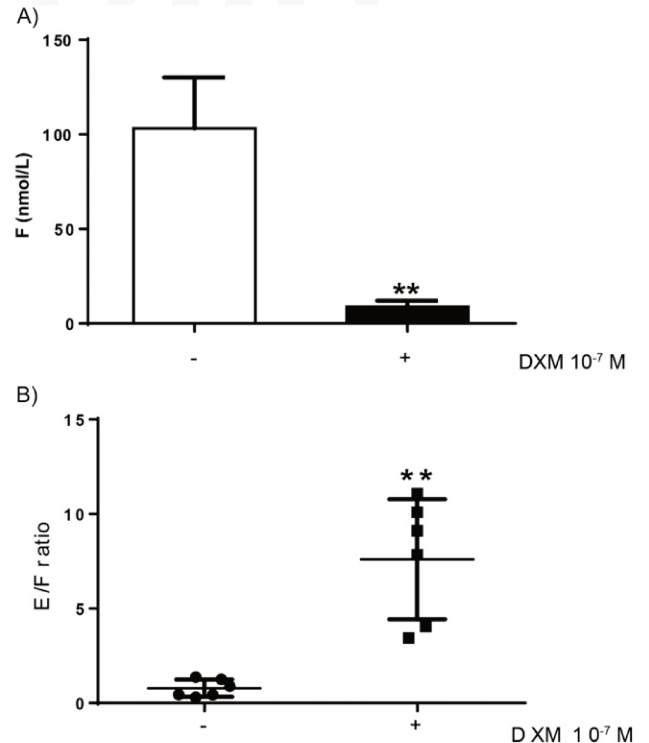
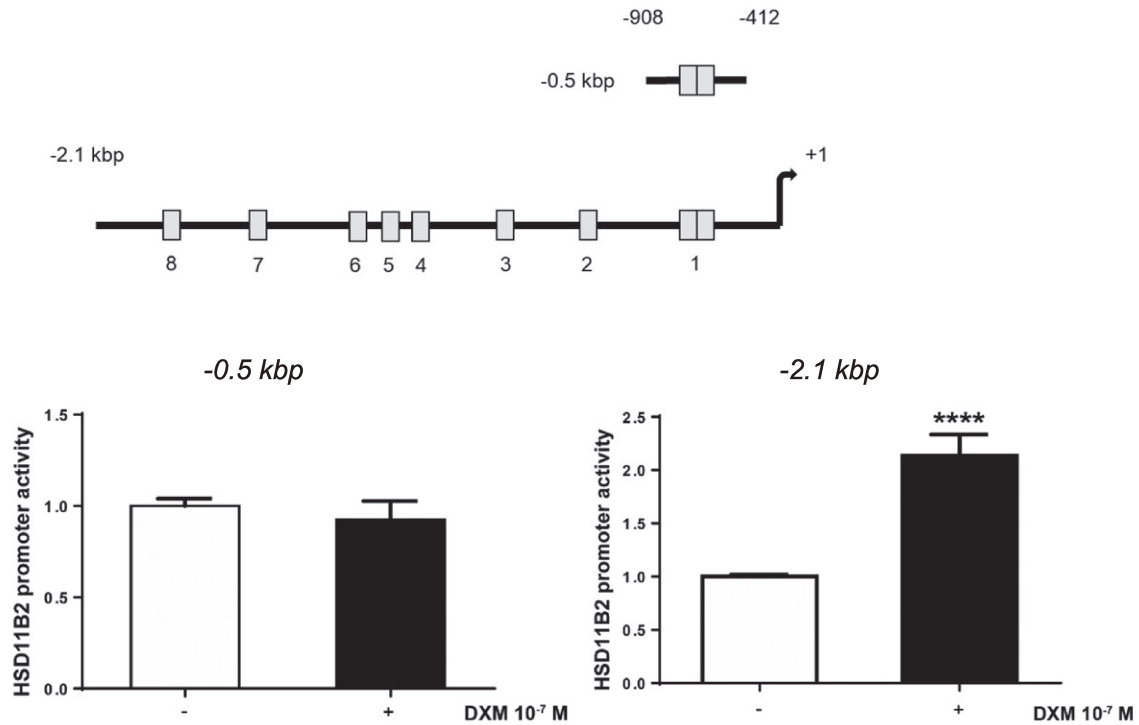


Figure 3. 11 β -HSD2 catalytic activity in human MCF7 cells. MCF7 cells were treated with vehicle or DXM 10⁻⁷ M for 24 hours. Subsequently, untreated or DXM-treated cells were incubated with F 10⁻⁷ M for 24 hours, and the production of E was measured in the cell supernatant by LC-MS/MS, as described in Patients and Methods. Data are means \pm SEM of six independent determinations. **P < 0.01, nonparametric Mann-Whitney U tests. (A) Significant disappearance of F levels in DXM-treated MCF7 cells. (B) Significant increase in the E/F ratio in the supernatant of DXM-pretreated MCF7 cells.

palindromic half-sites AGAACA, separated by any three base pairs (41). We search for the presence of the GRE on the *HSD11B2* promoter by using JASPAR software (42) and identify *in silico* one putative full GRE site (GRE1; 5'-AGGACAnnTGGTCC-3') at position -857, -841 in the *HSD11B2* promoter, with a predicted score of 9.670 and seven degenerated GRE sites with lower JASPAR scores (Fig. 4B). We first studied if GR was able to transactivate the *HSD11B2* promoter constructs. As shown in Fig. 4A, bottom, luciferase activity, driven by the short, 0.5-kbp construct containing the GRE1 sequence, was not induced upon DXM treatment, whereas the longer, 2.1-kbp **HSD11B2** luciferase reporter gene was fully responsive to DXM treatment upon transient transfection of the WT GR, with a significant twofold increase in normalized luciferase activity.

We next evaluated whether GR was recruited onto the *HSD11B2* promoter by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. To this aim, MCF7 cells were treated with DXM 10⁻⁷ M or vehicle for 1 hour. As shown in Fig. 4C, a significant 4.0 \pm 0.4 (P = 0.0159)- and 4.4 \pm 1.4 (P = 0.0286)-fold increase in GR recruitment was

A)

HSD11B2, hg19, Chromosome 16 position

B)

	Predicted GRE	Start	End	Jaspar Score
1	AGGACAGGGTGGTCC	-841	-857	9.670
2	GTGACAGGGAGTCCA	-1178	-1192	8.588
3	GGCACACAAGGTCAT	-1494	-1509	7.787
4	AAGCCACAGAGTCCC	-1535	-1549	6.720
5	GAGGCAGGATGACCC	-1658	-1672	7.616
6	GGTTCTATCTGTGTT	-1944	-1958	5.309
7	GTGGCACGAGGTTCCA	-2173	-2187	5.280
8	TAACCACCTTGACT	-2386	-2400	4.585

C) ChIP

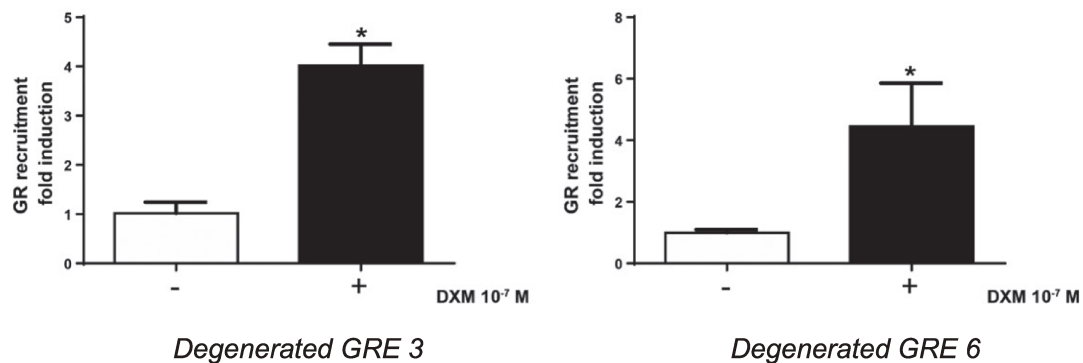


Figure 4. Direct interaction of GR on the human *HSD11B2* promoter region. (A) Schematic representation of the *HSD11B2* promoter region and of the long (2.1-kbp) and short (0.5-kbp) plasmid constructs of reporter luciferase genes. One full GRE (-841 bp upstream of the first exon, where +1 indicates the putative transcription initiation site), illustrated by two squares and seven degenerated GRE sites (numbered 2 to 8) represented as one square, were identified within the 2.1-kbp of the *HSD11B2* promoter region located on human chromosome 16 between 67 462–936 and 67 465–936 bp. Online JASPAR software was used to predict putative *NR3C1* binding sites (GRE) (42). (Bottom) HEK293T cells

observed, as determined by qPCR analysis using primers encompassing GRE3 and GRE6 sequences, respectively. DXM-dependent GR recruitment was only observed onto GRE3 and GRE6 but not on all other GREs located in the *HSD11B2* promoter. In parallel experiments, a fold induction of 5.9 ± 1.6 ($P = 0.0152$) was observed for GR recruitment onto a *PER1* genomic target, used as positive control (31), whereas the lack of GR recruitment was demonstrated after DXM treatment onto the negative control *SCNN1A* genomic target (31, 43).

Discussion

Patients harboring heterozygous GR loss-of-function mutations frequently present with clinical, biological, and hormonal signs, compatible with a reduced renal 11β -HSD2 activity responsible for pseudohypermineralocorticoidism. The aim of the current study was to decipher the mechanisms by which altered GR signaling might affect 11β -HSD2 activity and thereby, account for F-induced renal MR activation.

In the current study, we showed that all mutated GR patients display complete or partial signs of defective 11β -HSD2 activity, suggesting a mild phenotype of AME or nonclassical AME, as recently described by Tapiacastillo *et al.* (44). Out of six patients carrying heterozygous GR loss-of-function mutations, reported in our study, three patients exhibit all signs of pseudohypermineralocorticoidism associating high blood pressure and low renin levels. Three other patients were normotensive but displayed renin-angiotensin-aldosterone system abnormalities, either a low plasma renin level or low plasma aldosterone concentration, in the absence of any anti-hypertensive treatment. Mineralocorticoid-related sodium retention and volume expansion exert a negative feedback on renin release, whereas hypokalemia negatively regulates aldosterone secretion. Even though low circulating aldosterone levels were measured in two patients (heterozygous Q501H and L672P mutation carriers) without overt hypokalemia or decreased renin

level (heterozygous R491X mutation patient), these abnormalities may reflect inappropriate F renal MR activation. However, high blood pressure is not always observed and may be largely dependent on the degree of the *HSD11B2* defect, *i.e.*, on the nature of *HSD11B2* mutations, as recently exemplified by Carvajal *et al.* (45). These authors reported two homozygous patients and their respective families carrying heterozygous missense *HSD11B2* mutations that were normotensive with no biological abnormality (normal kalemia, aldosterone, and renin activity). Thus, even in the absence of arterial hypertension, all patients exhibited moderate-to-severe pseudohypermineralocorticoidism.

The clinical evolution of 11β -HSD2-deficient patients with respect to a future potential emergence of high blood pressure and associated cardiovascular risks is rather unpredictable. Defective 11β -HSD2 activity could be an important factor for high blood pressure development (46) and may predispose to hypertension, particularly when patients are treated by exogenous GCs (20). Given that the 11β -HSD2 activity seems to decrease with aging and that patients could develop high blood pressure later (47), we propose that mutated GR patients should be carefully followed up, as long-term consequences of high blood pressure are well established. In addition, it is also well recognized that sustained MR activation, as observed in patients with hyperaldosteronism (48), is associated with higher cardiovascular morbidity and mortality than patients with essential hypertension. Thus, a longitudinal study of index cases of GR mutations and their family members seems to be required to evaluate the long-term effects of impaired 11β -HSD2 activity and to assess potential higher incidence of cardiovascular or renal outcomes.

In this context of various clinical and biological signs of pseudohypermineralocorticoidism associated with GR haploinsufficiency, an impairment of *HSD11B2* in such patients was hypothesized. Experiments performed in human breast cancer cell line MCF7, a well-known model used to study *HSD11B2* regulation (39, 49,

Figure 4. (Continued). were cotransfected with plasmids encoding WT GR and the (left) short 0.5 kbp of the *HSD11B2* gene linked to reporter luciferase plasmid p11 β -HSD2-luc (promoter fragment localized between 67 464 536 and 67 465 036 bp) or the (right) long 2.1 kbp of the *HSD11B2* gene linked to reporter luciferase plasmid p11 β -HSD2-luc (promoter fragment localized between 67 462 936 and 67 465 036 bp) and β -gal. Cells were treated by DXM 10^{-7} M for 24 hours. Luciferase activity was normalized to β -gal. Data are means \pm SEM of one determination for the short promoter fragment and two independent determinations for the long promoter fragment performed in six replicates. Transcriptional activity is expressed relative to the transcriptional activity obtained with vehicle condition, arbitrarily set at one. Statistical significance was calculated with the nonparametric Mann-Whitney *U* tests, compared with the vehicle condition. **** $P < 0.0001$. (B) Predicted GRE site sequences in the 2.1-kbp *HSD11B2* promoter, identified by JASPAR. Online JASPAR software was used to predict putative GR-binding sites (GREs) (42). The JASPAR score used bioinformatics analysis, giving a probability that transcription factors bind response element, present in a defined DNA sequence. (C) GR recruitment on GRE containing the *HSD11B2* promoter, as assayed by chromatin immunoprecipitation (ChIP). As described in Patients and Methods, MCF7 cells were fixed and lysed, and ChIP was performed using an anti-GR antibody (35). After elution, immunoprecipitated DNA was analyzed and quantified by real-time qPCR using primers for the genomic fragment encompassing degenerated GRE3 and GRE6 in the promoter region of the *HSD11B2* gene. Data are means \pm SEM of three independent determinations, compared with vehicle condition. * $P < 0.05$, using the nonparametric Mann-Whitney *U* tests.

Q:14

Q:23

50), unambiguously demonstrate that GR regulates *HSD11B2* gene transcription, leading to an increase of both 11 β -HSD2 expression and activity. The positive relationship between *HSD11B2* mRNA induction and 11 β -HSD2 activity, found in the current study, on *in vitro* experiments, is in accordance with *in vivo* previous data reported by Quinkler *et al.* (51), showing a direct correlation between *HSD11B2* mRNA expression in kidney biopsies of 95 patients and the UFF/UFE ratio, used as a surrogate marker of renal 11 β -HSD2 activity.

With respect to the underlying regulatory mechanisms involved in defective 11 β -HSD2 activity in mutated GR patients, ChIP experiments allow us to identify two degenerated GRE half-sites within *HSD11B2* promoter regulatory sequences on which GR was recruited. Even though *HSD11B2* regulation may be cell specific (52), it has been previously reported a GR-dependent *HSD11B2* regulation in human-isolated trophoblasts (53) and in human bronchial epithelial cell line BEAS-2B (54). Nevertheless, further studies are needed to determine whether GR regulation might differ from human breast cancer cells and renal cells.

Indeed, besides GR, *HSD11B2* gene expression is also regulated by other transcription factors (49, 50), such as Sp1, Sp3, nuclear factor κ B, and nuclear factor 1. Moreover, the presence of *HSD11B2* polymorphisms (20) might modulate 11 β -HSD2 activity. Mariniello *et al.* (55) show that the G534A and C468A polymorphisms in exon 2 of the *HSD11B2* gene had a high prevalence in hypertensive patients, which presented with a significantly higher UFF/UFE ratio, suggesting the involvement of these polymorphisms in decreased 11 β -HSD2 activity. The G126A and G209A variants, located in the 5'-regulatory region of the *HSD11B2* promoter, were also associated with lower 11 β -HSD2 activity (higher urinary F/E ratio) and often occurred at a higher frequency in salt-sensitive subjects (49).

Finally, *HSD11B2* promoter methylation also regulates *HSD11B2* expression and subsequently, 11 β -HSD2 activity. Friso *et al.* (56) show a significantly higher *HSD11B2* promoter methylation in patients with high blood pressure induced by GC therapy compared with patients with essential hypertension. A positive correlation between the THF/TFE ratio (>1.5) and *HSD11B2* promoter methylation was demonstrated, suggesting that beside GR regulation, epigenetic control of *HSD11B2* gene expression might be related to hypertension.

Our study has some limitations. Two out of three mutated GR patients had a low E/F ratio, whereas this ratio was in the normal range for one patient. However, it seems to be more relevant to evaluate 11 β -HSD2 activity in mutated GR patients by the measurement of the urinary F/E ratio as an index of 24-hour renal conversion of F to E

associated with plasma aldosterone, renin levels, and kalemia rather than a unique assessment of the plasma F/E ratio, clearly reflecting a combination of renal 11 β -HSD2 activity, as well as liver or fat 11 β -HSD1 activity. Such a parameter was low for two other patients, whereas normal in one mutated GR patient. Another limitation is that the sodium and potassium intakes of the patients were not normalized before assessment of biological parameters. However, the phenotype of GC-resistant patients does not entirely rely on GR haploinsufficiency, seen in fibroblasts of patients harboring GR mutations.

In summary, we demonstrated that *HSD11B2* is a target gene of GR, at least in part, related to GR binding onto two degenerated GREs identified in the *HSD11B2* promoter. Thus, in patients carrying GR loss-of-function mutations who presented with GR haploinsufficiency, this may lead to a decrease of renal 11 β -HSD2 activity, responsible for MR activation by nonmetabolized GC excess. Our results have important clinical implications. Long-term consequences of altered GR signaling, as a result of *NR3C1* mutations associated with a sustained increase in plasma GC levels, should be evaluated in such patients through a careful follow-up, notably with respect to the cardiovascular system and the possibility of appropriate therapeutic strategies.

Acknowledgments

Financial Support: G.V. is the recipient of a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was supported, in part, by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and Université Paris-Sud. Q:15

Clinical Trial Information: ClinicalTrials.gov no. NCT02810496 (registered 16 June 2016). Q:16

Additional Information

Correspondence and Reprint Requests: Marc Lombes, MD, PhD, Inserm U1185, Faculté de Médecine Paris-Sud, 63, rue Gabriel Péri, F-94276, Le Kremlin Bicêtre, Cedex, France. E-mail: marc.lombes@u-psud.fr. Q:17

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose. Q:18

Data Availability: All data generated or analyzed during this study are included in this published article or in the data repositories listed in the References.

References and Notes

- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):518–530.
- Vingerhoeds AC, Thijssen JH, Schwarz F. Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976;43(5):1128–1133.
- Vitellius G, Trabado S, Hoefel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, Decoudier B, Guiochon-Mantel A, Lombes M, Delemer B;

- Investigators of the MUTA-GR Study. Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(4):411–423.
4. Molnár Á, Patócs A, Likó I, Nyíró G, Rác K, Tóth M, Sármán B. An unexpected, mild phenotype of glucocorticoid resistance associated with glucocorticoid receptor gene mutation case report and review of the literature. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):37.
 5. Al Argan R, Saskin A, Yang JW, D'Agostino MD, Rivera J. Glucocorticoid resistance syndrome caused by a novel NR3C1 point mutation. *Endocr J.* 2018;65(11):1139–1146.
 6. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M. Pathophysiology of glucocorticoid signaling. *Ann Endocrinol (Paris).* 2018;79(3):98–106.
 7. Bouligand J, Delemer B, Hecart A-C, Meduri G, Viengchareun S, Amazit L, Trabado S, Fève B, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M. Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PLoS One.* 2010;5(10):e13563.
 8. Roberts ML, Kino T, Nicolaides NC, Hurt DE, Katsantoni E, Sertedaki A, Komianou F, Kassiou K, Chrousos GP, Charmandari E. A novel point mutation in the DNA-binding domain (DBD) of the human glucocorticoid receptor causes primary generalized glucocorticoid resistance by disrupting the hydrophobic structure of its DBD. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):E790–E795.
 9. Karl M, Lamberts SW, Koper JW, Katz DA, Huizenga NE, Kino T, Haddad BR, Hughes MR, Chrousos GP. Cushing's disease preceded by generalized glucocorticoid resistance: clinical consequences of a novel, dominant-negative glucocorticoid receptor mutation. *Proc Assoc Am Physicians.* 1996;108(4):296–307.
 10. Mendonca BB, Leite MV, de Castro M, Kino T, Elias LLK, Bachega TAS, Arnhold IJP, Chrousos GP, Latronico AC. Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1805–1809.
 11. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, Constantine K, Taylor SI, Chrousos GP. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest.* 1991;87(2):680–686.
 12. Nader N, Bachrach BE, Hurt DE, Gajula S, Pittman A, Lescher R, Kino T. A novel point mutation in helix 10 of the human glucocorticoid receptor causes generalized glucocorticoid resistance by disrupting the structure of the ligand-binding domain. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2281–2285.
 13. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Jubiz W, Mejia L, Zachman K, Chrousos GP. A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):3986–3990.
 14. Charmandari E, Raji A, Kino T, Ichijo T, Tiulpakov A, Zachman K, Chrousos GP. A novel point mutation in the ligand-binding domain (LBD) of the human glucocorticoid receptor (hGR) causing generalized glucocorticoid resistance: the importance of the C terminus of hGR LBD in conferring transactivational activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(6):3696–3705.
 15. Donner KM, Hiltunen TP, Jänne OA, Sane T, Kontula K. Generalized glucocorticoid resistance caused by a novel two-nucleotide deletion in the hormone-binding domain of the glucocorticoid receptor gene NR3C1. *Eur J Endocrinol.* 2012;168(1):K9–K18.
 16. McMahon SK, Pretorius CJ, Ungerer JPP, Salmon NJ, Conwell LS, Pearen MA, Batch JA. Neonatal complete generalized glucocorticoid resistance and growth hormone deficiency caused by a novel homozygous mutation in Helix 12 of the ligand binding domain of the glucocorticoid receptor gene (NR3C1). *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(1):297–302.
 17. Raef H, Baitei EY, Zou M, Shi Y. Genotype-phenotype correlation in a family with primary cortisol resistance: possible modulating effect of the ER22/23EK polymorphism. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(4):577–582.
 18. Bertagna X. Effects of chronic ACTH excess on human adrenal cortex. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:43.
 19. Travers S, Martinerie L, Bouvattier C, Boileau P, Lombès M, Pussard E. Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;165(Pt B):202–211.
 20. Ferrari P. The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1802(12):1178–1187.
 21. Bollag WB. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol.* 2014;4(3):1017–1055.
 22. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 1987;237(4812):268–275.
 23. Funder JW. Apparent mineralocorticoid excess. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;165(Pt A):151–153.
 24. Edwards CR, Stewart PM, Burt D, Brett L, McIntyre MA, Sutanto WS, de Kloet ER, Monder C. Localisation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase--tissue specific protector of the mineralocorticoid receptor. *Lancet.* 1988;2(8618):986–989.
 25. White PC. Alterations of cortisol metabolism in human disorders. *Horm Res Paediatr.* 2018;89(5):320–330.
 26. Yau M, Haider S, Khattab A, Ling C, Mathew M, Zaidi S, Bloch M, Patel M, Ewert S, Abdullah W, Toygar A, Mudryi V, Al Badi M, Alzubdi M, Wilson RC, Al Azkawi HS, Ozdemir HN, Abu-Amer W, Hertecant J, Razzaghy-Azar M, Funder JW, Al Senani A, Sun L, Kim S-M, Yuen T, Zaidi M, New MI. Clinical, genetic, and structural basis of apparent mineralocorticoid excess due to 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2017;114(52):E11248–E11256.
 27. White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev.* 1997;18(1):135–156.
 28. Walker BR, Campbell JC, Fraser R, Stewart PM, Edwards CR. Mineralocorticoid excess and inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1992;37(6):483–492.
 29. Wilson RC, Krozowski ZS, Li K, Obeyesekere VR, Razzaghy-Azar M, Harbison MD, Wei JQ, Shackleton CH, Funder JW, New MI. A mutation in the HSD11B2 gene in a family with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(7):2263–2266.
 30. Ayrout M, Le Billan F, Grange-Messent V, Mhaouty-Kodja S, Lombès M, Chauvin S. Glucocorticoids stimulate hypothalamic dynorphin expression accounting for stress-induced impairment of GnRH secretion during preovulatory period. *Psychoneuroendocrinology.* 2019;99:47–56.
 31. Vitellius G, Delemer B, Caron P, Chabre O, Bouligand J, Pussard E, Trabado S, Lombès M. Data from: Impaired 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in glucocorticoid resistant patients. figshare 2019. Deposited 15 May 2019. <https://figshare.com/s/51227705ba57b90dc3c4>.
 32. RRID:CVCL_0063, https://scicrunch.org/resolver/CVCL_0063.
 33. RRID:CVCL_0031, https://scicrunch.org/resolver/CVCL_0031.
 34. Le Billan F, Amazit L, Bleakley K, Xue Q-Y, Pussard E, Lhadj C, Kolkhof P, Viengchareun S, Fagart J, Lombès M. Corticosteroid receptors adopt distinct cyclical transcriptional signatures. *FASEB J.* 2018;32(10):5626–5639.
 35. RRID:AB_2687823, https://scicrunch.org/resolver/AB_2687823.
 36. Palermo M, Shackleton CH, Mantero F, Stewart PM. Urinary free cortisone and the assessment of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996;45(5):605–611.
 37. Eisenhofer G, Peitzsch M, Kaden D, Langton K, Pamporaki C, Masjkur J, Tsatsaronis G, Mangelis A, Williams TA, Reincke M,

- Lenders JWM, Bornstein SR. Reference intervals for plasma concentrations of adrenal steroids measured by LC-MS/MS: Impact of gender, age, oral contraceptives, body mass index and blood pressure status. *Clin Chim Acta*. 2017;470:115–124.
38. Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Trabado S, Lombès M. Three novel heterozygous point mutations of NR3C1 causing glucocorticoid resistance. *Hum Mutat*. 2016;37(8):794–803.
39. Voisin M, de Medina P, Mallinger A, Dalenc F, Huc-Claustre E, Leignadier J, Serhan N, Soules R, Ségala G, Mougel A, Noguer E, Mhamdi L, Bacquié E, Iuliano L, Zerbinati C, Lacroix-Triki M, Chaltiel L, Filleron T, Cavaillès V, Al Saati T, Rochaix P, Duprez-Paumier R, Franchet C, Ligat L, Lopez F, Record M, Poirrot M, Silvente-Poirrot S. Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(44):E9346–E9355.
40. Mericq V, Medina P, Kakarieka E, Márquez L, Johnson MC, Iñiguez G. Differences in expression and activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in human placentas of term pregnancies according to birth weight and gender. *Eur J Endocrinol*. 2009;161(3):419–425.
41. Sacta MA, Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoid signaling: an update from a genomic perspective. *Annu Rev Physiol*. 2016;78(1):155–180.
42. Wasserman WW, Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet*. 2004;5(4):276–287.
43. Le Billan F, Khan JA, Lamribet K, Viengchareun S, Bouligand J, Fagart J, Lombès M. Cistrome of the aldosterone-activated mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J*. 2015;29(9):3977–3989.
44. Tapia-Castillo A, Baudrand R, Vaidya A, Campino C, Allende F, Valdivia C, Vecchiola A, Lagos CF, Fuentes CA, Solari S, Martínez-Aguayo A, García H, Carvajal CA, Fardella CE. Clinical, biochemical, and genetic characteristics of “nonclassic” apparent mineralocorticoid excess syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(2):595–603.
45. Carvajal CA, Tapia-Castillo A, Valdivia CP, Allende F, Solari S, Lagos CF, Campino C, Martínez-Aguayo A, Vecchiola A, Pinochet C, Godoy C, Iturrieta V, Baudrand R, Fardella CE. Serum cortisol and cortisone as potential biomarkers of partial 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 deficiency. *Am J Hypertens*. 2018;31(8):910–918.
46. Bocchi B, Kenouch S, Lamarre-Cliche M, Muffat-Joly M, Capron MH, Fiet J, Morineau G, Azizi M, Bonvalet JP, Farman N. Impaired 11-beta hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity in sweat gland ducts in human essential hypertension. *Hypertension*. 2004;43(4):803–808.
47. Henschkowski J, Stuck AE, Frey BM, Gillmann G, Dick B, Frey FJ, Mohaupt MG. Age-dependent decrease in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2) activity in hypertensive patients. *Am J Hypertens*. 2008;21(6):644–649.
48. Monticone S, D’Ascenzo F, Moretti C, Williams TA, Veglio F, Gaita F, Mulatero P. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;6(1):41–50.
49. Alikhani-Koupaei R, Fouladkou F, Fustier P, Cenni B, Sharma AM, Deter H-C, Frey BM, Frey FJ. Identification of polymorphisms in the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene promoter: functional characterization and relevance for salt sensitivity. *FASEB J*. 2007;21(13):3618–3628.
50. Nawrocki AR, Goldring CE, Kostadinova RM, Frey FJ, Frey BM. In vivo footprinting of the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 promoter: evidence for cell-specific regulation by Sp1 and Sp3. *J Biol Chem*. 2002;277(17):14647–14656.
51. Quinkler M, Zehnder D, Lepenies J, Petrelli MD, Moore JS, Hughes SV, Cockwell P, Hewison M, Stewart PM. Expression of renal 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is decreased in patients with impaired renal function. *Eur J Endocrinol*. 2005;153(2):291–299.
52. Starick SR, Ibn-Salem J, Jurk M, Hernandez C, Love MI, Chung H-R, Vingron M, Thomas-Chollier M, Meijnsing SH. ChIP-exo signal associated with DNA-binding motifs provides insight into the genomic binding of the glucocorticoid receptor and cooperating transcription factors. *Genome Res*. 2015;25(6):825–835.
53. van Beek JP, Guan H, Julian L, Yang K. Glucocorticoids stimulate the expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human placental trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(11):5614–5621.
54. Suzuki S, Koyama K, Darnel A, Ishibashi H, Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Sasano H, Krozowski ZS. Dexamethasone upregulates 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(9):1244–1249.
55. Mariniello B, Ronconi V, Sardu C, Pagliericcio A, Galletti F, Strazzullo P, Palermo M, Boscaro M, Stewart PM, Mantero F, Giacchetti G. Analysis of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene (HSD11B2) in human essential hypertension. *Am J Hypertens*. 2005;18(8):1091–1098.
56. Friso S, Pizzolo F, Choi S-W, Guarini P, Castagna A, Ravagnani V, Carletto A, Pattini P, Corrocher R, Olivieri O. Epigenetic control of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene promoter is related to human hypertension. *Atherosclerosis*. 2008;199(2):323–327.

4. Prolongement du travail et discussion

Ce travail, mené dans le cadre du PHRC Muta-GR nous a permis de montrer que malgré la relative rareté des mutations inactivatrices du GR décrites à ce jour, cinq mutations ont été découvertes lorsque l'on sélectionne la population avec comme critère principal d'inclusion, l'hyperplasie bilatérale des surrénales. Depuis la fin du PHRC (Novembre 2017), deux autres mutations hétérozygotes perte de fonction du GR ont été identifiées (Y660X et I757V). Ces données nous laissent penser que le diagnostic de résistance aux GC est très probablement sous-estimé. Ce travail permet d'apporter des éléments clinico-biologiques supplémentaires aux cliniciens afin de mieux identifier et de prendre en charge les patients présentant un syndrome de résistance aux GC, en évitant des examens invasifs comme le cathétérisme des sinus pétreux ou des chirurgies de la surrénale délétères. Un des principaux diagnostics différentiels est le pseudo syndrome de Cushing suspecté devant des patients avec un diabète peu contrôlé, une obésité ou une dépendance à l'alcool avec un CLU élevé et une absence de freinage au freinage minute (Findling et al, 2017). Un séquençage du GR est donc indiqué chez les patients présentant un pseudo syndrome de Cushing atypique.

D'un point de vue fondamental, nous avons également montré qu'*ex vivo* ces mutations étaient associées à une diminution d'expression des gènes cibles du GR de manière gène spécifique. De plus chaque mutation est responsable d'une diminution d'induction spécifique à la mutation. L'induction de l'ARNm pour *FKBP5* après induction tardive par la DXM (6h) est très faible pour tous les mutants mais aucun ne semble avoir une diminution d'induction de l'ARNm de *SGK1* induit précocement après 30 min de DXM ou de *PER1* après 6 h. Ces résultats semblent confirmer que *FKBP5* pourrait constituer un bon marqueur de la résistance aux GC (Bali et al. 2016). De très nombreux mécanismes peuvent rendre compte de l'haploinsuffisance du GR : le mécanisme de NMD lorsque la mutation entraîne un codon stop prématuré comme pour le mutant R491X ou par un mécanisme de dégradation accélérée comme cela semble être probable le cas pour le mutant Q501H.

De manière intéressante, les résultats du PHRC Muta GR ont montré que les patients porteurs de mutations perte de fonction du GR avaient des anomalies du système rénine angiotensine-aldostérone probablement en lien avec un déficit de l'enzyme rénale 11 β -HSD2. Nous avons ensuite démontré que l'enzyme 11 β -HSD2 était un gène cible du GR. De ce fait, les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR présentent une haploinsuffisance du GR responsable d'une diminution d'induction des gènes cibles et donc une diminution de l'ARNm *HSD11B2* et de l'activité de l'enzyme 11 β -HSD2. Ce déficit a très bien été mis en évidence lors de l'étude de la famille R469X (Bouligand et al. 2010). En effet il a été montré que 4 des membres porteurs de la mutation présentaient un rapport THE/THF inférieur à la normale, suggérant une diminution d'activité de cette enzyme, alors que deux des petites filles qui ont

pu être étudiées avaient un ratio normal respectivement à 2,37 et 2,98. Dans ce contexte, il est légitime de se demander si les jeunes patientes mutées sont à risque de développer une HTA à un âge précoce pouvant être responsable de nombreuses comorbidités dont l'infarctus du myocarde, d'où l'importance d'un suivi longitudinal de ces patients.

Carvajal et *al* ont récemment rapporté 2 familles dont certains membres sont porteurs des mutations inactivatrices hétérozygotes du gène de *HSD11B2* (Carvajal et al. 2018). Ils ont montré que les porteurs hétérozygotes ne présentaient pas d'HTA. Dans une des deux familles, les membres hétérozygotes présentaient une diminution d'activité de la 11 β -HSD2 rénale, mesurée par le rapport [(THF+ alloTHF)/THE] urinaire mais pas dans l'autre famille. Les auteurs s'interrogent à juste titre sur l'intérêt du dosage d'autres marqueurs pour estimer l'activité de l'enzyme 11 β -HSD2. Ils proposent qu'un rapport cortisol/cortisone plasmatique élevé puisse être associé à une concentration de cortisone sanguine basse, chez tous les patients porteurs de mutations hétérozygotes de *HSD11B2* étudiés.

Il est donc raisonnable de s'interroger sur la nature des tests à réaliser chez ces patients pour évaluer au mieux l'activité rénale de l'enzyme 11 β -HSD2. Le rapport urinaire THE/THF apporterait peut-être plus d'informations que les dosages sanguins du cortisol et de la cortisone, comme suggérait par Carvajal et *al*. Compte tenu de la grande quantité de données manquantes pour les patients étudiés, il nous semble difficile actuellement de pouvoir répondre à cette question.

D'autres auteurs ont montré que l'activité de l'enzyme 11 β -HSD2 diminuait avec l'âge (Quinkler et al. 2005), ainsi que son implication dans le développement de l'HTA (Mariniello et al. 2005; Chiodini et al. 2019). On peut donc s'interroger sur le suivi de ces patients, cliniquement non hypertendu, avec une diminution d'activité de l'enzyme 11 β -HSD2, pouvant s'aggraver avec l'âge et être responsable à long terme d'une HTA.

Partie 3 :
Implication physiopathologique du GR dans l'obésité et
l'hyperplasie surrénalienne

1. Introduction

1.1 Implication des GC dans l'obésité

Comme nous l'avons abordé au cours de l'introduction, certains patients porteurs de mutations inactivatrices du GR présentent une obésité (Chrousos et al. 1982, Vitellius et al. 2016) parfois associée à un syndrome métabolique, défini par la Fédération Internationale du Diabète (FID) comme la présence du tour de taille > 102 cm chez les hommes et 88 cm chez les femmes, associée à au moins deux des quatre critères suivants : une hypertriglycéridémie > 1,5 g/L ou la prise d'un traitement hypotriglycéridémiant, un taux d'HDL cholestérol < 0,4 g/L chez les hommes et <0,5 g/L chez les femmes, une tension artérielle > 130/85 mmHg ou la prise d'un traitement antihypertenseur et une glycémie à jeun > 1,10 g/L ou la présence d'un diabète de type 2 ou la prise d'un traitement anti-diabétique (Sherling et al. 2017). L'obésité se définit par une augmentation du nombre de cellules adipocytaires (hyperplasie) ou l'augmentation de leur taille (hypertrophie) au sein du tissu adipeux blanc (Jo et al. 2009). La présence d'un syndrome métabolique est associée à un risque cardio-vasculaire plus élevé (Shah et al. 2014), il est donc important de diagnostiquer ces patients. De manière intéressante, Constantinopoulos et al (Constantinopoulos et al. 2015) ont montré que non seulement l'enzyme 11 β -HSD1, facilitant la production de GC bioactifs était exprimée et active dans le tissu adipeux viscéral, mais en plus son expression locale est plus élevée chez les sujets obèses avec un syndrome métabolique que les sujets obèses sans syndrome métabolique. Ces données suggèrent un rôle important des GC produits localement dans le tissu adipeux viscéral et le développement d'un syndrome métabolique.

La répartition du tissu adipeux blanc, constitué d'adipocytes blancs possédant une unique gouttelette lipidique et impliqués principalement dans le stockage des triglycérides (Cinti 2012) est très importante en pratique clinique, avec deux localisations majeures soit sous-cutanée soit viscérale, ayant un rôle cardiovasculaire différent. En effet, une répartition androïde des graisses avec une augmentation de la masse grasse viscérale, est associée à un haut risque cardio-vasculaire (Vague 1996; Shah et al. 2014). L'augmentation de la masse grasse peut également être secondaire à un hypercortisolisme infra-clinique (Debono et al. 2013) défini par l'absence physiologique de rétrocontrôle du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophysaire révélé par l'absence de freinage du cortisol au freinage minute.

Pour rappel, les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR ont pour la plupart un hypercortisolisme biologique associant un CLU élevé et une absence de freinage du cortisol au freinage minute. Dans l'étude Muta-GR, les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR sont obèses avec un indice de masse corporel moyen à $30,7 \pm 9,5$ kg/m² (Vitellius,

Trabado, Hoeffel, et al. 2018) associé à taux d'HDL moyen élevé, semblant plutôt protecteur mais un taux de LDL non différent des patients non mutés. Le patient porteur de la mutation inactivatrice R469X a fait deux infarctus du myocarde avant l'âge de 50 ans.

1.2 Voie de signalisation des GC dans le tissu adipeux blanc

Dans le tissu adipeux, l'action génomique des GC peut passer par la liaison et l'activation de deux récepteurs nucléaires : le GR et le MR, dans la mesure où, contrairement aux cellules cibles des minéralocorticoïdes, l'enzyme 11 β -HSD2, n'est pas exprimée dans l'adipocyte. Les GC ont une affinité plus importante pour le MR par rapport au GR (Reul et al. 1987).

Les GC jouent un rôle prépondérant dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures à travers leur liaison au GR et au MR (Caprio et al. 2007; Lee et al. 2014) et sont indispensables lors de la phase précoce de différenciation, permettant la transcription du premier facteur transcriptionnel impliqué dans la différenciation adipocytaire : CCAAT/enhancer binding protein (CEBP)/ β . CEBP/ β est responsable de la transcription des facteurs CEBP α et de peroxyosome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), qui sont exprimés à la phase tardive de la différenciation adipocytaire et permettent le maintien du phénotype des adipocytes matures avec l'apparition de leur unique gouttelette lipidique (Gregoire, Smas, et Sul 1998). D'autres gènes sont exprimés tardivement au cours de cette différenciation : *FABP4*, l'adiponectine ou encore la leptine.

Si l'importance des GC au cours de la différenciation adipocytaire a été bien démontrée, le rôle respectif des deux récepteurs liant les GC, le GR et le MR reste très controversé.

Chez les patients obèses, l'activation excessive du MR, est responsable d'une inflammation de bas grade et d'une insulino-résistance (Greenberg et al. 2006). Caprio et al (Caprio et al. 2007) ont confirmé le rôle crucial du MR dans la différenciation adipocytaire, à travers l'utilisation d'antagoniste du MR (Caprio et al. 2011) responsable du blocage de l'adipogenèse, *in vitro* dans des cellules préadipocytaires murines, suggérant un rôle important du MR au cours de l'adipogenèse. Néanmoins, Kuhn et al ont récemment rapporté que paradoxalement la surexpression de MR chez des souris soumises à un régime riche en graisse, protégeait de la survenue de l'obésité (Kuhn et al. 2014).

A l'inverse, dans une autre étude, la contre-expression du GR par une stratégie d'ARN interférent (SiRNA) dans des cellules préadipocytaires humaines, bloque l'action proadipogénique du cortisol et réduit la sécrétion de leptine, d'adiponectine et d'IL-6 alors que la contre-expression du MR est sans effet sur l'adipogenèse, suggérant un rôle essentiel du GR dans la différenciation adipocytaire chez l'homme (Lee et al. 2014).

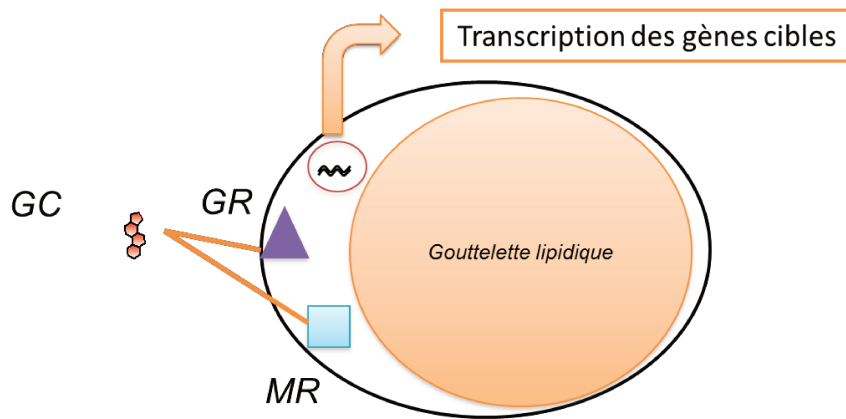


Figure 29 : Représentation schématique des glucocorticoïdes dans le tissu adipeux

Les GC peuvent lier le récepteur des GC (GR) ou des minéralocorticoïdes (MR) au sein du tissu adipeux blanc, jouant un rôle prépondérant dans l'adipogenèse.

GC : glucocorticoïdes, GR : récepteur des glucocorticoïdes, MR : récepteur des minéralocorticoïdes

Comme nous l'avons montré, la signalisation GC-GR est altérée chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR (Vitellius et al. 2016), mais la signalisation GC-MR est normalement conservée chez ces patients. Par conséquent, nous nous interrogeons sur le rôle de la voie de signalisation GC-MR à long terme, dans le contexte de syndrome de résistance aux GC, c'est-à-dire d'hypersécrétion de GC endogènes, et sa responsabilité sur une hyperplasie et/ou d'une hypertrophie du tissu adipeux, en lien avec l'obésité de ces patients (**Figure 29**).

Nous voulions donc dans un premier temps étudier l'implication du GR dans des cellules préadipocytaires humaines (hMADS) en caractérisant les rôles respectifs du MR et du GR dans la différenciation adipocytaire humaine. Nous voulions ensuite bloquer le GR par des antagonistes sélectifs et étudier l'impact de cette inhibition pharmacologique sur la différenciation adipocytaire.

1.3 Le rôle du GR dans l'hyperplasie surrénalienne

L'existence du GR dans la surrénale a longtemps été controversée. Le GR était initialement décrit comme impliqué uniquement dans des surrénales pathologiques, notamment dans des surrénales de patients avec une Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease (PPNAD), associée au complexe de Carney ou encore d'hyperplasie bilatérale des surrénales associée à un syndrome de Cushing ACTH-indépendant (Bourdeau et al. 2003; Louiset et al. 2009). Néanmoins, deux autres équipes rapportent la présence du GR dans des surrénales normales : dans des extraits de tissus surrénaux obtenus après

surrénalectomie/néphrectomie pour une pathologie rénale en messenger et en protéine (Paust et al. 2006) et la présence du variant GR-D dans la surrénale normale en protéine (Damjanovic et al. 2012).

Jusqu'à présent, les principales causes génétiques d'hyperplasie surrénalienne connues étaient des mutations responsables de l'activation de la voie de l'AMPc telles que les mutations du gène codant la sous-unité régulatrice de la PKA (*PRKAR1A*), certaines phosphodiesterases (*PDE11A*, *PDE8B*), le récepteur de l'ACTH (mutations de *MC2R*), la sous-unité α de la protéine Gs (*GNAS*) ou encore des mutations des transporteurs tels que StAR ou encore des enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse comme *CYP11A1*, *HSD3B2*, *CYP17A1*, *POR*, *CYP11B1* and *CYP21A2* (Vitellius et Lombès 2019). Très récemment de nouveaux gènes ont été découverts comme associé à l'hyperplasie surrénalienne, comme le gène *ARMC5* (Assié et al. 2013) dont le rôle physiopathologique reste encore à définir mais qui est un gène suppresseur de tumeur et qui semblerait favoriser un deuxième évènement mutationnel somatique.

Michailidou et al ont montré en 2008 (Michailidou et al. 2008) que des souris avec un seul allèle GR fonctionnel associé à une concentration d'ACTH normale avaient des surrénales hyperplasiques suggérant l'implication de l'haploinsuffisance du GR dans la pathogenèse de l'hyperplasie surrénalienne (**Figure 30**). Plus récemment, certains variants du GR : *BclI* et GR 9β , ont été retrouvés chez des patients avec un incidentalome surrénalien (Damjanovic et al. 2012).

Dans le cadre du PHRC Muta-GR (Vitellius, Trabado, Hoeffel, et al. 2018), nous avons précédemment montré que 5% des patients avec une hyperplasie surrénalienne bilatérale associée à un hypercortisolisme biologique et/ou une HTA sans signe clinique de Cushing étaient porteurs d'une mutation inactivatrice du GR, responsable d'une haploinsuffisance du GR.

Dans ce contexte, nous souhaitons donc introduire des mutations GR dans des cellules corticosurrénales humaines H295R afin d'étudier l'implication d'un GR non fonctionnel dans le cortex surrénalien. Nous utiliserons la nouvelle technologie CRISPR/Cas 9 d'édition du génome permettant de modifier le génome des cellules H295R par knock-in et ainsi étudier la prolifération cellulaire.

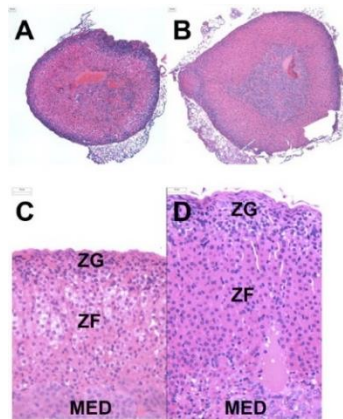


Figure 30 : Hyperplasie surrénalienne des souris GR^{+/-}

La zone glomérulée (ZG) du cortex surrénalien des souris GR^{+/-} (B et C) apparaît plus fine mais avec un épithélium hypertrophique alors que les cellules dans la zone fasciculée (ZF) apparaissent plus épaisses, par rapport aux ZG et ZF des souris avec deux allèles GR sauvages (A et C), images issues de l'article de Michailidou et al (Michailidou et al. 2008).

1.3 L'édition du génome par CRISPR/Cas 9

La technologie de CRISPR/Cas 9 vient de révolutionner la manipulation du génome (Jinek et al. 2012). Elle repose sur les études sur l'immunité adaptative du système des bactéries (Makarova et al. 2011). Après avoir rencontré un élément étranger comme un virus, la bactérie intègre dans son génome une séquence dérivée de l'ADN étranger afin de le reconnaître lors d'une nouvelle invasion (Barrangou et al. 2007). L'endonucléase Cas 9 permet de couper l'ADN double brin à un endroit précis du génome grâce à un ARN guide, complémentaire à la séquence d'intérêt à cliver et par conséquent de la séquence dérivée de l'ADN étranger, appelée séquence CRISPR. Il existe trois types de système CRISPR, associant soit directement le guide ARN à la Cas 9 (le système I et le III) soit *via* l'intermédiaire d'un guide transfectant (le système II). Nous parlerons donc du système II, le mieux caractérisé, celui de l'espèce streptococcus pyogène. Dans cette espèce, le système CRISPR reconnaît l'ADN étranger, intégré dans l'organisme de la bactérie, car cet ADN est suivi d'une séquence PAM, c'est-à-dire de trois nucléotides spécifiques : un nucléotide au choix et deux guanines (NGG) (Jinek et al. 2012).

Ce système est maintenant utilisé afin de modifier le génome cellulaire en introduisant des mutations ponctuelles (knock-in), des délétions (knock-out) ou en corrigeant une mutation (Ran et al. 2013) (**Figure 31**).

De manière pratique, la Cas 9 peut être transfectée de différentes façons : sous forme de protéine (Cho et al. 2013), sous forme plasmidique (Wang et al. 2013), la Cas 9 avec une partie d'une de ses sous-unités mutée : Cas9D10A (Cong et al. 2013). La séquence à cibler, contenant le nucléotide à muter, doit donc être suivie d'un motif NGG (Jinek et al. 2012). Le

guide RNA est transfecté en même temps que la Cas 9 dans la cellule (Jinek et al. 2012). Les cellules sont en partie capables, de réparer ces cassures double brin de l'ADN par deux mécanismes. D'une part, le mécanisme dit de *Non-Homologous End Joining* (NHEJ) est un système de réparation non conservatif, à l'origine de mutations par insertion ou délétion (indel), souvent responsables d'un décalage du cadre de lecture. L'*Homology Directed Repair* (HDR) est un autre mécanisme de réparation de l'ADN double brin. Cette machinerie n'est pas connue dans son intégralité mais utilise la recombinaison homologue afin de réparer l'ADN endommagé (Takata et al. 1998). La transfection simultanée d'oligonucléotides simples brins, dits de réparation contenant la mutation que nous souhaitons intégrer, devait faciliter le mécanisme d'HDR de réparation de l'ADN cellulaire (Chen et al. 2011).

La Cas 9 peut également cliver des cibles non désirées sur l'ADN, appelées off-targets (Fu et al. 2013). Lors du dessin du guide RNA, il est primordial de choisir le guide avec le moindre nombre d'off-target possible. Expérimentalement, il est possible de limiter les off-target en diminuant la quantité de guide RNA transfecté.

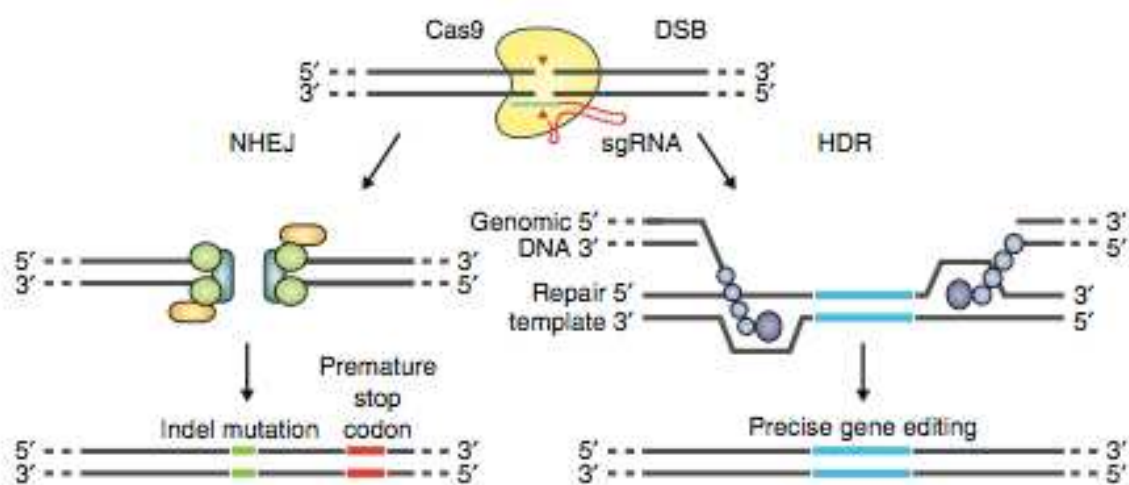


Figure 31 : Représentation schématique du système CRISPR/Cas 9

La Cas 9 en jaune, aidée par le guide RNA (sgRNA), composé d'une séquence complémentaire à l'ADN étranger (en bleu) va couper l'ADN double brin. Deux types de réparation cellulaire de cassure double brins ont été décrites : le NHEJ (Non-homologous End Joining) responsable d'une réparation aléatoire avec introduction des nouvelles mutations soit ponctuelles soit de codon stop prématuré et l'HDR (Homology Directed Repair) responsable d'une édition précise du génome semblable à la séquence d'ADN clivée, issu de l'article de Ran et al (Ran et al. 2013).

DSB : double brin d'ADN; HDR : homology directed repair, NHEJ : non homologous end joining

Nous voulions initialement étudier l'implication du GR dans des cellules préadipocytaires humaines (hMADS) en caractérisant le rôle du GR dans la différenciation adipocytaire humaine. L'utilisation du RU486, antagoniste du GR, devait faciliter l'étude de l'impact de l'inhibition pharmacologique de la signalisation GR sur la différenciation adipocytaire. Dans un second temps, le projet consistait à introduire des mutations GR identifiées par une stratégie de knock-in dans des cellules corticosurréaliennes humaines H295R et les hMADS par l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas 9. Afin de mieux appréhender les conséquences de l'altération des voies de signalisation du GR, associées à certaines mutations hétérozygotes du GR, nous souhaitons intégrer les mutations Y478C et R477S situées dans l'exon 4 et la mutation L672P située dans l'exon 7.

2. Matériel et Méthodes

2.1 Culture cellulaire

Nous avons utilisé des cellules pré-adipocytaires humaines hMADS (Collaboration Christian Dani, Univ Nice Sophia Antipolis), obtenues à partir de la fraction de stroma-vasculaire de tissu adipeux humain (Karbiener et al. 2009). Le milieu de culture contient 500 mL de DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12, GIBCO®), 2% d'un mélange de PSG (pénicilline (10 000 UI/ml), streptomycine (10 000 µg/mL) et glutamine (200 mM), 10% de SVF (sérum de veau fœtal, BioWest) et 1% d'HEPES 20 mM (GIBCO®). Les cellules hMADS sont différenciées en suivant le protocole suivant (Karbiener et al. 2009) : à J0, les cellules hMADS sontensemencées initialement dans des plaques 6 puits à la densité de 40.000 cellules par puits. A J1, les cellules sont à confluence et est ajouté 2.5 ng/mL de FGF2 (Fibroblast Grown Factor 2) dans le milieu de culture, à J3, le FGF2 est retiré du milieu, puis à J4, le milieu de différenciation contenant du DMEM-F12, de l'insuline à 5 µg/mL, de la transferrine à 10 µg/mL, de la T3 à 0,2 nM, de la rosiglitazone à 1 µM, de l'IBMX à 100 µM, et enfin de la DXM à 1 µM est ajouté aux cellules. Pour finir à J7, la DXM et l'IBMX sont retirés du milieu.

Les cellules H295R, lignée humaine de corticosurrénalome, sont cultivées dans un milieu composé de DMEM-F12, de 2 % d'un mélange PSG, de 10% SVF du cocktail ITS (concentrations finales d'insuline 5 µg/ml, transferrine 5 µg/ml et sélénate de sodium 50 nM) et d'HEPES 20 mM (GIBCO®).

Les cellules sont ensuite incubées à 37°C avec 5% de CO₂.

2.2 Amorces

Ci-joint la liste des amorces utilisées pour étudier l'expression des gènes de la différenciation (*PPAR γ* , *PREF-1*, *FABP4* et l'adiponectine), le GR (*NR3C1*), le MR (*NR3C2*), le gène normalisateur *36B4*, et enfin les amorces utilisées pour cibler l'exon 4 et 7.

	Gène humain	Forward	Reverse
cDNA	36B4	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA
	PPAR γ	GGGATCAGCTCCGTGGATCT	TGCACTTTGGATCTCTTGAAGTT
	PREF-1	CACTGTGGGTATCGTCTT	CAGCATGTGGTTGTAGC
	NR3C2	GCAAGCGCTGCAACAGGTAG	ACAGCCTGAGAACTTGACCCC
	FABP4/AP2	AAA GTC AAG AGC ACC ATA ACC	TTC AAT GCG AAC TTC AGT CC
	Adiponectine	GCTTTCTTCTCTACCATGAC	CTGAAAGCCTTTAATTGACT
	NR3C1	TTCCCTGGTCGAACAGTTTTTTT	GAGCTGGATGGAGGAGAGCTT
ADN génomique	EXON 4	AAATGGTTCACTGATTTGTGTACTT	GAGACAAACAATTGCTTTCAGAT
	EXON 7	ACATGGCATGCATGATAGAAAAT	TTCTAGGCCTTCATATTTTCATGCT

2.3 Extraction des ARN totaux

Après 5 min d'incubation avec 500 μL de Trizol (TRI Reagent®, MRC)/puits, le contenu est transféré dans un tube Eppendorf. Cent μL de chloroforme sont ajoutés avant de centrifuger pendant 15 min à 4°C à 12.000 rpm. Trois phases sont visualisables. La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouvel Eppendorf et additionnée de 500 μL d'isopropanol. Après une nuit d'incubation à -20°C, les ARN totaux sont précipités. Le surnageant est éliminé et le culot est rincé avec de l'éthanol à 70%. Le culot est ensuite re-suspendu dans 20 μL d' H_2O RNase free et la concentration d'acides nucléiques est mesurée à l'aide du Nanodrop (Thermoscientific®).

2.4 RT-qPCR

L'équivalent de 1 μg d'ARN est ensuite incubé avec la *DNase I* mix (0,5 μL *DNase I* + 1 μL *Buffer* 10X, Biolaps). L'action de la DNase est stoppée par l'incubation pendant 10 min à 75°C. L'addition du mix RT contenant 2 μL de *Buffer* 10X, 0,8 μL de désoxynucléotides libres à 100 mM (dNTP, Thermo Fischer®), 2 μL d'amorces aléatoires (50 U/ μL , Thermo Fischer®), 4,2 μL d' H_2O et 1 μL d'enzyme transcriptase inverse (50 U/mL, Superscript, Thermo Fischer®) permet le début du cycle de RT : 10 min à 25°C (permet l'hybridation des amorces et la mise en place de l'enzyme) puis 2 h à 37°C (température optimale pour l'activité transcription inverse), et enfin 5 sec à 85°C (dénaturation de la transcriptase inverse). Les échantillons d'ADN complémentaire (ADNc) néosynthétisés, sont placés dans un thermocycleur pour 40 cycles de PCR en temps réel, avec un mix de 7 μL comprenant la Taq polymérase avec son tampon de réaction (*Reaction Buffer* 2X) et l'amorce sens et anti-sens du gène étudié (concentration finale 300 nM). Les séquences des amorces utilisées sont précisées dans la partie amorces (2.2).

2.5 Western Blot

Les cellules sontensemencées en plaques 6 puits. Les extraits protéiques sont obtenus grâce à un tampon de lyse (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 30 mM pyrophosphate de sodium, 50 mM fluorure de sodium), de 1% de cocktail d'inhibiteurs des protéases (CIP, Sigma®), de 1% de Triton X100 et de 0,1% de SDS. La concentration protéique est mesurée par la méthode à l'acide de Bicinchoninique (BCA). Ving à quarante μg de protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide à 7,5 % en condition dénaturante et séparées par électrophorèse (SDS-PAGE). Après 1 h 30 de migration à 150 V dans un tampon de migration (25 mM Tris-Aminométhane pH 10,9, 192 mM glycine, 0,1% de SDS), les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Sciencetec®) pendant 1 h à 100 V, dans du tampon de transfert (25 mM Tris-Aminométhane pH 10,9, 192 mM glycine,

10% éthanol absolu). Les membranes sont ensuite bloquées pendant 1 h à température ambiante dans une solution de TBST (25 mM Tris-Aminométhane, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20) additionné de 5% de lait écrémé (m/v, Régilait®). Elles sont enfin incubées pendant un à deux jours à 4°C avec la solution d'anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt, GR. Les anticorps sc393232 (dirigé contre la partie N-terminale des acides aminés 121-420 du GR à 1/500^{ème}) et l'anticorps dirigé contre une protéine de normalisation (β -actine, SIGMA) à 1/5.000^{ème}, sont utilisés. Les membranes sont ensuite rincées 3 fois au TBST pendant 10 à 15 min puis incubées pendant 1 h à température ambiante avec un solution d'anticorps secondaire à 1/10.000^{ème}, couplés à des fluorochromes émettant dans l'infrarouge. La détection et la quantification des signaux de fluorescence s'effectuent en multiplex grâce à un analyseur d'images Odyssey®FC (Li-Cor).

2.6 Red Oil

A partir d'une plaque 6 puits, les cellules sont d'abord rincées au PBS, puis fixées pendant 1 h au paraformaldehyde (PFA 5%) sur glace, rinçées au PBS 4 fois. Les cellules sont mises en contact avec 1 mL par puits d'huile rouge (red oil) pendant 1 h à température ambiante. Puis les cellules sont de nouveau rincées trois fois, puis mise en présence d'hématoxylin pendant 30 sec à température ambiante, puis rincées au PBS. Les gouttellettes lipidiques apparaissent en rouge.

2.7 Quantification des gouttelettes lipidiques en HTM

Les cellules vivantes ont été incubées 30 min avec la sonde LipidTox (ThermoFisher, ref. H34475) selon les recommandations du fabricant (dilution au 1/1000^{ème}). Puis les noyaux des cellules vivantes ont été contremarqués à l'aide d'une sonde Hoechst 33342 (0,5 μ g/ml) durant 5 min. Les images d'immunocytochimie ont ensuite été acquises à 37°C (5% CO₂) à l'aide du microscope automatisé *ArrayScan VTI* (Thermo Fisher Scientific Inc.) et analysées à l'aide du logiciel associé vHCS Studio v6.6.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.). L'*ArrayScan VTI* est une station d'analyse cellulaire multiparamétrique à haut contenu informatif basé sur un processus d'acquisition automatisé (Buchser et al. 2004). Cette technologie utilise des algorithmes, "*bio-application*", permettant de repérer, d'analyser et de quantifier un ensemble de composants ou de fonctions cellulaires, aussi bien dans des cellules vivantes que fixées. Après avoir procédé aux réglages de la mise au point et du temps d'exposition, 60 images ont été acquises (objectif 10X, NA/0,30) de façon automatique pour chacune des conditions expérimentales et dans chacun des canaux, bleu (Hoechst) et vert (LipidTox). L'algorithme (bio-application) utilisé pour l'analyse des images, *SpotDetector*, permet l'identification et la quantification des gouttelettes lipidiques contenues dans la cellule grâce à la séquence d'opération suivante. Dans un premier temps, la sélection des noyaux (Hoechst, canal bleu) a

été réalisée à l'aide d'une valeur de seuillage fixe ($v = 200$) permettant d'identifier et de segmenter (séparer) chaque noyau et donc de repérer chaque cellule en estimant un noyau par cellule. Dans un second temps, la dilatation du masque nucléaire permet d'appliquer un masque binaire servant à l'identification des cellules entières (masque cellulaire). Un algorithme d'identification (méthode Box, $v=114$) suivi d'une opération de seuillage (méthode Isodata, $v=0.406$) sont utilisées afin d'appliquer un masque d'identification des gouttelettes lipidiques au sein des masques cellulaires. Les mesures et les quantifications sont réalisées au sein de ces masques afin d'obtenir l'intensité de marquage et la surface de ces gouttelettes par cellule et/ou par puits.

2.8 CRISPR/CAS 9

2.8-1 GeneArt Genomic Cleavage Selection kit

Après une analyse détaillée des différentes techniques Crispr/Cas 9 proposés par différents fournisseurs, nous avons opté dans un premier temps pour la technologie de Life technologies. Le plasmide rapporteur linéarisé fourni dans le kit *Geneart Genomic Cleavage Selection Kit* (Life technologies, Invitrogen®), contient plusieurs séquences codantes : deux séquences codantes pour des gènes qui confèrent la résistance à l'ampicilline (procaryote) et à la néomycine (eucaryote). Ces gènes sont placés sous le contrôle d'un promoteur adapté, une séquence codant pour l'épitope V5, une séquence codant pour l'épitope Cluster de différenciation 4 (CD4), une séquence codant pour le peptide de clivage T2A et une séquence tronquée codant pour *Orange Fluorescent Protein* (OFP). Ces séquences sont placées sous le contrôle d'un promoteur eucaryote pCMV.

La séquence codant pour l'OFP est tronquée et comporte des extrémités cohésives capables d'accueillir une séquence insert double brin. Les séquences insert sont un enchainement d'une vingtaine d'acides aminés identique à la séquence cible de l'ADN génomique.

La séquence insert est dessinée de telle sorte que la Cas 9 la clive en amont des séquences PAM. Ce clivage amène à la recombinaison homologue des extrémités de la séquence codant pour la protéine OFP alors fonctionnelle. Cela constitue théoriquement un contrôle de l'activité endonucléase de la Cas 9, seules les cellules qui fluorescent en orange seront sélectionnées. Le marqueur membranaire CD4 permet également la sélection des cellules.

Séquence insert de l'exon 4 intégrée dans le vecteur :

5' **AATT**CCTGAAGACATTTTCGATAG**CGG** 3'

3' GGACTTCTGTAAAAGCTATCGCC**CTAG** 5'

Séquence de l'insert de l'exon 7 intégrée dans le vecteur :

5' **AATT**ACTGCTTCTCTCTTCAGGT**TGG** 3'
3' ATGACGAAGAGAGAAGTCCAACC**CTAG** 5'

En **bleu** : séquence PAM

En **rouge** : séquence homologues des bornes cohésives du vecteur

2.8-2 GeneArt CRISPR Nuclease Vector kit

Dans un deuxième temps, nous avons contacté l'équipe de Reiner VEITIA (oncologie moléculaire et pathologies ovariennes, Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot) qui nous a fourni un plasmide contenant le gène codant la Cas 9, associé à une séquence codant la protéine fluorescente orange OFP, marqueur de la transfection du plasmide dans les cellules.

Séquence insert de l'exon 4 intégrée dans le vecteur :

5' CCTGAAGACATTTTCGATAGGTTTT 3'
3' GTGGCGGACTTCTCTAAAAGCTATC 5'

Séquence de l'insert de l'exon 7 intégrée dans le vecteur :

5' TACTGCTTCTCTCTTCAGGTGTTTT 3'
3' GTGGCATGACGAAGAGAGAAGTCCA 5'

2.9 Appariement des séquences insert et réaction de ligation

L'appariement de ces séquences se fait avec 2 µL de tampon de ligation 10X avec 5 µL d'oligonucléotides sens et 5 µL d'oligonucléotides anti-sens (200 µM) et 8 µL d'H₂O dans un volume final de 20 µL. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur (T100 Thermo-cycler, Bio-rad®) 4 min à 95°C puis 10 min à température ambiante. Les échantillons sont ensuite dilués à 5 nM dans de l'eau, pour l'étape de ligation. La réaction de ligation consiste à incuber à 26°C pendant 10 min, 2 µL des séquences doubles brin néoformées, en présence de 2 µL de T4 ligase (1 U/µL, InVitrogen), de 2 µL de plasmide rapporteur Crispr OFP vector linéarisé, de 4 µL tampon de ligation 5X et de 11 µL d'H₂O.

2.10 Transformation bactérienne et extraction des vecteurs

Vingt µL de suspension bactérienne XL1 blue (Stratagene®) sont mis en contact avec 3 µL de plasmide rapporteur. Un choc thermique à 42°C de 45 sec est réalisé afin de faciliter l'entrée des vecteurs à l'intérieur des bactéries. Les bactéries sontensemencées sur milieu gélosé

standard LB agar supplémenté avec 1% ampicilline (10 mg/mL soit 100 µg/mL finale) et incubées à 37°C pendant une nuit. Les clones sélectionnés sont mis en culture liquide LB ampicilline (100 µg/mL d'ampicilline), pendant 24 h à 37°C avant de procéder à la purification des vecteurs à l'aide du kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel). Les bactéries sont re-suspendues dans 250 µL de tampon A1 puis lysées dans 250 µL de tampon A2 pendant 5 min. La neutralisation de la lyse est réalisée grâce à l'addition de 300 µL de tampon A3. Le lysat est clarifié par centrifugation à 11.000 x g pendant 10 min avant d'être filtré et retenu sur une colonne et rincé par 500 µL de tampon AW et 600 µL de tampon A4 supplémenté en éthanol pour éviter l'éluion anticipée de l'ADN. L'ADN est enfin élué avec 30 µL de tampon AE. L'ADN est quantifié au nanodrop (Thermoscientific®) puis envoyé au séquençage pour vérifier l'introduction de l'insert dans le plasmide.

2.11 Oligonucleotide de réparation

L'activité de l'endonucléase Cas 9 génère des cassures double-brin de l'ADN, réparables par le processus intracellulaire d'HDR. Les mutations R477S, Y478C et L672P vont alors être intégrées sur l'ADN génomique à l'aide d'oligonucléotides simple brin d'une centaine de bases (ssODN = *Single-stranded DNA oligonucleotides*), homologues à l'ADN génomique et incluant la mutation désirée. Le néobrin réparé et re-synthétisé contient alors la mutation désirée. Le dessin des séquences est présenté ci-dessous :

ssODN R477S :

5'gatatttatattacctccaggttcattccagcctgaagacatttgcgatagctgcatgctgggcagtttttctcgaatttatcgatgatgcaatc 3'

ssODN Y478C :

5'gatatttatattacctccaggttcattccagcctgaagacatttctcagcagcggcatgctgggcagtttttctcgaatttatcgatgatgcaatc 3'

ssODN L672P :

5'catatttcatgcttttgacataagggtgaaaagggtgttctaccaacctgaagagggaagcagtaaggtttcatcacagagatactctcataagatacct 3'

En jaune : nucléotide remplacé

En rouge : séquence Crispr de 20 nt

En bleu : séquences homologues à l'ADN génomique

2.12 Transfection

Nous ne parlerons dans cette section uniquement de la transfection réalisée avec le plasmide fourni par l'équipe de Reiner Veitia. Les cellules H295R sontensemencées sur plaques 6 puits à la densité de 6.10^5 cellules/puits. Le jour de la transfection, les cellules sont incubées pendant 1 h avec 75 μ L de milieu OPTIMEM (GIBCO®). 250 μ L de milieu de transfection composé de 10 μ L de plasmide contenant les guides RNA ciblant l'exon 4 ou 7 à 250 ng/ μ L insérés dans le plasmide contenant la séquence codant la Cas 9 et la protéine OFP, de 5 μ L d'oligonucléotides de réparation, de Lipofectamine 2000 (InVitrogen®), et d'OPTIMEM sont déposés dans chaque puits. Six heures après la transfection, le milieu est remplacé par 1 mL de milieu complet.

Sélection des cellules OFP+

Afin de sélectionner les cellules ayant intégré le plasmide possédant un gène codant pour l'OFP, nous avons séparé les cellules par la cytométrie en flux avec l'aide de l'équipe de C. Bourgeois (unité 1184 IMVA, Immunologie des Maladies Virales et Auto-immunes). Les cellules sont triées selon la longueur d'onde émise par la cellule. En effet, nous avons dans un premier temps étudié les cellules H295R non transfectées afin de connaître l'autofluorescence de la cellule et définir la zone correspondant à la fluorescence des cellules transfectées secondaire à l'expression de la protéine OFP, marqueur de la transfection de la Cas 9 dans la cellule. Quarante-huit heures après la première transfection, les cellules ont donc été triées par FACS avec une longueur d'onde d'excitation à 561 nm et une longueur d'onde de détection à 610 ± 20 nm.

2.13 Amorces utilisées pour la PCR allèle spécifique

Afin de sélectionner les clones ayant introduit la mutation, nous avons dessiné des amorces reconnaissant uniquement la mutation désirée (Y478C, R477S et L672P) et des amorces ne reconnaissant que l'allèle sauvage (Y478 WT, R477 WT et L672 WT). L'amorce anti-sens est spécifique de la mutation ou de l'allèle sauvage (Bottema et al.1993).

	Forward	Reverse
Y478 WT	ATCGATAAAATTCGAAGAAA	TGAAGACATTTGCGACA
Y478C	AGGACAGCACAAATTACCTAT	CCTGAACACATTTTCGAC
R477 WT	GTGGGTGTCTTGTTATATT	TGAAGACATTTTCGATAGC
R477S	ACAGCACAAATTACCTATGTG	AGCCTGAAGACATTTGC
L672 WT	GAATGACTCTACCCTGCAT	GTTCTACCAACCTGAAGAGA
L672P	GGCTTCAGGTATCTTATGAA	AGGGAAGCAGTAAGGTTT

2.14 Analyses statistiques des résultats

Les différentes analyses ont été effectuées en utilisant les tests non-paramétriques de Mann-Whitney (logiciels GraphPad Prism 6). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart standard à la moyenne (SEM) ou moyenne \pm écart-type (SD). La différence est considérée comme significative pour une valeur de $P < 0,05$. La différence statistique des tests non-paramétriques est illustrée de la façon suivante : * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

3. Résultats

La différenciation adipocytaire est initiée lorsque les cellules hMADS sont à confluence et se poursuit pendant 14 j. Les grandes étapes de la différenciation adipocytaire sont représentées sur la **Figure 32**.

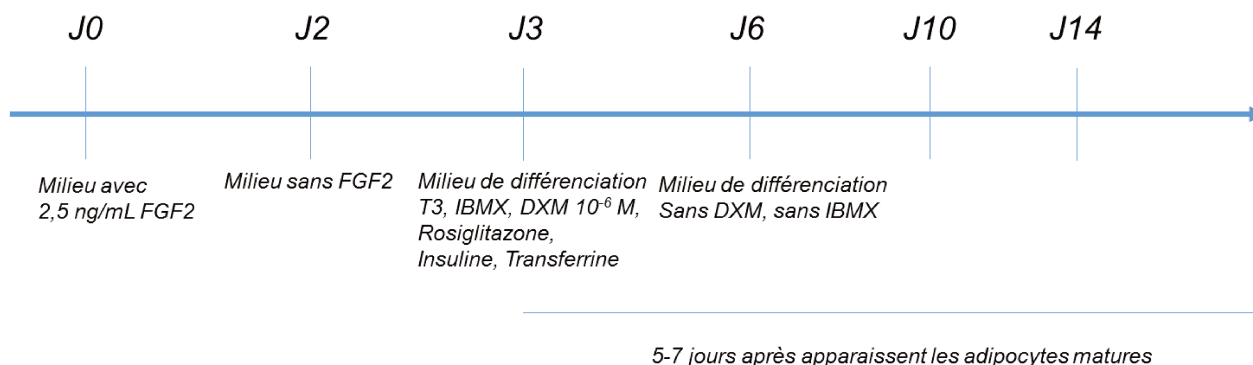


Figure 32 : Protocole de différenciation des hMADS

D'après C.Dani (Karbiener et al. 2009).

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2, DXM : Dexamethasone, IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine.

Nous sommes parvenus à réaliser plusieurs différenciations adipocytaires en suivant le protocole proposé par C. Dani et *al* (Karbiener et al. 2009), cependant les résultats étaient extrêmement variables d'une expérience à l'autre, rendant leur comparaison délicate et l'interprétation impossible.

Nous avons, dans un premier temps, étudié l'expression des différents gènes exprimés au cours de la différenciation, en comparant les niveaux d'ARNm à 4, 10 et 14 jours après l'initiation de la différenciation. Comme le montre la **Figure 33A**, l'ARNm *FABP4* est exprimé dès le 10^{ème} jour de la différenciation et son expression reste stable jusqu'à la fin de la différenciation. *PPAR γ* est exprimé plus transitoirement mais tardivement (à J10). L'expression de l'ARNm de l'adiponectine et du MR apparaît à J10 puis reste stable jusqu'à la fin de la différenciation. L'expression du GR est maximale à J10 mais semble transitoire, puisqu'il n'est plus exprimé à la fin de la différenciation (**Figure 33A**).

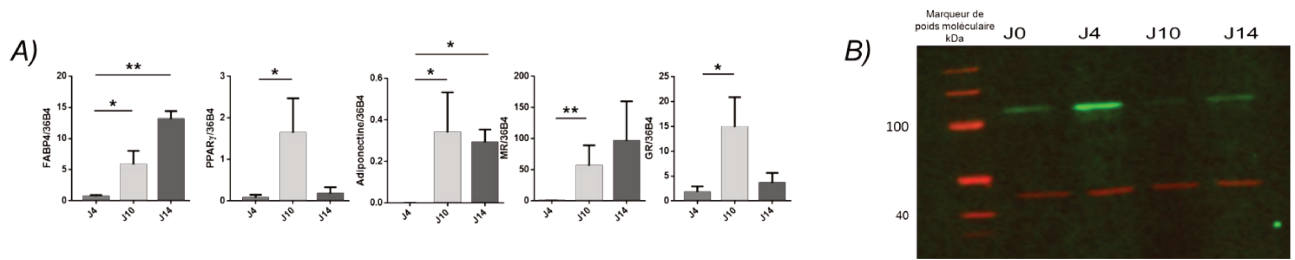


Figure 33 : Caractérisation des cellules pré-adipocytaires humaines (hMADS)

A) Expression des gènes *FABP4*, *PPARγ*, de l'adiponectine, du MR et du GR, au cours de la différenciation adipocytaire des cellules hMADS. Les résultats sont représentatifs de deux différenciations indépendantes avec 3 échantillons par condition testés en duplicats. L'expression relative des ARNm est exprimée en attomol du gène d'intérêt rapporté aux attomol de l'ARNm *36B4*.

B) Expression protéique du GR au cours de la différenciation adipocytaire. Analyse par Western Blot avec un anticorps dirigé contre la partie N-terminale (SC-136209, Santa Cruz) dirigé contre les acides aminés 176-289.

En parallèle de l'expression génique quantifiée par RT-qPCR, nous avons évalué l'expression protéique du GR par western blot (**Figure 33B**). Nous avons été capable de détecter la présence du GR à tous les stades de différenciation mais son expression protéique semble maximale au premier jour de la différenciation (J4) puis décroît au cours de la différenciation.

Nous avons montré grâce la coloration au Red Oil, qui permet la coloration des gouttelettes lipidiques en rouge, que seul 20% de la lignée préadipocytaires atteignaient le stade d'adipocytes matures à l'issue des 14 jours du protocole, indiquant un degré de différenciation faible (**Figure 34**).

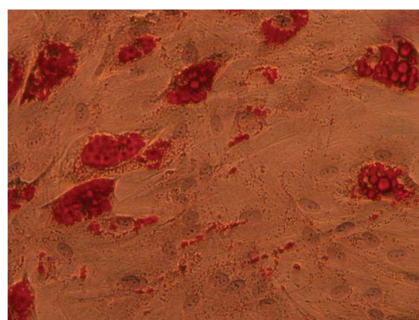


Figure 34 : coloration au red oil des cellules adipocytaires humaines

grossissement au 20x, réalisé 14 jours après l'initiation du protocole de différenciation

En rouge : gouttelettes lipidiques colorées par le Red oil

Nous avons ensuite inhibé la signalisation dépendant du GR, par l'utilisation de l'antagoniste pharmacologique, le RU486, dès le troisième jour du processus de la différenciation et cela jusqu'au quatorzième jour, afin d'étudier l'implication de ce récepteur dans la différenciation adipocytaire.

Comme le montre la **Figure 35**, macroscopiquement avec l'arrondissement des cellules préadipocytaires et l'apparition de gouttelettes lipidiques intracellulaires, la différenciation adipocytaire est quasiment nulle après traitement par le RU486 (**Figure 34**).

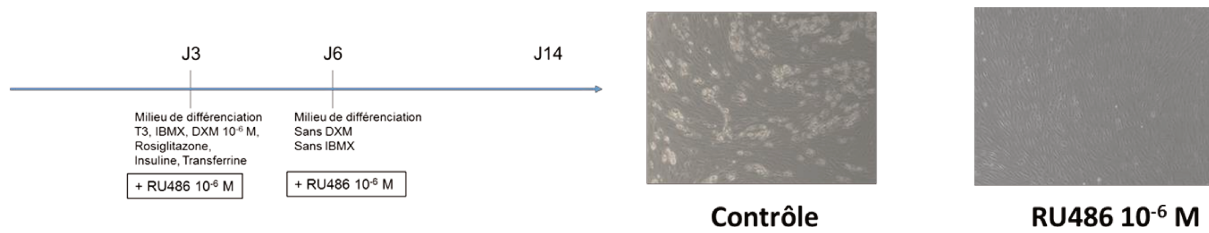


Figure 35 : Protocole expérimental de différenciation adipocytaire

Photographie au grossissement 20x après apparition de gouttelettes lipidiques dans un milieu de différenciation contrôle et un milieu de différenciation en présence de RU486 (10^{-6} M), antagoniste du GR.

Nous avons quantifié la présence d'adipocytes matures, visibles par la présence de gouttelettes lipidiques en HTM après coloration au lipidtox, permettant d'objectiver notre impression visuelle (1602 ± 313 spots adipocytaires après différenciation classique (contrôle) vs 27 ± 19 après traitement par le RU486. $P < 0,0001$ (Mann-Whitney U-test)) (**Figure 36**).

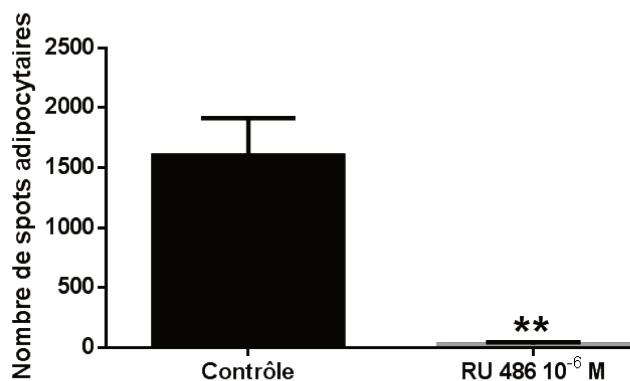


Figure 36 : Quantification en microscopie à haut débit (HTM) d'adipocytes matures après blocage à partir de J3 du GR par RU 486. ** $P < 0,005$ (Mann Whitney U-test).

Les résultats sont représentatifs de 1602 ± 313 spots adipocytaires après différenciation classique (contrôle) alors que seuls 27 ± 19 spots adipocytaires sont comptabilisés après traitement par le RU486. (moyenne \pm SEM). ** $P < 0,005$ (Test non paramétrique Mann Whitney)

Par ailleurs, l'expression de *PPAR γ* , induite à partir de J11 d'une différenciation adipocytaire contrôlée, semble être diminuée après traitement par le RU486 (**Figure non montrée**).

Ces premiers résultats montrent l'implication majeure du GR dans le processus de différenciation adipocytaire humaine, avec un blocage quasi-total de la différenciation lorsque le GR est inhibé pharmacologiquement par l'antagoniste. De manière intéressante, il faut noter que le RU486 est sans action sur le MR. Les résultats de nos expériences suggèrent que le blocage de la voie de signalisation de GR n'est pas compensé par la voie de signalisation MR, malgré la présence de GC dans le milieu et dans la limite du modèle étudié.

Dans un deuxième temps, nous avons travaillé sur un modèle cellulaire de lignée corticosurrénalienne humaine, les H295R, afin d'explorer les conséquences d'une altération de la voie de signalisation GR sur l'hyperplasie bilatérale des surrénales.

A)

ACCTATGTGCTGGAAGGAATGATTGCATCATCGATAAAATTCTGAAGAAAAACTGCCCA
GCATGCCGCTATCGAAAATGCTTTCAGGCTGGAATGAACCTGGAAGGTAATATAAATAT
CT

en rouge : Séquence Crispr ; en bleu Séquence Pam

B)

Gène	Localisation sur le gène	Séquence génomique	PAM sequence	nombre de mésappariements	Localisation génomique
<i>JAZF1</i>	intron 1	CATAAGACAATTTTCGATAG	AGG	3	chr7[28159073]
<i>PTPRQ</i>	intron 43	TCTGAAGACAATTTCAATAG	AGG	3	chr12[80677689]
<i>FAM118A</i>	exon 10	CCTAAAACATTTTCCTAG	CGG	3	chr22[45341207]
<i>LINC02055</i>	intron 2	CCTGAAGCATTTCCTACAG	TGG	3	chr8[136383426]
<i>DHX29</i>	intron 18	CCTGAAACATTTTCCTAG	AGG	3	chr5[55271078]

C)

AAACACATGCTGTATGTTTCCTCTGAGTTACACAGGCTTCAGGTATCTTATGAAGAGTAT
CTCTGTATGAAAACCTACTGCTTCTCTTTCAGGTTGGTAGAACACCTTTTCACCTTAT

en rouge : Séquence Crispr ; en bleu Séquence Pam

D)

Gène	Localisation sur le gène	Séquence génomique	PAM sequence	nombre de mésappariements	Localisation génomique
<i>SLC41A2</i>	intron 7	TACTGATTCTCTCTACATGT	AGG	3	chr12[104849334]
		CACTGTTTCTCTCTCAGGT	AGG	3	chr17[40686332]
		TACTGCTTCTCTCTCAGT	TGG	3	chr2[228735482]
		TGCTGCTTCTGCTTTCAGG	AGG	3	chr7[108634718]
		GACTGCTTTCTCTTCAGGT	TGG	2	chr17[71016696]
<i>GSDME</i>	intron 6	GACAGCTTCTCTTCAGGC	TGG	3	chr7[24709157]
		TGCTGCTTCTCTTTCAGG	GGG	3	chr16[85593892]
<i>AC092127.1</i>	exon 1	TCTGCTTCTCATTCAGGT	AGG	3	chr1[205223510]
		CACTGGTTCTCTTAAGGT	GGG	3	chr1[178582975]
		CACTGCTTCACTTTCAGGA	GGG	3	chr3[102743195]
		TACTGCTTCCCTCTCTGGT	TGG	3	chr3[122992547]
<i>CTDSPL2</i>	intron 5	TGCTGCTTGTCTCTTCAAGT	TGG	3	chr15[44492658]
<i>SLC39A12</i>	intron 12	GACTGGTTCTCTTCAAGT	AGG	3	chr10[18005549]

Figure 37 : Dessin des gRNA ciblant l'exon 4 et 7 et prédiction des off-targets correspondantes

A) Design du guide RNA ciblant l'exon 4

B) Potentiels off-targets prédits pour le guide ciblant l'exon 4, et localisation génomique des off-targets, sur le Genome Reference Consortium Human Build (hg38)

C) Design du guide RNA ciblant l'exon 7

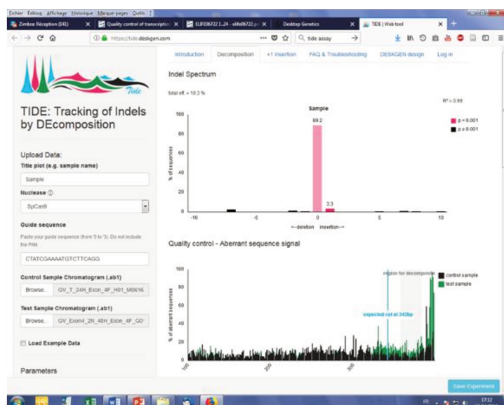
D) Potentiels off-targets prédits pour le guide ciblant l'exon 7 et localisation génomique des off-targets, sur le Genome Reference Consortium Human Build (hg38).

Avant ma première année de thèse, nous avons opté pour un système de double transfection séquentielle. Nous avons dessiné avec la société Life Technologies, un guide RNA (gRNA) ciblant l'exon 4, encadrant les acides aminés sièges des mutations R477S et Y478C et un autre dans l'exon 7, encadrant l'acide aminé muté pour L672P. Pour choisir parmi les différents guides proposés, nous avons opté pour les guides comportant le moins de off-targets, qui correspondent à des séquences génomiques présentes sur d'autres régions, potentiellement ciblées par ces ARN guides et donc possiblement susceptibles de subir aussi une cassure double brin aux conséquences fonctionnelles imprévisibles (**Figure 37**). Nous avons transfecté dans un premier temps, un plasmide de sélection exprimant une GFP, se recombinant après coupure par la Cas 9 et par conséquent marqueur de l'efficacité de coupure par la Cas 9. Puis le jour suivant, nous avons transfecté l'ARN guide, la protéine Cas 9 et l'oligonucléotide simple brin de réparation (contenant la mutation désirée) de 100 pb. Néanmoins, nous avons mis en évidence un défaut majeur de ce système de sélection puisqu'il existait une expression basale de fluorescence orange dans les cellules transfectées par le plasmide seul (sans transfection simultanée du complexe ARN guide/Cas9), probablement par recombinaison homologue autonome de celui-ci, rendant ainsi l'étape de sélection des clones cellulaires potentiellement mutés impossible à réaliser (Master 2 de Nelly RAMOS, Biologie Santé, spécialité Endocrinologie et Métabolisme de Nelly RAMOS 2015-2016, Université Paris Sud).

Nous avons ensuite voulu nous assurer de la présence d'une coupure par la Cas 9, au niveau des cibles génomiques choisies dans des cellules facilement transfectables comme les cellules HEK293T ou dans les cellules H295R. Après échec de la visualisation de la coupure par la Cas 9 de l'ADN génomique par la technique de SURVEYOR PCR, nous avons utilisé le logiciel TIDE (Brinkman et al. 2014) pour connaître le pourcentage de coupure génomique assurée par la Cas 9 et les guides RNA. Il s'agit d'un algorithme informatique qui compare la séquence de l'ADN génomique de cellules non transfectées à celle de la séquence obtenue à partir de cellules transfectées avec la technologie CRISPR/Cas 9. Ce programme fait une estimation du pourcentage de clivage (indel) secondaire aux différents mésappariements obtenus. Nous avons ainsi pu montrer que la Cas 9 était capable de couper avec un pourcentage faible de 10 % l'ADN génomique associé au guide RNA ciblant l'exon 4 et de 5% celui associé au guide RNA ciblant l'exon 7 (**Figure 37**).

A)

Guide RNA ciblant l'exon 4 HEK

10% de
coupure

B)

Guide RNA ciblant l'exon 7 H295R

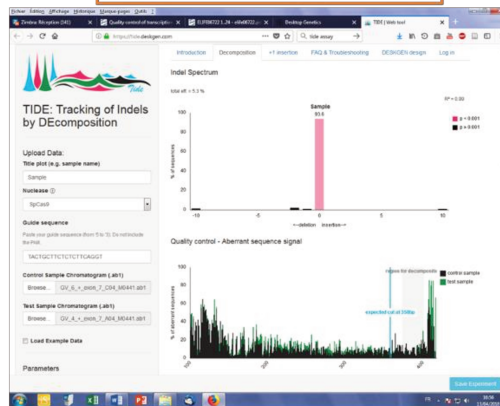
5% de
coupure

Figure 38 : Evaluation du pourcentage de coupure des guides RNA par TIDE,

après transfection de CRISPR/Cas protéine, du guide RNA ciblant l'exon 4 ou 7 dans des cellules HEK ou H295R

A) 10% de coupure visible après transfection dans des cellules HEK du guide RNA ciblant l'exon 4

B) 5 % de coupure visible après transfection dans des cellules H295R du guide RNA ciblant l'exon 7

Suite à des échanges avec l'équipe de Reiner VEITIA (Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Oncologie Moléculaire et Pathologies Ovariennes) et aux difficultés rencontrées devant la recombinaison autonome du plasmide de sélection, rendant caduque cette approche, nous avons opté pour une autre approche consistant à faire exprimer la protéine Cas 9 à partir d'un vecteur d'expression plasmidique, associée au gRNA ciblant l'exon 4 ou 7 et de l'OPF, marqueur de la transfection du plasmide dans les cellules. Nous avons transfecté le plasmide dans des cellules H295R. L'expression de la fluorescence orange a permis de trier les cellules transfectées en cytométrie de flux (FACS). Le pourcentage de cellules transfectées est faible, moins de 1% sur plus de 3000 cellules. Nous avons donc ensuite tenté d'effectuer un clonage cellulaire par une dilution limite en mettant en culture théoriquement une cellule transfectée par puits et en surveillant l'expansion cellulaire clonale d'un clone unique par puits. Après sélection des différents clones cellulaires, obtenus après FACS, nous avons sélectionné les clones ayant potentiellement intégré la mutation désirée par PCR allèle spécifique (Sarkar et al. 1990). Cette technique consiste à identifier les clones porteurs de la mutation désirée : l'amorce sens n'est pas spécifique de la mutation désirée, cible une séquence ADN présente aussi bien sur l'allèle sauvage que l'allèle muté, alors que l'amorce anti-sens est spécifique de la mutation puisqu'elle n'est censée s'hybrider qu'avec la séquence mutée. Ainsi, après PCR puis migration sur gel, nous pourrions mettre en évidence les clones avec la mutation désirée,

soit à l'état hétérozygote (deux bandes : une correspondant à l'allèle sauvage et une à l'allèle muté) (**Figure 39**), ou homozygote (seul l'allèle muté apparait). L'ADN génomique de ces clones mutés a ensuite été envoyé au séquençage afin de confirmer la présence de la mutation à l'état hétérozygote ou homozygote.

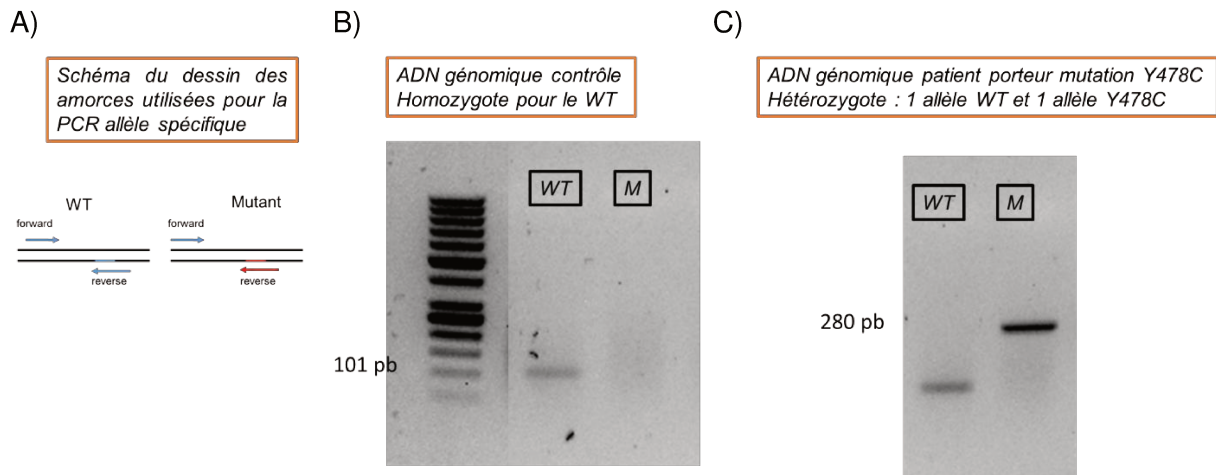


Figure 39 : Validation de la méthode de PCR allèle spécifique ciblant le mutant Y478C

A) Schéma du dessin des amorces de PCR ciblant l'allèle muté : l'amorce reverse est spécifique de la mutation et est située au même endroit sur l'ADN génomique pour l'allèle sauvage (WT) ou l'allèle porteur de la mutation (Mutant) alors que l'amorce forward est située à n'importe quel endroit de l'ADN génomique et cible l'allèle sauvage.

B) PCR avec les amorces ciblant l'allèle sauvage (WT) et ciblant l'allèle mutant Y478C (M) à partir de l'ADN génomique d'un patient non muté pour Y478C.

C) PCR avec les amorces ciblant l'allèle sauvage (WT : 101 paires de bases (pb)) et ciblant l'allèle mutant Y478C (M : 280 paires de base (pb)) à partir de l'ADN génomique d'un patient porteur de la mutation hétérozygote Y478C.

Nous avons analysé 4 clones pour les cellules transfectées avec l'oligonucléotide de réparation ciblant la mutation L672P et une dizaine de clones avec les cellules transfectées avec l'oligonucléotide de réparation ciblant la mutation Y478C et R477S. A l'issue de ces investigations, nous n'avons réussi à obtenir aucun clone porteur de mutations du GR.

4. Discussion et prolongement du travail

Les patients porteurs de mutations du GR présentaient cliniquement une obésité pouvant être parfois très sévère avec des IMC très élevés (Vitellius, Trabado, Hoeffel, et al. 2018) pouvant aller jusqu'à 46,9 kg/m² et une hyperplasie surrénalienne bilatérale.

Nous allons dans un premier temps discuter l'hypothèse de l'implication du GR dans l'obésité puis dans l'hyperplasie surrénalienne et les difficultés rencontrées avec la technologie CRISPR/Cas 9.

4.1 L'implication du GR dans l'obésité

Dans un modèle de pré-adipocytes humains, nous avons réussi à différencier en adipocytes matures seulement 20% des cellules. Cette différenciation macroscopique objectivée par la quantification de gouttelettes lipidiques s'accompagne d'une augmentation de l'expression de nombreux gènes exprimés temporellement de manière différente au cours de la différenciation. Nous avons ensuite montré que malgré le faible degré de différenciation adipocytaire des hMADS, le blocage du GR par le RU486, un antagoniste du GR, mimant une altération de la signalisation GC avec un GR peu fonctionnel, était responsable d'une absence de différenciation adipocytaire de cellules préadipocytaires humaines, suggérant donc un rôle majeur du GR dans l'adipogenèse mais limitant l'implication du MR dans la physiopathologie de l'obésité des patients porteurs de mutations du GR, qui dans notre modèle cellulaire n'apparaît que tardivement (J10) au cours de la différenciation adipocytaire.

L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un rôle important du GR et moindre du MR dans l'adipogenèse humaine. Ces données sont en accord avec d'autres données collectées par d'autres auteurs (Lee et al. 2014), qui ont montré que 70 % d'inhibition du GR par des siRNA dans des cellules préadipocytaires humaines résultait en un blocage complet de l'adipogenèse alors qu'après inhibition du MR, les préadipocytes continuaient à se différencier en adipocytes matures (Lee et al. 2014). De plus, Hu et al., (Hu et al. 2011) ont mis en évidence que le blocage du GR par le RU 486 entraînait une absence d'augmentation du transcrit d'aP2, codé par le gène *FABP4*, dans des cellules humaines préadipocytaires d'origine sous-cutanée, suggérant une absence de différenciation adipocytaire. Des études *in vivo* ont été également réalisées sur des modèles de souris et sont également en faveur du rôle protecteur de l'absence de GR dans le tissu adipeux. Dalle et al (Dalle et al. 2019) ont montré que des souris traitées pendant 4 semaines par de la corticostérone présentaient une prise de poids associée à une augmentation de la masse grasse et une diminution de la masse maigre. Alors que le phénotype des souris présentant un KO du GR dans le tissu adipeux blanc était très différent, sans variation d'activité physique, ni de prise alimentaire, et présentait une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline et biologiquement un taux d'HDL cholestérol

plus élevé. Enfin d'autres KO adipocytaires chez la souris sont en faveur d'un effet bénéfique de l'absence du GR dans l'adipocyte (de Kloet et al. 2015; Abulizi et al. 2019; Shen et al. 2017). Des modèles différents complémentaires ont donc été utilisés : le modèle *in vitro* humain où le GR est inhibé avant le début de la différenciation adipocytaire, dès J3 et *in vivo* de souris, où le knock-out du GR a lieu dans des cellules adipocytaires matures en fin de différenciation adipocytaire. Ces deux modèles montrent qu'un GR peu fonctionnel semble donc peu impliqué dans l'hyperplasie ou l'hypertrophie adipocytaire.

Afin de répondre à l'implication du GR dans l'obésité, l'étude clinico-biologique des patients porteurs de mutations inactivatrices du GR sera très importante. Cliniquement, il nous manque des données fiables et solides pour préciser les éléments associés à l'obésité de ces patients, par exemple, nous n'avons pas eu accès à l'étude de leur comportement alimentaire avec une description du nombre de calories ingérées par jour, ni de leur profil métabolique précis avec notamment, un bilan lipidique complet, mais également l'étude de la répartition viscérale ou sous-cutanée de leur graisse abdominale.

D'autres mécanismes associant la fonctionnalité du GR et l'obésité ont été évoqués par différents auteurs, notamment le rôle de l'enzyme 11 β -HSD1, qui augmente la concentration locale en GC actifs (Staab et al. 2010; Morgan et al. 2014). Cette enzyme est augmentée dans le tissu adipeux des patients obèses (Seckl et al. 2004). De plus, il a été montré que le traitement par GC augmentait l'expression et l'activité de l'enzyme 11 β -HSD1 (Cooper et al. 2002), suggérant une régulation de cette enzyme par le GR. Dans notre recrutement de patients porteurs de mutations inactivatrices du GR, nous avons démontré une haploinsuffisance du GR avec une réduction de l'expression de certains gènes cibles du GR. Il est par conséquent raisonnable de penser que l'enzyme 11 β -HSD1 est moins exprimée et moins active chez les patients mutés que chez les patients non mutés, diminuant ainsi la production locale adipocytaire de GC actifs.

Une des limites de notre étude était le modèle cellulaire humain très inconstant et la non-reproductibilité de la différenciation adipocytaire, celle-ci variant d'une expérience à l'autre avec parfois moins de 5% de cellules adipocytaires différenciées en fin de différenciation rendant difficile l'interprétation des résultats. Après discussion avec une autre équipe, il s'est avéré qu'elle avait rencontré des difficultés similaires. Il est toutefois à noter qu'une équipe a récemment publié de bons résultats de différenciation adipocytaire avec ces mêmes cellules (Glantschnig et al. 2019). Le protocole de différenciation semble pourtant être en partie le même que le nôtre en dehors de l'utilisation du FGF2. Les différences de plastiques utilisés pour la culture cellulaire ou encore de lot de SVF utilisé dans le milieu de culture pourraient également modifier le pourcentage de différenciation.

4.2 L'implication du GR dans l'hyperplasie surrénalienne

L'implication du GR dans une boucle de régulation impliquant différentes enzymes de la stéroïdogenèse comme CYP11A1, CYP21A2, CYP11B1, le transporteur StAR ainsi que les produits de ces enzymes comme le 11-désoxycortisol, ou la 17-hydroxyprogestérone qui sont inhibés lors de l'utilisation d'un antagoniste du GR, le RU486 ou par des SiRNA ciblant le GR avait été démontré par Asser et al en 2014 (Asser et al. 2014). Le GR semble également réguler positivement le récepteur de l'ACTH et son blocage par le RU486 diminue l'expression du gène codant ce récepteur. Un des objectifs que nous nous étions fixé était de générer des mutants du GR dans un modèle corticosurrénalien pour étudier finement la relation entre le défaut de la voie de signalisation glucocorticoïde et l'hyperprolifération corticosurrénalienne. Malgré des efforts soutenus et répétés, nous n'avons malheureusement pas pu obtenir de mutant GR à l'aide de la technologie CRISPR/Cas 9 dans la lignée H295R. L'utilisation de cette nouvelle technologie aurait pu nous permettre d'explorer le rôle du GR dans l'hyperplasie surrénalienne en utilisant les techniques précédemment mises en œuvre au laboratoire (Asser et al. 2014), à savoir l'étude de l'expression au niveau génique et protéique des différentes enzymes en RT-qPCR et en WB et de leurs activités par dosage en LC-MS-MS du substrat et du produit des enzymes permettant d'évaluer l'impact de l'altération de la signalisation GC sur chaque étape enzymatique. Nous aurions pu également étudier le rôle du GR dans l'hyperplasie surrénalienne par des études de prolifération cellulaire (Cavalcante et al. 2017) mais également par WB en étudiant les voies impliquées dans l'hyperplasie surrénalienne comme la voie de l'APMc ou la voie Wnt/ β -caténine et en les comparant à des cellules H295R ayant également subi le procédé de CRISPR/Cas 9 mais non responsable de l'introduction d'une mutation. Nous avons également envisagé de réaliser un ChIP-seq afin d'étudier les différences de recrutement des gènes entre des cellules ayant un GR normal et celles ayant un GR muté en présence de DXM.

Les modèles de souris nous apportent également de nouvelles pistes de réflexion, notamment celui du KO du gène *Hsd11b1*, gène cible du GR, décrit par Kotelevtsev (Kotelevtsev et al. 1997). Les souris déficientes en enzyme 11 β -HSD1 présentent une hyperplasie surrénalienne bilatérale. Ce déficit enzymatique s'accompagne d'une diminution de production de GC actifs localement. Une carence en GC produit localement pourrait s'accompagner d'une régulation négative de la voie de signalisation GC, à la manière de l'haploinsuffisance du GR observée chez les patients porteurs de mutations inactivatrices hétérozygotes du GR. Les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR présentent-ils une diminution d'induction de *HSD11B1*, responsable de l'hyperplasie surrénalienne ? Si la technologie CRISPR/Cas 9 avait été un succès, la régulation et l'expression de ce gène aurait pu faire l'objet d'investigations ultérieures.

Lefebvre et al (Lefebvre et al. 2003) ont également montré que le dosage d'ACTH sanguin ne reflétait pas la concentration d'ACTH dans les surrénales puisque chez des patients présentant une hyperplasie macronodulaire des surrénales ACTH indépendant, le cathétérisme des veines surrénales révélait des concentrations élevées d'ACTH suggérant une boucle de régulation très courte intrasurrénale responsable d'une production locale d'ACTH.

4.3 Le système CRISPR/Cas 9

Nous avons rencontré des difficultés avec l'utilisation du système CRISPR/Cas 9 et n'avons obtenu aucun clone cellulaire porteur d'une des mutations désirées. Plusieurs étapes ont été limitantes, notamment la très faible capacité à transfecter efficacement les cellules H295R, la faible efficacité des guides RNA, la longueur et la lourdeur de la technique de dilution limite avec une perte cellulaire importante lors de l'expansion des clones. L'utilisation de la technologie de CRISPR/Cas 9 pour réaliser un knock-in est en réalité très peu rapportée dans la littérature malgré certains succès récents (Miao et al. 2019) obtenus par injection de la Cas 9 sous forme d'ARN messager ou en protéine dans les cellules fœtales porteuses de l'anomalie chromosomique au stade de zygote. Miao et al ont également montré qu'il existait une meilleure efficacité de la Cas 9 en protéine. Malheureusement, nous n'avons pas pu continuer à utiliser la transfection de la protéine Cas 9 dans la mesure où il existait une recombinaison autonome du plasmide OFP utilisé avec cette technologie, ce qui ne nous a pas incités à persévérer avec cette stratégie. L'utilisation simultanée de deux guides RNA (Liu et al. 2018; Mali et al. 2013) semble conduire également à une meilleure efficacité de coupure ou encore l'utilisation d'une Cas 9 mutée (Ran et al. 2013) favorise le mécanisme de réparation HDR. Quoi qu'il en soit, le succès à l'emploi de la technologie CRISPR/Cas 9 rapporté dans la littérature n'est rarement, voire jamais, accompagné du séquençage des off-targets précédemment décrits. Cette négligence est susceptible d'avoir des conséquences dramatiques, avec la coupure double brin potentielle d'un fragment d'ADN contenant un gène d'intérêt majeur, entraînant une perte de fonction et pouvant conduire à une mauvaise interprétation des résultats.

DISCUSSION GENERALE

Nous avons donc étudié sept nouvelles mutations hétérozygotes du GR : R477S, Y478C, R491X, Q501H, Y660X, L672P et I757V, parmi les 31 mutations inactivatrices du GR décrites à ce jour (**Figure 40**) (Vitellius, Trabado, Hoeffel, et al. 2018; Tatsi et al. 2019).

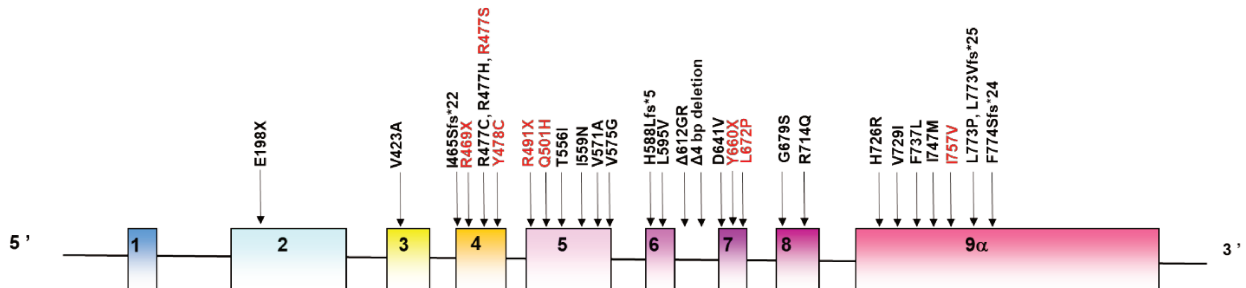


Figure 40 : Position des 31 mutations inactivatrices du GR qui ont été découvertes

31 mutations inactivatrices du GR ont été rapportées sur 33 familles mutées, données recueillies en juin 2019. En rouge, les mutations inactivatrices du GR identifiées par notre équipe.

Cette discussion sera partagée en deux parties : une partie explorant les résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo* et une partie sur l'apport de cette thèse de sciences en pratique clinique.

1. Caractérisation fonctionnelle des mutants *in vitro* et *ex vivo*

La caractérisation fonctionnelle *in vitro* des 7 mutations hétérozygotes du GR est résumée dans le **tableau 6** ci-dessous.

	Localisation protéique	Expression protéique	Liaison à la DXM	Transfert cyto-nucléaire hormono-induit	Liaison à l'ADN	Transactivation	Modélisation 3D
R477S	DBD	Normale	Comparable au GRWT	Retardé	Nulle	Absente	Perte de contact avec l'ADN
Y478C	DBD	Normale	Comparable au GRWT	Retardé	Retardée	↘	Déstabilisation du DBD
R491X	HR	Tronquée	Nulle	Pas de transfert	∅	Absente	NF
Q501H	HR	Normale	NF	Retardé	Normale (EMSA)	Normale	NF
Y660X	LBD	Diminuée (Dégradation)	Nulle	Pas de transfert	∅	Absente	NF
L672P	LBD	Diminuée (Dégradation)	Nulle	Pas de transfert	∅	Absente	Déstructuration de l'hélice H8
I757V	LBD	Diminuée (Dégradation)	Nulle	Pas de transfert	∅	Absente	Déstructuration de l'hélice H12

Tableau 6 : Résumé de la caractérisation fonctionnelle des 7 mutations hétérozygotes du GR

NF : Non fait, DBD : Domaine de liaison à l'ADN, LBD : domaine de liaison au ligand, HR : Hinge région, région charnière

Parmi les mutations étudiées, seule la mutation Q501H n'est pas responsable d'une diminution de transactivation d'un gène cible du GR, *in vitro*. Concernant cette mutation, nous avons mis en évidence une perte de l'effet dominant négatif du GR β Q501H sur le GR α .

L'étude *ex vivo* des mutations, sur les fibroblastes, est particulièrement intéressante car elles sont présentes à l'état hétérozygote chez les patients. Nous avons montré que dans les fibroblastes des patients porteurs de mutation inactivatrice du GR, il existait une haploinsuffisance du GR en messager et en protéine, alors même que ces mutations ne semblent pas exercer d'effet dominant négatif sur l'allèle sauvage. Nous avons étudié *ex vivo* les mutations R491X et Q501H. Nous avons pu expliquer un des mécanismes de l'haploinsuffisance pour la mutation, R491X responsable d'un codon stop prématuré, subissant par conséquent la dégradation de l'allèle muté probablement secondaire au mécanisme de NMD. Ces mutations semblent toutes entraîner une diminution protéique du GR α responsable d'une diminution d'induction des gènes cibles. Cependant, nous avons montré que l'induction de certains gènes cibles du GR, *PER-1* et *SGK1* n'était pas modifiée par la présence de la

mutation, alors que l'haploinsuffisance d'autres gènes cible comme *FKBP5* était marquée, mettant en évidence une modulation gène spécifique.

Reddy et al (Reddy et al. 2009) ont montré que *PER-1* était régulé positivement par la DXM dès l'utilisation de petites concentrations de DXM (EC50 500 pM) et l'utilisation d'un siRNA bloquant le GR dans des cellules humaines d'adénocarcinome de poumon ne modifiait pas l'induction de l'ARN messager de *PER-1* après 1 h d'exposition à 10^{-7} M de DXM. Cela pourrait expliquer les raisons pour lesquelles nous n'avons pas montré de diminution d'induction de *PER-1* après 6 h d'exposition à 10^{-7} M de DXM dans les fibroblastes des patients porteurs des mutations inactivatrices du GR. L'utilisation d'une concentration plus faible de DXM, nous permettrait peut-être de mettre en évidence une diminution d'induction de ce gène cible. Des GRE ont été identifiés dans les 3 gènes cibles du GR que nous avons étudiés : *FKBP5*, contient un GRE identifié dans l'intron 5 du gène (Hubler et al. 2004) et *PER-1*, un GRE situé dans le premier intron et le second GRE identifié est situé en aval du site d'initiation de la transcription (Reddy et al. 2009). La présence de GRE dans le gène *SGK1* ou dans son promoteur n'a pas été clairement mise en évidence et l'utilisation d'un inhibiteur de la transcription ne diminue pas son induction en présence de DXM suggérant un mécanisme de régulation non transcriptionnel, pouvant expliquer l'absence de diminution d'induction de l'ARNm dans les fibroblastes porteurs de GR mutants (Náray-Fejes-Tóth et al. 2000).

Le modèle fibroblastique exprimant les mutations à l'état hétérozygote n'est pas adapté pour répondre aux questions sur l'implication du GR dans l'hyperplasie surrénalienne ou encore dans l'HTA. C'est pourquoi nous voulions réaliser l'introduction stable de mutations GR dans un modèle de cellules corticosurréaliennes humaines, les H295R par la technologie de CRISPR/Cas 9.

Nous avons tenté d'introduire 3 mutants GR dans des H295R afin de pouvoir répondre en partie à cette question. Nous avons été confrontés à plusieurs difficultés. Nous avons initialement opté pour la transfection de la Cas 9 sous forme protéique associée à un plasmide rapporteur se recombinant en présence de la Cas 9. Cependant, nous nous sommes heurtés à la recombinaison autonome du plasmide en absence de Cas 9. Nous avons ensuite étudié le pourcentage de coupure de l'ADN de la Cas 9 en présence de nos différents guides. Alors que dans la littérature ce pourcentage peut atteindre 25% (Liu et al. 2018), nous avons rencontré des difficultés avec le tampon pour détecter les mésappariements, acheté avec le kit CRISPR/Cas 9 et les pourcentages de mésappariements avec l'aide du logiciel TIDE ont montré des niveaux très faibles de mésappariements de l'ordre de 5 à 10 % alors même que nous avons transfecté la Cas 9 et nos guides RNA dans des cellules très facilement transfectables. La sélection des cellules par FACS a également été compliquée. Seulement 1% des cellules H295R ont été transfectées. Puis les différentes étapes de sélection d'un clone unique ont entraîné la perte de nombreux clones cellulaires. Nous n'avons pas pu obtenir de

clone CRISPR contenant une mutation GR, or cette étape est essentielle pour répondre à la question du rôle du GR dans l'hyperplasie surrénalienne.

2. Implication du GR en clinique

2.1 Corrélation phénotype-caractérisation fonctionnelle

Il semble assez difficile de réaliser une corrélation phénotype-caractérisation fonctionnelle, avec parfois une discordance entre les résultats obtenus *in vivo*, la résistance aux GC, *in vitro*, avec la transactivation et *ex vivo*, avec l'expression d'un gène cible endogène (**Tableau 7**). Concernant le patient porteur de la mutation R491X, les signes de résistance aux GC (CLU élevé, négativité du test de freinage minute, concentration plasmatique d'ACTH normale ou élevée) sont en accord avec l'absence de transactivation et l'haploinsuffisance du gène cible du GR, *FKBP5*. Alors que la patiente porteuse de la mutation Q501H, n'a aucun signe de résistance aux GC (CLU normal, freinage au freinage minute et concentration plasmatique d'ACTH basse), une transactivation *in vitro* normale mais une très forte diminution d'induction du gène *FKBP5*, évaluée dans les fibroblastes de la patiente. Finalement, la mise en évidence de cette haploinsuffisance ne semble pas être responsable d'une altération drastique de la signalisation GR-GC chez cette patiente.

	Localisation protéique	Résistance aux GC	Transactivation <i>in vitro</i>	<i>FKBP5</i> haploinsuffisance
R491X	HR	Oui	Nulle	++
Q501H	HR	Non	Normale	+++

Tableau 7 : Caractéristiques cliniques et caractérisation fonctionnelle des mutations R491X et Q501H

++ : haploinsuffisance de 50 % de *FKBP5*, +++ : haploinsuffisance de 70% de *FKBP5*, HR : Hinge region, région charnière.

Ce travail a ensuite contribué à mieux comprendre l'implication des mutations inactivatrices du GR sur la physiopathologie des patients. Nous avons ainsi pu mieux comprendre certaines caractéristiques des patients et répondre à certaines questions que nous nous posions.

2.2 Quand faut-il réaliser un séquençage du GR ?

La moitié des mutations inactivatrices du GR ont été découvertes à partir de 2010. Les modes de découverte sont variés, allant d'un bilan biologique d'exploration d'un hirsutisme pouvant être responsable d'une ambiguïté sexuelle (Mendonca et al. 2002), d'une obésité, d'un incidentalome surrénalien unilatéral ou bilatéral, ou encore la découverte d'une HTA souvent associée à une hypokaliémie.

Initialement, les mutations inactivatrices du GR étaient découvertes devant un bilan biologique associant une concentration plasmatique d'ACTH élevée et un CLU élevé souvent à plus de 5 fois la normale. A partir de 2010, les mutations ont été découvertes devant soit la biologie classique associant une concentration d'ACTH élevée et un CLU très élevé mais également devant un tableau biologique plus modéré avec des concentrations d'ACTH normales associées à un CLU modérément élevé (< 5N) et même devant un bilan biologique cortisolique normal en dehors d'un cortisol à minuit légèrement élevé.

Le PHRC Muta-GR a montré que la prévalence des mutations inactivatrices du GR n'était pas si rare. En effet, sur une population de 100 patients avec une hyperplasie bilatérale des surrénales associée à un hypercortisolisme biologique et/ou une HTA sans signe clinique de syndrome de Cushing, la prévalence des mutations inactivatrices du GR était de 5 %. Les découvertes d'incidentalomes surrénaliens associés à un hypercortisolisme infra-clinique répondant finalement à la définition d'une anomalie du bilan cortisolique chez un patient ne présentant pas de signe clinique de Cushing, sont de plus en plus fréquentes (Reincke et al. 1992; Hong et al. 2017) s'élevant à 7% dans une population d'incidentalomes surrénaliens et à 50% dans une population d'hyperplasie bilatérale des surrénales.

Nous avons donc essayé d'affiner les éléments cliniques et biologiques permettant de cibler au mieux le séquençage du GR. Nous avons montré dans le cadre de l'analyse des résultats du PHRC Muta-GR (Vitellius, Trabado, Hoeffel, et al. 2018) que la sélection des patients avec une hyperplasie bilatérale des surrénales associés à un hypercortisolisme biologique, regroupait 9% des patients inclus et en associant également une aldostéronémie normale ou basse et une kaliémie strictement inférieure à 4 mmol/L, nous réussissons à diagnostiquer 4 mutations inactivatrices du GR. Cependant, ces critères restent très arbitraires mais l'association entre un syndrome de résistance aux GC et des anomalies du SRAA semblent tout de même cohérent (Vitellius et al. 2019). De plus les recommandations de la Société Européenne d'Endocrinologie suggèrent la réalisation du dosage d'aldostérone et de rénine plasmatique chez les patients présentant un incidentalome surrénalien associé à la présence d'une HTA ou d'une hypokaliémie. Ces deux signes clinico-biologiques sont présents, d'après la revue de la littérature, réalisée par Paschou et al (Paschou et al. 2016), chez 50 à 70 % des

patients avec un hypercortisolisme infra-clinique et un incidentalome surrénalien. Finalement, ce dosage est en pratique clinique souvent réalisé.

2.3 L'implication du GR dans l'hypertension artérielle

Nous avons montré lors de la description de la première mutation inactivatrice non-sens du GR (Bouligand et al. 2010) que l'HTA du propositus était en lien avec une diminution d'activité de l'enzyme 11 β -HSD2 rénale. Nous avons montré au cours de la thèse que le gène *HSD11B2* codant pour l'enzyme 11 β -HSD2 est sous la dépendance du GR et que l'existence d'une haploinsuffisance du GR chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR, est probablement responsable d'une diminution de l'activité de cette enzyme, impliquée dans l'HTA de ce patient (Vitellius et al. 2019). Finalement, beaucoup de questions restent à être élucidées.

Nous avons montré des différences dans l'expression du gène cible, *FKBP5* du GR, en fonction de la nature de la mutation inactivatrice du GR, non en lien avec sa capacité de transactivation *in vitro*. Le mutant Q501H a une capacité transactivatrice équivalente à celle du GR sauvage *in vitro* mais conduit à une diminution très importante d'expression du gène cible *FKBP5 ex vivo*.

Nous avons pu mesurer les métabolites urinaires du cortisol permettant d'évaluer le rapport THE/THF, reflet de l'activité de l'enzyme 11 β -HSD2, uniquement pour un patient (Bouligand et al. 2010). Il est donc difficile de savoir si cette diminution d'activité est corrélée au degré d'haploinsuffisance du GR. Cependant, certains patients présentent une HTA associée à une hypokaliémie alors que d'autres présentent uniquement des anomalies isolées du SRAA, suggérant un déficit fonctionnel de l'enzyme 11 β -HSD2 moins important. L'étude des corrélations génotype-phénotype des mutations du gène *HSD11B2* responsable d'un excès apparent de minéralocorticoïdes (AME) nous apporte quelques réponses.

Carvajal et al (Carvajal et al. 2018) ont étudié le retentissement de deux mutations du gène *HSD11B2* au sein d'une même famille présente à l'état hétérozygote pour certains membres et à l'état homozygote pour le propositus. De manière intéressante, les auteurs ont montré que les porteurs hétérozygotes avaient une pression artérielle normale associée à une kaliémie et un SRAA normal. Cependant, les métabolites urinaires du cortisol, reflet de l'activité de la 11 β -HSD2 (Mune et al. 1996) restent supérieurs aux valeurs de référence pour tous les patients, suggérant une diminution d'activité de cette enzyme mais sans atteindre les niveaux des patients homozygotes. Nunez et al (Nunez et al. 1999) ont montré que la kaliémie était faiblement mais significativement corrélée à l'activité enzymatique de l'enzyme 11 β -HSD2. Finalement, pour connaître le degré d'activité résiduelle de l'enzyme 11 β -HSD2, il faudrait réaliser chez les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR, le dosage des métabolites urinaires du cortisol, qui est bien corrélée à l'activité de l'enzyme (Carvajal et al.

2018). Lorsque l'HTA est associée à l'hypokaliémie, l'activité de cette enzyme est probablement très basse et un traitement par un antagoniste du MR, la spironolactone, semble être important, en raison des complications associées (Dave-Sharma et al. 1998; Tatsi et al. 2019; Donner et al. 2013) (arrêt cardiaque précoce, hypertrophie ventriculaire gauche, néphrocalcinose).

La difficulté reste le suivi des patients n'ayant pas encore d'HTA. Bien que des articles aient montré que l'activité de cette enzyme diminuait avec l'âge des patients (Henschkowski et al. 2008), nous ne connaissons pas l'évolution clinique des patients mutés. De plus, l'HTA a des origines multifactorielles et par conséquent, nous ne savons pas si elle se développera ou non et donc un suivi à long terme de ces patients semble nécessaire, voire impératif.

2.4 L'implication du GR dans l'hyperplasie surrénalienne

Actuellement, la principale voie de signalisation démontrée comme étant responsable de l'hyperplasie surrénalienne est l'hyperactivité de la voie de l'AMPc soit par activation du récepteur MC2R ou de récepteurs illégitimes, ou des mutations des différents intervenants tout au long de cette voie de signalisation. Nous avons montré dans le cadre des résultats du PHRC Muta-GR que les mutations inactivatrices du GR représentaient une étiologie dans 5% de cas. Emms et al (Emms et al. 2016) retrouvent la présence de 3 variants d'*ARMC5*, gène décrit comme associé à l'hyperplasie bilatérale des surrénales (HBS) dans le syndrome de Cushing ACTH-indépendant (Assié et al. 2013) dans une population de 39 patients avec des HBS (prévalence estimée à 7,7 %) alors que Albiger et al (Albiger et al. 2017) ont montré qu'elle était de 21% (15/71) également dans une population d'HBS. Les autres mutations germinales identifiées dans l'HBS ont été découvertes avec une prévalence beaucoup plus faible par rapport à *ARMC5*. Libé et al ont retrouvé (Libé et al. 2005) la mutation *GNAS* chez un patient parmi 10 patients avec une HBS associée à un syndrome de Cushing ACTH indépendant. Vezzosi et al ont trouvé 13 variants hétérozygotes *PDE11A* dont au moins deux sont pathogènes dans une population de patients avec un syndrome de Cushing ACTH indépendant et une HBS (Vezzosi et al. 2012). De plus, il a été montré que malgré l'activation de la voie de l'AMPc par les mutations du gène *GNAS* ou du gène *PRKAR1A*, (Almeida et al. 2012), les mutations *GNAS* étaient responsables davantage d'une augmentation des transcrits tels que NF- κ B, indépendants de la voie de la PI3 kinase, alors que les mutations du gène *PRKAR1A* entraîne l'activation de la voie de signalisation Wnt. Récemment, lors du congrès de l'ECE à Lyon en mai 2019, l'équipe du Pr Bertherat à Cochin a réalisé un NGS sur une cohorte de 389 patients avec une HBS et ont trouvé dans 27% des cas des variants du gène *ARMC5*, 5 variants de *NR3C1* dont 2 polymorphismes F65V, N363S parmi 31 patients (7,9 %) et seize variants *PDE11A* chez 73 patients (18,7%), confirmant le rôle non négligeable du GR.

Cependant, une analyse fonctionnelle de tous ces variants doit être réalisée afin de conclure à leur caractère délétère.

Le mécanisme par lequel le GR est responsable de cette hyperplasie reste encore à être évalué.

Il a précédemment été démontré par Asser et al (Asser et al. 2014) que le GR était impliqué dans une boucle de régulation autocrine positive responsable de l'augmentation de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse mais également dans l'augmentation du transcrit *MC2R*, codant le récepteur de l'ACTH. Asser et al ont également montré que le blocage du GR par le RU486, situation fonctionnellement proche des patients présentant une haploinsuffisance du GR, prévenait l'activation de la voie de la stéroïdogénèse difficile à mettre en lien avec l'hyperplasie surrénalienne de certains patients.

Une autre piste de réflexion a été apportée par Yang Z et al (Yang et al. 2007) et la régulation positive du gène *HSD11B1* en présence de DXM et inhibée en présence de l'antagoniste du GR dans des cellules fibroblastiques humaines. Il est probable, comme le gène *HSD11B2*, que le gène *HSD11B1* soit régulé par les GC, et que les patients porteurs de mutation inactivatrice du GR présentent également une diminution d'expression de ce gène, pouvant également être impliqué dans l'hyperplasie surrénalienne mais dont le mécanisme précis reste à élucider (Kotelevtsev et al. 1997).

2.5 L'implication du GR dans l'obésité

Une des questions que nous nous étions posées au cours de cette thèse était l'implication des mutations inactivatrices du GR dans la physiopathologie de l'obésité. Nous n'avons pas réussi à démontrer *in vitro* à partir des cellules préadipocytaires humaines, les hMADS, d'hyperplasie ou d'hypertrophie adipocytaire, potentiellement associée à l'obésité, en présence d'un GR peu fonctionnel, mais au contraire une diminution très franche de l'adipogénèse. Malgré le faible pourcentage de différenciation adipocytaire en absence de blocage du GR, ces résultats ont été démontrés par d'autres équipes (Lee et al. 2014; Hu et al. 2011) sans compensation du phénotype par la liaison des GC au MR. Cependant il nous manquait des informations cliniques importantes afin de caractériser au mieux l'obésité des patients mutés, notamment sur la répartition des graisses, viscérale ou sous-cutanée, ainsi qu'une évaluation plus précise du profil métabolique (questionnaire pour évaluation nutritionnelle, poids, taille, tour de taille, tour de hanche, bilan métabolique biologique) pour pouvoir impliquer les GC dans la physiopathologie de l'obésité des patients, comme déjà démontré dans le syndrome de Cushing.

3. Perspectives

Toutes ces questions nous ont poussé à réaliser un projet de recherche clinique local (AOL) dont l'objectif est de répondre aux questions suivantes:

- le déficit en 11 β -HSD2 est-il corrélé à l'haploinsuffisance engendrée par les différentes mutations
- les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR sont-ils plus à risque d'avoir une répartition viscérale des graisses du fait de leur mutation, comme décrits dans les syndromes de Cushing
- tous les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR ont-ils une hyperplasie surrénalienne en relation avec la mutation GR identifiée au sein de la même famille.

Pour répondre à ces questions, nous souhaitons inclure les patients index et les membres de leurs familles ayant une mutation inactivatrice du GR et les comparer aux membres de la famille pour lesquels le dépistage génétique a été rendu négatif.

CONCLUSION GENERALE

Le premier cas de résistance aux GC a été diagnostiqué en 1976 (Vingerhoeds et *al.* 1976) devant un patient d'une quarantaine d'années avec une HTA majeure associée à une hypokaliémie et un bilan biologique retrouvant des concentrations très élevées de CLU et d'ACTH sans signe clinique de syndrome de Cushing. Au cours de cette thèse de sciences, nous avons montré que les patients porteurs de mutations inactivatrices du GR pouvaient présenter une symptomatologie plus modérée avec des signes cliniques, biologiques et hormonaux beaucoup moins importants et des concentrations d'ACTH pouvant être normales jusqu'à un bilan hormonal normal.

Ce travail de thèse de science a également montré à travers les résultats de l'étude nationale Muta-GR que la prévalence des mutations du GR n'était pas si faible avec une prévalence de 5% dans une population de patients sélectionnés. La découverte de ces mutations originales inactivatrices du GR a permis de mettre en évidence la particularité des patients mutés : une hyperplasie surrénalienne, une HTA ou une anomalie isolée du SRAA.

Nous avons également mis en évidence au cours de cette thèse un nouveau gène cible du GR, le gène *HSD11B2* pouvant être un nouveau mécanisme responsable de l'HTA ou des anomalies isolées du SRAA des patients porteurs de mutations inactivatrices du GR.

Nous allons poursuivre ce travail en réévaluant certaines familles de patients porteurs de mutations inactivatrices du GR afin de mieux comprendre le rôle de l'haploinsuffisance du GR dans les pathologies présentées par ces patients.

Ce travail permettra de ne pas méconnaître une mutation inactivatrice du GR et de réaliser un meilleur suivi de ces patients, avec notamment la surveillance régulière de leur pression artérielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abulizi, A, J-P Camporez, M. J. Jurczak, K. F. Høyer, D Zhang, G. W. Cline, V. T. Samuel, G. I. Shulman, et D. F. Vatner. 2019. « Adipose Glucocorticoid Action Influences Whole-Body Metabolism via Modulation of Hepatic Insulin Action ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, mars, fj201802706R. <https://doi.org/10.1096/fj.201802706R>.
- Adams, D. R., et C. M. Eng. 2018. « Next-Generation Sequencing to Diagnose Suspected Genetic Disorders ». *The New England Journal of Medicine* 379 (14): 1353-62. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1711801>.
- Addison, T. 1856. « On the Constitutional and Local Effects of Disease of the Supra-Renal Capsules ». *The British and Foreign Medico-Chirurgical Review* 18 (36): 404-13.
- Albiger, N. M., D. Regazzo, B. Rubin, A. M. Ferrara, S. Rizzati, E. Taschin, F. Ceccato, et al. 2017. « A Multicenter Experience on the Prevalence of ARMC5 Mutations in Patients with Primary Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia: From Genetic Characterization to Clinical Phenotype ». *Endocrine* 55 (3): 959-68. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0956-z>.
- Almeida, M. Q., M. F. Azevedo, P. Xekouki, E. I. Bimpaki, A. Horvath, M. T. Collins, L. P. Karaviti, et al. 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 ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (4): E687-693. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3000>.
- Almlöf, T., A. P. Wright, et J. A. Gustafsson. 1995. « Role of Acidic and Phosphorylated Residues in Gene Activation by the Glucocorticoid Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (29): 17535-40.
- Andela, C. D., F. M. van Haalen, O. Ragnarsson, E. Papakokkinou, G Johannsson, A Santos, S. M. Webb, N. R. Biermasz, N. J. A. van der Wee, et A. M. Pereira. 2015. « MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Cushing's Syndrome Causes Irreversible Effects on the Human Brain: A Systematic Review of Structural and Functional Magnetic Resonance Imaging Studies ». *European Journal of Endocrinology* 173 (1): R1-14. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-1101>.
- Arriza, J. L., C. Weinberger, G. Cerelli, T. M. Glaser, B. L. Handelin, D. E. Housman, et R. M. Evans. 1987. « Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary DNA: Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 237 (4812): 268-75.
- Artemenko, I. P., D. Zhao, D. B. Hales, K. H. Hales, et C. R. Jefcoate. 2001. « Mitochondrial Processing of Newly Synthesized Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR), but Not Total StAR, Mediates Cholesterol Transfer to Cytochrome P450 Side Chain

- Cleavage Enzyme in Adrenal Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (49): 46583-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107815200>.
- Asser, L, S Hescot, S Viengchareun, B Delemer, S Trabado, et M Lombès. 2014. « Autocrine Positive Regulatory Feedback of Glucocorticoid Secretion: Glucocorticoid Receptor Directly Impacts H295R Human Adrenocortical Cell Function ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 395 (1-2): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.012>.
- Assié, G, R Libé, S Espiard, M Rizk-Rabin, A Guimier, W Luscap, O Barreau, et al. 2013. « ARMC5 Mutations in Macronodular Adrenal Hyperplasia with Cushing's Syndrome ». *The New England Journal of Medicine* 369 (22): 2105-14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304603>.
- Atanasov, A. G., L. G. Nashev, R. A. S. Schweizer, C Frick, et A Odermatt. 2004. « Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase Determines the Reaction Direction of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 as an Oxoreductase ». *FEBS Letters* 571 (1-3): 129-33. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.065>.
- Ayrolidi, E, L Cannarile, G Migliorati, G Nocentini, D. V. Delfino, et C Riccardi. 2012. « Mechanisms of the Anti-Inflammatory Effects of Glucocorticoids: Genomic and Nongenomic Interference with MAPK Signaling Pathways ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (12): 4805-20. <https://doi.org/10.1096/fj.12-216382>.
- Ayrout, M, V Simon, V Bernard, N Binart, J Cohen-Tannoudji, M Lombès, et S Chauvin. 2017. « A Novel Non Genomic Glucocorticoid Signaling Mediated by a Membrane Palmitoylated Glucocorticoid Receptor Cross Talks with GnRH in Gonadotrope Cells ». *Scientific Reports* 7 (1): 1537. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01777-2>.
- Bali, U, T Phillips, H Hunt, et J Unitt. 2016. « FKBP5 mRNA Expression Is a Biomarker for GR Antagonism ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101 (11): 4305-12. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-1624>.
- Bamberger, C. M., A. M. Bamberger, M. de Castro, et G. P. Chrousos. 1995. « Glucocorticoid Receptor Beta, a Potential Endogenous Inhibitor of Glucocorticoid Action in Humans ». *The Journal of Clinical Investigation* 95 (6): 2435-41. <https://doi.org/10.1172/JCI117943>.
- Banuelos, J, S Cheon Shin, et N. Z. Lu. 2015. « A Hotspot in the Glucocorticoid Receptor DNA-Binding Domain Susceptible to Loss of Function Mutation ». *Steroids* 96 (avril): 115-20. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.01.022>.
- Barrangou, R, C Fremaux, H Deveau, M Richards, P Boyaval, S Moineau, D. A. Romero, et P Horvath. 2007. « CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in

- Prokaryotes ». *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819): 1709-12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Bartholome, B, C. M. Spies, T Gaber, S Schuchmann, T Berki, D Kunkel, M Bienert, et al. 2004. « Membrane Glucocorticoid Receptors (MGCR) Are Expressed in Normal Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and up-Regulated after in Vitro Stimulation and in Patients with Rheumatoid Arthritis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (1): 70-80. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0328com>.
- Beek, J. P. van, H Guan, L Julan, et K Yang. 2004. « Glucocorticoids Stimulate the Expression of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Cultured Human Placental Trophoblast Cells ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (11): 5614-21. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0113>.
- Belikov, S, C Astrand, et O Wrangé. 2009. « FoxA1 Binding Directs Chromatin Structure and the Functional Response of a Glucocorticoid Receptor-Regulated Promoter ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (20): 5413-25. <https://doi.org/10.1128/MCB.00368-09>.
- Bertagna, X. 2017. « Effects of Chronic ACTH Excess on Human Adrenal Cortex ». *Frontiers in Endocrinology* 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00043>.
- Black, B. E., J. M. Holaska, F. Rastinejad, et B. M. Paschal. 2001. « DNA Binding Domains in Diverse Nuclear Receptors Function as Nuclear Export Signals ». *Current Biology: CB* 11 (22): 1749-58.
- Bledsoe, R. K., V. G. Montana, T. B. Stanley, C. J. Delves, C. J. Apolito, D. D. McKee, T. G. Consler, et al. 2002. « Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition ». *Cell* 110 (1): 93-105.
- Bottema, C. D., et S. S. Sommer. 1993. « PCR Amplification of Specific Alleles: Rapid Detection of Known Mutations and Polymorphisms ». *Mutation Research* 288 (1): 93-102.
- Bouligand, J, B Delemer, A-C Hecart, G Meduri, S Viengchareun, L Amazit, S Trabado, et al. 2010. « Familial Glucocorticoid Receptor Haploinsufficiency by Non-Sense Mediated mRNA Decay, Adrenal Hyperplasia and Apparent Mineralocorticoid Excess ». *PLoS One* 5 (10): e13563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013563>.
- Bourdeau, I, N El Ghorayeb, N Gagnon, et A Lacroix. 2018. « MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Differential Diagnosis, Investigation and Therapy of Bilateral Adrenal Incidentalomas ». *European Journal of Endocrinology* 179 (2): R57-67. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0296>.

- Bourdeau, I, A Lacroix, W Schürch, P Caron, T Antakly, et C. A. Stratakis. 2003. « Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease: Paradoxical Responses of Cortisol Secretion to Dexamethasone Occur in Vitro and Are Associated with Increased Expression of the Glucocorticoid Receptor ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (8): 3931-37. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-022001>.
- Boyle, B., K. Korányi, A. Patocs, I. Liko, A. Szappanos, R. Bertalan, K. Racz, et C. Balazs. 2008. « Polymorphisms of the Glucocorticoid Receptor Gene in Graves Ophthalmopathy ». *The British Journal of Ophthalmology* 92 (1): 131-34. <https://doi.org/10.1136/bjo.2007.126789>.
- Boyle, C. D., et T. J. Kowalski. 2009. « 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors: A Review of Recent Patents ». *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19 (6): 801-25. <https://doi.org/10.1517/13543770902967658>.
- Breslin, M. B., C. D. Geng, et W. V. Vedeckis. 2001. « Multiple Promoters Exist in the Human GR Gene, One of Which Is Activated by Glucocorticoids ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 15 (8): 1381-95. <https://doi.org/10.1210/mend.15.8.0696>.
- Brinkman, E. K., T Chen, M Amendola, et B van Steensel. 2014. « Easy Quantitative Assessment of Genome Editing by Sequence Trace Decomposition ». *Nucleic Acids Research* 42 (22): e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>.
- Brown, R. W., K. E. Chapman, Y. Kotelevtsev, J. L. Yau, R. S. Lindsay, L. Brett, C. Leckie, et al. 1996. « Cloning and Production of Antisera to Human Placental 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 ». *The Biochemical Journal* 313 (Pt 3) (février): 1007-17.
- Buchser, W, M Collins, T Garyantes, R Guha, S Haney, V Lemmon, Z Li, et O. Joseph Trask. 2004. « Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging ». In *Assay Guidance Manual*, édité par G. Sitta Sittampalam, Nathan P. Coussens, Kyle Brimacombe, Abigail Grossman, Michelle Arkin, Douglas Auld, Chris Austin, et al. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100913/>.
- Burton, P. J., et B. J. Waddell. 1999. « Dual Function of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Placenta: Modulating Placental Glucocorticoid Passage and Local Steroid Action ». *Biology of Reproduction* 60 (2): 234-40. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.2.234>.
- Busada, J. T., et J. A. Cidlowski. 2017. « Mechanisms of Glucocorticoid Action During Development ». *Current Topics in Developmental Biology* 125: 147-70. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.004>.

- Cain, D. W., et J. A. Cidlowski. 2017. « Immune Regulation by Glucocorticoids ». *Nature Reviews. Immunology* 17 (4): 233-47. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.1>.
- Caprio, M, A Antelmi, G Chetrite, A Muscat, C Mammi, V Marzolla, A Fabbri, M-C Zennaro, et B Fève. 2011. « Antiadipogenic Effects of the Mineralocorticoid Receptor Antagonist Drosiprenone: Potential Implications for the Treatment of Metabolic Syndrome ». *Endocrinology* 152 (1): 113-25. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0674>.
- Caprio, M, B Fève, A Claës, S Viengchareun, M Lombès, et M-C Zennaro. 2007. « Pivotal Role of the Mineralocorticoid Receptor in Corticosteroid-Induced Adipogenesis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (9): 2185-94. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7970com>.
- Carruthers, C. W., J Ho Suh, J-A Gustafsson, et P Webb. 2015. « Phosphorylation of Glucocorticoid Receptor Tau1c Transactivation Domain Enhances Binding to CREB Binding Protein (CBP) TAZ2 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (1): 119-23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.021>.
- Carvajal, C A., A Tapia-Castillo, C. P. Valdivia, F Allende, S Solari, C. F. Lagos, C Campino, et al. 2018. « Serum Cortisol and Cortisone as Potential Biomarkers of Partial 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Deficiency ». *American Journal of Hypertension* 31 (8): 910-18. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpy051>.
- Cavalcante, I. P., M Nishi, M. C. N. Zerbini, M. Q. Almeida, V. B. Brondani, M. Luiza Anhaia de Arruda Botelho, F. Y. Tanno, et al. 2017. « The Role of ARMC5 in Human Cell Cultures from Nodules of Primary Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (PMAH) ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, juillet. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.027>.
- Chang, C. P., R. V. Pearse, S. O'Connell, et M. G. Rosenfeld. 1993. « Identification of a Seven Transmembrane Helix Receptor for Corticotropin-Releasing Factor and Sauvagine in Mammalian Brain ». *Neuron* 11 (6): 1187-95.
- Chapman, K. E., A. E. Coutinho, Z Zhang, T Kipari, J. S. Savill, et J. R. Seckl. 2013. « Changing Glucocorticoid Action: 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Acute and Chronic Inflammation ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 137 (septembre): 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.02.002>.
- Chapman, K, M Holmes, et J Seckl. 2013. « 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action ». *Physiological Reviews* 93 (3): 1139-1206. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2012>.
- Charmandari, E. 2012. « Primary Generalized Glucocorticoid Resistance and Hypersensitivity: The End-Organ Involvement in the Stress Response ». *Science Signaling* 5 (244): pt5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003337>.

- Charmandari, E, G. P. Chrousos, T Ichijo, N Bhattacharyya, A Vottero, E Souvatzoglou, et T Kino. 2005. « The Human Glucocorticoid Receptor (HGR) Beta Isoform Suppresses the Transcriptional Activity of HGRalpha by Interfering with Formation of Active Coactivator Complexes ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (1): 52-64. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0112>.
- Charmandari, E, T Ichijo, W Jubiz, S Baid, K Zachman, G. P. Chrousos, et T Kino. 2008. « A Novel Point Mutation in the Amino Terminal Domain of the Human Glucocorticoid Receptor (HGR) Gene Enhancing HGR-Mediated Gene Expression ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (12): 4963-68. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0892>.
- Charmandari, E, T Kino, T Ichijo, W Jubiz, L Mejia, Keith Zachman, et George P. Chrousos. 2007. « A Novel Point Mutation in Helix 11 of the Ligand-Binding Domain of the Human Glucocorticoid Receptor Gene Causing Generalized Glucocorticoid Resistance ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (10): 3986-90. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2830>.
- Charmandari, E, T Kino, T Ichijo, K Zachman, A Alatsatianos, et G. P. Chrousos. 2006. « Functional Characterization of the Natural Human Glucocorticoid Receptor (HGR) Mutants HGRalphaR477H and HGRalphaG679S Associated with Generalized Glucocorticoid Resistance ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (4): 1535-43. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1893>.
- Charmandari, E, T Kino, E Souvatzoglou, A Vottero, N Bhattacharyya, et G. P. Chrousos. 2004. « Natural Glucocorticoid Receptor Mutants Causing Generalized Glucocorticoid Resistance: Molecular Genotype, Genetic Transmission, and Clinical Phenotype ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (4): 1939-49. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030450>.
- Charmandari, E, N. C. Nicolaidis, et G. P. Chrousos. 2014. « Adrenal Insufficiency ». *Lancet (London, England)* 383 (9935): 2152-67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61684-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61684-0).
- Charmandari, E, A Raji, T Kino, T Ichijo, A Tiulpakov, K Zachman, et G. P. Chrousos. 2005. « A Novel Point Mutation in the Ligand-Binding Domain (LBD) of the Human Glucocorticoid Receptor (HGR) Causing Generalized Glucocorticoid Resistance: The Importance of the C Terminus of HGR LBD in Conferring Transactivational Activity ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (6): 3696-3705. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1920>.

- Chen, J. D., et R. M. Evans. 1995. « A Transcriptional Co-Repressor That Interacts with Nuclear Hormone Receptors ». *Nature* 377 (6548): 454-57. <https://doi.org/10.1038/377454a0>.
- Chen, W, T Dang, R D. Blind, Z Wang, C. N. Cavasotto, A. B. Hittelman, I Rogatsky, S. K. Logan, et M. J. Garabedian. 2008. « Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Differentially Affects Target Gene Expression ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 22 (8): 1754-66. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0219>.
- Cheung, J., et D. F. Smith. 2000. « Molecular Chaperone Interactions with Steroid Receptors: An Update ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 14 (7): 939-46. <https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0489>.
- Chiodini, I, A Gaudio, C Eller-Vainicher, V Morelli, C Aresta, V. V. Zhukouskaya, D Merlotti, et al. 2019. « Cortisol Secretion, Sensitivity, and Activity Are Associated with Hypertension in Postmenopausal Eucortisolemic Women ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, mai. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00037>.
- Cho, S. W, S Kim, J Min Kim, et J-S Kim. 2013. « Targeted Genome Engineering in Human Cells with the Cas9 RNA-Guided Endonuclease ». *Nature Biotechnology* 31 (3): 230-32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>.
- Chrousos, G. P., A. Vingerhoeds, D. Brandon, C. Eil, M. Pugeat, M. DeVroede, D. L. Loriaux, et M. B. Lipsett. 1982. « Primary Cortisol Resistance in Man. A Glucocorticoid Receptor-Mediated Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 69 (6): 1261-69.
- Cinti, S. 2012. « The Adipose Organ at a Glance ». *Disease Models & Mechanisms* 5 (5): 588-94. <https://doi.org/10.1242/dmm.009662>.
- Cluning, C, B. K. Ward, S. L. Rea, A Arulpragasam, P. J. Fuller, et T Ratajczak. 2013. « The Helix 1-3 Loop in the Glucocorticoid Receptor LBD Is a Regulatory Element for FKBP Cochaperones ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 27 (7): 1020-35. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1023>.
- Cole, T. J., J. A. Blendy, A. P. Monaghan, K. Krieglstein, W. Schmid, A. Aguzzi, G. Fantuzzi, E. Hummler, K. Unsicker, et G. Schütz. 1995. « Targeted Disruption of the Glucocorticoid Receptor Gene Blocks Adrenergic Chromaffin Cell Development and Severely Retards Lung Maturation ». *Genes & Development* 9 (13): 1608-21.
- Cong, L, F. Ann Ran, D Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habib, Patrick D. Hsu, et al. 2013. « Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 819-23. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- Constantinopoulos, P, M Michalaki, A Kottorou, I Habeos, A Psyrogiannis, F Kalfarentzos, et V Kyriazopoulou. 2015. « Cortisol in Tissue and Systemic Level as a Contributing Factor to the Development of Metabolic Syndrome in Severely Obese Patients ».

- European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 172 (1): 69-78. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0626>.
- Cooper, M. S., E. H. Rabbitt, P. E. Goddard, W. A. Bartlett, M. Hewison, et P. M. Stewart. 2002. « Osteoblastic 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Activity Increases with Age and Glucocorticoid Exposure ». *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17 (6): 979-86. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.6.979>.
- Dahlman-Wright, K., H. Baumann, I. J. McEwan, T. Almlöf, A. P. Wright, J. A. Gustafsson, et T. Härd. 1995. « Structural Characterization of a Minimal Functional Transactivation Domain from the Human Glucocorticoid Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (5): 1699-1703.
- Dahlman-Wright, K., A. Wright, J. A. Gustafsson, et J. Carlstedt-Duke. 1991. « Interaction of the Glucocorticoid Receptor DNA-Binding Domain with DNA as a Dimer Is Mediated by a Short Segment of Five Amino Acids ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (5): 3107-12.
- Dalle, H., M Garcia, B Antoine, V Boehm, T. T Huong Do, M Buyse, T Ledent, et al. 2019. « Adipocyte Glucocorticoid Receptor Deficiency Promotes Adipose Tissue Expandability and Improves the Metabolic Profile Under Corticosterone Exposure ». *Diabetes* 68 (2): 305-17. <https://doi.org/10.2337/db17-1577>.
- Damjanovic, S. S., J A. Antic, B. B. Ilic, B Beleslin Cokic, M Ivovic, S. I. Ognjanovic, T. V. Isailovic, et al. 2012. « Glucocorticoid Receptor and Molecular Chaperones in the Pathogenesis of Adrenal Incidentalomas: Potential Role of Reduced Sensitivity to Glucocorticoids ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 18: 1456-65. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00261>.
- Danielsen, M., L. Hinck, et G. M. Ringold. 1989. « Two Amino Acids within the Knuckle of the First Zinc Finger Specify DNA Response Element Activation by the Glucocorticoid Receptor ». *Cell* 57 (7): 1131-38.
- Darimont, B. D., R. L. Wagner, J. W. Apriletti, M. R. Stallcup, P. J. Kushner, J. D. Baxter, R. J. Fletterick, et K. R. Yamamoto. 1998. « Structure and Specificity of Nuclear Receptor-Coactivator Interactions ». *Genes & Development* 12 (21): 3343-56.
- Dave-Sharma, S., R. C. Wilson, M. D. Harbison, R. Newfield, M. R. Azar, Z. S. Krozowski, J. W. Funder, et al. 1998. « Examination of Genotype and Phenotype Relationships in 14 Patients with Apparent Mineralocorticoid Excess ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (7): 2244-54. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.7.4986>.

- De Bosscher, K., W. Vanden Berghe, L. Vermeulen, S. Plaisance, E. Boone, et G. Haegeman. 2000. « Glucocorticoids Repress NF-KappaB-Driven Genes by Disturbing the Interaction of P65 with the Basal Transcription Machinery, Irrespective of Coactivator Levels in the Cell ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (8): 3919-24.
- Debono, M, A Prema, T J. B. Hughes, M Bull, R J. Ross, et J Newell-Price. 2013. « Visceral Fat Accumulation and Postdexamethasone Serum Cortisol Levels in Patients with Adrenal Incidentaloma ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (6): 2383-91. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-4276>.
- Deng, Q, D Riquelme, L Trinh, M. J. Low, M Tomić, S Stojilkovic, et G Aguilera. 2015. « Rapid Glucocorticoid Feedback Inhibition of ACTH Secretion Involves Ligand-Dependent Membrane Association of Glucocorticoid Receptors ». *Endocrinology* 156 (9): 3215-27. <https://doi.org/10.1210/EN.2015-1265>.
- Deng, Q, B Waxse, D Riquelme, J Zhang, et G Aguilera. 2015. « Helix 8 of the Ligand Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor (GR) Is Essential for Ligand Binding ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 408 (juin): 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.044>.
- Dijk, E. L. van, Y Jaszczyszyn, D Naquin, et C Thermes. 2018. « The Third Revolution in Sequencing Technology ». *Trends in Genetics: TIG* 34 (9): 666-81. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>.
- Donner, K. M., T. P. Hiltunen, O. A. Jänne, T Sane, et K Kontula. 2013. « Generalized Glucocorticoid Resistance Caused by a Novel Two-Nucleotide Deletion in the Hormone-Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor Gene NR3C1 ». *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 168 (1): K9-18. <https://doi.org/10.1530/EJE-12-0532>.
- Duma, D, C. M. Jewell, et J. A. Cidlowski. 2006. « Multiple Glucocorticoid Receptor Isoforms and Mechanisms of Post-Translational Modification ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102 (1-5): 11-21. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.09.009>.
- Edwards, C. R., P. M. Stewart, D. Burt, L. Brett, M. A. McIntyre, W. S. Sutanto, E. R. de Kloet, et C. Monder. 1988. « Localisation of 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase--Tissue Specific Protector of the Mineralocorticoid Receptor ». *Lancet (London, England)* 2 (8618): 986-89.
- Emadali, A, N Hoghoughi, S Duley, A Hajmirza, E Verhoeyen, F-L Cosset, P Bertrand, et al. 2016. « Haploinsufficiency for NR3C1, the Gene Encoding the Glucocorticoid

- Receptor, in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms ». *Blood* 127 (24): 3040-53. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-671040>.
- Emms, H, I Tsirou, T Cranston, S Tsagarakis, et Ashley B. Grossman. 2016. « Do Patients with Incidentally Discovered Bilateral Adrenal Nodules Represent an Early Form of ARMC5-Mediated Bilateral Macronodular Hyperplasia? » *Endocrine* 53 (3): 801-8. <https://doi.org/10.1007/s12020-016-0988-4>.
- Fassnacht, M, W Arlt, I Bancos, H Dralle, J Newell-Price, A Sahdev, A Tabarin, M Terzolo, S Tsagarakis, et O. M. Dekkers. 2016. « Management of Adrenal Incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in Collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors ». *European Journal of Endocrinology* 175 (2): G1-34. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0467>.
- Feng, W., R. C. Ribeiro, R. L. Wagner, H. Nguyen, J. W. Apriletti, R. J. Fletterick, J. D. Baxter, P. J. Kushner, et B. L. West. 1998. « Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors ». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5370): 1747-49.
- Findling, J. W., et H Raff. 2017. « DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: Differentiation of Pathologic/Neoplastic Hypercortisolism (Cushing's Syndrome) from Physiologic/Non-Neoplastic Hypercortisolism (Formerly Known as Pseudo-Cushing's Syndrome) ». *European Journal of Endocrinology* 176 (5): R205-16. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0946>.
- Foussier, L, G Vitellius, J Bouligand, L Amazit, C Bouvattier, J Young, S Trabado, et M Lombès. 2019. « Functional Characterization of Glucocorticoid Receptor Variants Is Required to Avoid Misinterpretation of NGS Data ». *Journal of the Endocrine Society* 3 (5): 865-81. <https://doi.org/10.1210/js.2019-00028>.
- Freeman, B. C., et K. R. Yamamoto. 2002. « Disassembly of Transcriptional Regulatory Complexes by Molecular Chaperones ». *Science (New York, N.Y.)* 296 (5576): 2232-35. <https://doi.org/10.1126/science.1073051>.
- Fu, Y, J. A. Foden, C Khayter, M. L. Maeder, D Reyon, J. K Joung, et J. D. Sander. 2013. « High-Frequency off-Target Mutagenesis Induced by CRISPR-Cas Nucleases in Human Cells ». *Nature Biotechnology* 31 (9): 822-26. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>.
- Funder, J. W., P. T. Pearce, R. Smith, et A. I. Smith. 1988. « Mineralocorticoid Action: Target Tissue Specificity Is Enzyme, Not Receptor, Mediated ». *Science (New York, N.Y.)* 242 (4878): 583-85.
- Funder, J W. 2016. « Apparent Mineralocorticoid Excess ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, mars. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.010>.

- Gallagher-Beckley, A. J., et J. A. Cidlowski. 2009. « Emerging Roles of Glucocorticoid Receptor Phosphorylation in Modulating Glucocorticoid Hormone Action in Health and Disease ». *IUBMB Life* 61 (10): 979-86. <https://doi.org/10.1002/iub.245>.
- Gallagher-Beckley, A. Jo, J Grant Williams, et J. A Cidlowski. 2011. « Ligand-Independent Phosphorylation of the Glucocorticoid Receptor Integrates Cellular Stress Pathways with Nuclear Receptor Signaling ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (23): 4663-75. <https://doi.org/10.1128/MCB.05866-11>.
- Gathercole, L. L., G. G. Lavery, S. A. Morgan, M. S. Cooper, A. J. Sinclair, J. W. Tomlinson, et P. M. Stewart. 2013. « 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Translational and Therapeutic Aspects ». *Endocrine Reviews* 34 (4): 525-55. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1050>.
- Glantschnig, C, M Koenen, M Gil-Lozano, M Karbiener, I Pickrahn, J Williams-Dautovich, R Patel, et al. 2019. « A MiR-29a-Driven Negative Feedback Loop Regulates Peripheral Glucocorticoid Receptor Signaling ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (5): 5924-41. <https://doi.org/10.1096/fj.201801385RR>.
- Gomez, M. T., M. A. Magiakou, G. Mastorakos, et G. P. Chrousos. 1993. « The Pituitary Corticotroph Is Not the Rate Limiting Step in the Postoperative Recovery of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Patients with Cushing Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77 (1): 173-77. <https://doi.org/10.1210/jcem.77.1.8392083>.
- Goto, M, K Piper Hanley, J Marcos, P J. Wood, S Wright, A D. Postle, I T. Cameron, J. Ian Mason, D. I. Wilson, et N. A. Hanley. 2006. « In Humans, Early Cortisol Biosynthesis Provides a Mechanism to Safeguard Female Sexual Development ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (4): 953-60. <https://doi.org/10.1172/JCI25091>.
- Gouilleux, F., B. Sola, B. Couette, et H. Richard-Foy. 1991. « Cooperation between Structural Elements in Hormono-Regulated Transcription from the Mouse Mammary Tumor Virus Promoter ». *Nucleic Acids Research* 19 (7): 1563-69. <https://doi.org/10.1093/nar/19.7.1563>.
- Goulding, N J. 2004. « The Molecular Complexity of Glucocorticoid Actions in Inflammation - a Four-Ring Circus ». *Current Opinion in Pharmacology* 4 (6): 629-36. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.06.009>.
- Green, S., V. Kumar, I. Theulaz, W. Wahli, et P. Chambon. 1988. « The N-Terminal DNA-Binding "zinc Finger" of the Oestrogen and Glucocorticoid Receptors Determines Target Gene Specificity ». *The EMBO Journal* 7 (10): 3037-44.

- Greenberg, A. S., et M. S. Obin. 2006. « Obesity and the Role of Adipose Tissue in Inflammation and Metabolism ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 83 (2): 461S-465S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.461S>.
- Gregoire, F. M., C. M. Smas, et H. S. Sul. 1998. « Understanding Adipocyte Differentiation ». *Physiological Reviews* 78 (3): 783-809.
- Guillermin, Y, Jonathan L, K Chabane, S Hayette, C Bardel, G Salles, P Sujobert, et S Huet. 2018. « What Does This Mutation Mean? The Tools and Pitfalls of Variant Interpretation in Lymphoid Malignancies ». *International Journal of Molecular Sciences* 19 (4). <https://doi.org/10.3390/ijms19041251>.
- Gutiérrez-Mecinas, M, A. F. Trollope, A Collins, H Morfett, S. A. H, F Kersanté, et J. M. H. M. Reul. 2011. « Long-Lasting Behavioral Responses to Stress Involve a Direct Interaction of Glucocorticoid Receptors with ERK1/2-MSK1-Elk-1 Signaling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (33): 13806-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104383108>.
- Hardy, R. S., H Zhou, M. J. Seibel, et M. S. Cooper. 2018. « Glucocorticoids and Bone: Consequences of Endogenous and Exogenous Excess and Replacement Therapy ». *Endocrine Reviews* 39 (5): 519-48. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00097>.
- Harms, M, et P Seale. 2013. « Brown and Beige Fat: Development, Function and Therapeutic Potential ». *Nature Medicine* 19 (10): 1252-63. <https://doi.org/10.1038/nm.3361>.
- He, Y, W Yi, K Suino-Powell, X. E Zhou, W. D Tolbert, X Tang, J. Yang, et al. 2014. « Structures and Mechanism for the Design of Highly Potent Glucocorticoids ». *Cell Research* 24 (6): 713-26. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.52>.
- Henschkowski, J, A. E. Stuck, B. M. Frey, G Gillmann, B Dick, F. J. Frey, et M. G. Mohaupt. 2008. « Age-Dependent Decrease in 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 (11beta-HSD2) Activity in Hypertensive Patients ». *American Journal of Hypertension* 21 (6): 644-49. <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.152>.
- Hillmann, A. G., J. Ramdas, K. Multanen, M. R. Norman, et J. M. Harmon. 2000. « Glucocorticoid Receptor Gene Mutations in Leukemic Cells Acquired in Vitro and in Vivo ». *Cancer Research* 60 (7): 2056-62.
- Hollenberg, S. M., C. Weinberger, E. S. Ong, G. Cerelli, A. Oro, R. Lebo, E. B. Thompson, M. G. Rosenfeld, et R. M. Evans. 1985. « Primary Structure and Expression of a Functional Human Glucocorticoid Receptor cDNA ». *Nature* 318 (6047): 635-41.
- Holmstrom, S, M E. Van Antwerp, et J A. Iñiguez-Lluhi. 2003. « Direct and Distinguishable Inhibitory Roles for SUMO Isoforms in the Control of Transcriptional Synergy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (26): 15758-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.2136933100>.

- Hong, A. Ram, J. H Kim, K. S Park, K Young Kim, J H Lee, S H Kong, S Young Lee, C. S Shin, S Wan Kim, et S-Y Kim. 2017. « Optimal Follow-up Strategies for Adrenal Incidentalomas: Reappraisal of the 2016 ESE-ENSAT Guidelines in Real Clinical Practice ». *European Journal of Endocrinology*, septembre. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-0372>.
- Hu, X, S Du, C Tunca, T Braden, K R. Long, J Lee, E G. Webb, et al. 2011. « The Antagonists but Not Partial Agonists of Glucocorticoid Receptor Ligands Show Substantial Side Effect Dissociation ». *Endocrinology* 152 (8): 3123-34. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1447>.
- Hua, G, L Paulen, et P Chambon. 2016. « GR SUMOylation and Formation of an SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 Repressing Complex Is Mandatory for GC-Induced IR NGRE-Mediated Transrepression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (5): E626-634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522821113>.
- Hubler, T R., et J. G. Scammell. 2004. « Intronic Hormone Response Elements Mediate Regulation of FKBP5 by Progestins and Glucocorticoids ». *Cell Stress & Chaperones* 9 (3): 243-52. <https://doi.org/10.1379/csc-32r.1>.
- Hudson, W. H., C Youn, et E. A. Ortlund. 2013. « The Structural Basis of Direct Glucocorticoid-Mediated Transrepression ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (1): 53-58. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2456>.
- Hult, M., H. Jörnvall, et U. C. Oppermann. 1998. « Selective Inhibition of Human Type 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase by Synthetic Steroids and Xenobiotics ». *FEBS Letters* 441 (1): 25-28.
- Hurley, D. M., D. Accili, C. A. Stratakis, M. Karl, N. Vamvakopoulos, E. Rorer, K. Constantine, S. I. Taylor, et G. P. Chrousos. 1991. « Point Mutation Causing a Single Amino Acid Substitution in the Hormone Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor in Familial Glucocorticoid Resistance ». *The Journal of Clinical Investigation* 87 (2): 680-86. <https://doi.org/10.1172/JCI115046>.
- Iida, S., Y. Nakamura, H. Fujii, J. Nishimura, M. Tsugawa, M. Gomi, J. Fukata, S. Tarui, K. Moriwaki, et T. Kitani. 1990. « A Patient with Hypocortisolism and Cushing's Syndrome-like Manifestations: Cortisol Hyperreactive Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 70 (3): 729-37. <https://doi.org/10.1210/jcem-70-3-729>.
- Ishimoto, H, et R. B. Jaffe. 2011. « Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit ». *Endocrine Reviews* 32 (3): 317-55. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0001>.

- Ismaili, N, et M. J. Garabedian. 2004. « Modulation of Glucocorticoid Receptor Function via Phosphorylation ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1024 (juin): 86-101. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.007>.
- Ito, K, S Yamamura, S Essilfie-Quaye, B Cosio, M Ito, P J. Barnes, et I M. Adcock. 2006. « Histone Deacetylase 2-Mediated Deacetylation of the Glucocorticoid Receptor Enables NF-KappaB Suppression ». *The Journal of Experimental Medicine* 203 (1): 7-13. <https://doi.org/10.1084/jem.20050466>.
- Jinek, M, K Chylinski, I Fonfara, M Hauer, J A. Doudna, et E Charpentier. 2012. « A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity ». *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096): 816-21. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Jo, J, O Gavrillova, S Pack, W Jou, S Mullen, A. E. Sumner, S. W. Cushman, et V Periwal. 2009. « Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth ». *PLoS Computational Biology* 5 (3): e1000324. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000324>.
- John, S, P. J. Sabo, R. E. Thurman, M-H Sung, S. C. Biddie, T. A. Johnson, G. L. Hager, et J. A. Stamatoyannopoulos. 2011. « Chromatin Accessibility Pre-Determines Glucocorticoid Receptor Binding Patterns ». *Nature Genetics* 43 (3): 264-68. <https://doi.org/10.1038/ng.759>.
- Kadmiel, M, et J. A. Cidlowski. 2013. « Glucocorticoid Receptor Signaling in Health and Disease ». *Trends in Pharmacological Sciences* 34 (9): 518-30. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.07.003>.
- Karbassi, I, G A. Maston, A Love, C DiVincenzo, C. D. Braastad, C. D. Elzinga, A. R. Bright, et al. 2016. « A Standardized DNA Variant Scoring System for Pathogenicity Assessments in Mendelian Disorders ». *Human Mutation* 37 (1): 127-34. <https://doi.org/10.1002/humu.22918>.
- Karbiener, M, C Fischer, S Nowitsch, P Opriessnig, C Papak, G Ailhaud, C Dani, E-Z Amri, et M Scheideler. 2009. « MicroRNA MiR-27b Impairs Human Adipocyte Differentiation and Targets PPARgamma ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 (2): 247-51. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.098>.
- Karin, M. 1998. « New Twists in Gene Regulation by Glucocorticoid Receptor: Is DNA Binding Dispensable? » *Cell* 93 (4): 487-90.
- Karl, M., S. W. Lamberts, S. D. Detera-Wadleigh, I. J. Encio, C. A. Stratakis, D. M. Hurley, D. Accili, et G. P. Chrousos. 1993. « Familial Glucocorticoid Resistance Caused by a Splice Site Deletion in the Human Glucocorticoid Receptor Gene ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 76 (3): 683-89. <https://doi.org/10.1210/jcem.76.3.8445027>.

- Karl, M., S. W. Lamberts, J. W. Koper, D. A. Katz, N. E. Huizenga, T. Kino, B. R. Haddad, M. R. Hughes, et G. P. Chrousos. 1996. « Cushing's Disease Preceded by Generalized Glucocorticoid Resistance: Clinical Consequences of a Novel, Dominant-Negative Glucocorticoid Receptor Mutation ». *Proceedings of the Association of American Physicians* 108 (4): 296-307.
- Kassel, O, et P Herrlich. 2007. « Crosstalk between the Glucocorticoid Receptor and Other Transcription Factors: Molecular Aspects ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 275 (1-2): 13-29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.07.003>.
- Kaul, S, P. J. M. Murphy, J Chen, L Brown, W. B. Pratt, et S. S Simons. 2002. « Mutations at Positions 547-553 of Rat Glucocorticoid Receptors Reveal That Hsp90 Binding Requires the Presence, but Not Defined Composition, of a Seven-Amino Acid Sequence at the Amino Terminus of the Ligand Binding Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (39): 36223-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206748200>.
- Kenouch, S., M. Lombes, F. Delahaye, E. Eugene, J. P. Bonvalet, et N. Farman. 1994. « Human Skin as Target for Aldosterone: Coexpression of Mineralocorticoid Receptors and 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79 (5): 1334-41. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.5.7962326>.
- Khan, S. H., S Awasthi, C Guo, D Goswami, J Ling, P. R. Griffin, S. S Simons, et R Kumar. 2012. « Binding of the N-Terminal Region of Coactivator TIF2 to the Intrinsically Disordered AF1 Domain of the Glucocorticoid Receptor Is Accompanied by Conformational Reorganizations ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (53): 44546-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411330>.
- Kimura, S., R. V. Lewis, L. D. Gerber, L. Brink, M. Rubinstein, S. Stein, et S. Udenfriend. 1979. « Purification to Homogeneity of Camel Pituitary Pro-Opiocortin, the Common Precursor of Opioid Peptides and Corticotropin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (4): 1756-59.
- Kino, T, M. U. De Martino, E Charmandari, M Mirani, et G. P. Chrousos. 2003. « Tissue Glucocorticoid Resistance/Hypersensitivity Syndromes ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85 (2-5): 457-67.
- Kinyamu, H. K., J. Chen, et T. K. Archer. 2005. « Linking the Ubiquitin-Proteasome Pathway to Chromatin Remodeling/Modification by Nuclear Receptors ». *Journal of Molecular Endocrinology* 34 (2): 281-97. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01680>.
- Klionsky, D. J., et S. D. Emr. 2000. « Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation ». *Science (New York, N.Y.)* 290 (5497): 1717-21.
- Kloet, A. D. de, E. G. Krause, M. B. Solomon, J. N. Flak, K. A. Scott, D-H Kim, B Myers, et al. 2015. « Adipocyte Glucocorticoid Receptors Mediate Fat-to-Brain Signaling ».

<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.008>.

- Kloet, E. R. de, M. Joëls, et F. Holsboer. 2005. « Stress and the Brain: From Adaptation to Disease ». *Nature Reviews. Neuroscience* 6 (6): 463-75. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>.
- Koper, J. W., E. F. C. van Rossum, et E. L. T. van den Akker. 2014. « Glucocorticoid Receptor Polymorphisms and Haplotypes and Their Expression in Health and Disease ». *Steroids* 92 (décembre): 62-73. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.07.015>.
- Kotelevtsev, Y., M. C. Holmes, A. Burchell, P. M. Houston, D. Schmoll, P. Jamieson, R. Best, et al. 1997. « 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Knockout Mice Show Attenuated Glucocorticoid-Inducible Responses and Resist Hyperglycemia on Obesity or Stress ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (26): 14924-29.
- Kuhn, E, C Bourgeois, V Keo, S Viengchareun, A Muscat, G Meduri, D Le Menuet, B Fève, et M Lombès. 2014. « Paradoxical Resistance to High-Fat Diet-Induced Obesity and Altered Macrophage Polarization in Mineralocorticoid Receptor-Overexpressing Mice ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 306 (1): E75-90. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00323.2013>.
- Kumar, R., et E. B. Thompson. 2010. « Influence of Flanking Sequences on Signaling between the Activation Function AF1 and DNA-Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 496 (2): 140-45. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.02.010>.
- Kumar, R, D. E. Volk, J Li, J. C. Lee, D. G. Gorenstein, et E. B Thompson. 2004. « TATA Box Binding Protein Induces Structure in the Recombinant Glucocorticoid Receptor AF1 Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (47): 16425-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407160101>.
- Kunz, S, R Sandoval, P Carlsson, J Carlstedt-Duke, J W. Bloom, et R. L. Miesfeld. 2003. « Identification of a Novel Glucocorticoid Receptor Mutation in Budesonide-Resistant Human Bronchial Epithelial Cells ». *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 17 (12): 2566-82. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0164>.
- Kuo, T, A McQueen, T-C Chen, et J-C Wang. 2015. « Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 872: 99-126. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2895-8_5.
- Lavery, G G., A. E. Zielinska, L. L. Gathercole, B Hughes, N Semjonous, P Guest, K Saqib, et al. 2012. « Lack of Significant Metabolic Abnormalities in Mice with Liver-Specific

- Disruption of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 ». *Endocrinology* 153 (7): 3236-48. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1019>.
- Le Billan, F, L Amazit, K Bleakley, Q-Y Xue, E Pussard, C Lhadj, P Kolkhof, S Viengchareun, J Fagart, et M Lombès. 2018. « Corticosteroid Receptors Adopt Distinct Cyclical Transcriptional Signatures ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (10): 5626-39. <https://doi.org/10.1096/fj.201800391RR>.
- Le Billan, F, J. A. Khan, K Lamribet, S Viengchareun, J Bouligand, J Fagart, et M Lombès. 2015. « Cistrome of the Aldosterone-Activated Mineralocorticoid Receptor in Human Renal Cells ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (9): 3977-89. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274266>.
- Le Drean, Y, N Mincheneau, P Le Goff, et D Michel. 2002. « Potentiation of Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activity by Sumoylation ». *Endocrinology* 143 (9): 3482-89. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220135>.
- Le Menuet, D., M. C. Zennaro, S. Viengchareun, et M. Lombès. 2000. « Transgenic Mouse Models to Study Human Mineralocorticoid Receptor Function in Vivo ». *Kidney International* 57 (4): 1299-1306. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00966.x>.
- Lee, M-J, D-W Gong, B. F. Burkey, et S K. Fried. 2011. « Pathways Regulated by Glucocorticoids in Omental and Subcutaneous Human Adipose Tissues: A Microarray Study ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 300 (3): E571-580. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00231.2010>.
- Lee, M.-J., et S. K. Fried. 2014. « The Glucocorticoid Receptor, Not the Mineralocorticoid Receptor, Plays the Dominant Role in Adipogenesis and Adipokine Production in Human Adipocytes ». *International Journal of Obesity (2005)* 38 (9): 1228-33. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.6>.
- Lefebvre, H., C. Duparc, D. Cartier, V. Contesse, V. Perraudin, J. Bertherat, P. F. Plouin, Y. Reznik, J. M. Kuhn, et E. Louiset. 2009. « Autocrine/Paracrine Regulations of Steroidogenesis in Adrenocortical Hyperplasias and Tumors ». *Annales D'endocrinologie* 70 (3): 192-93. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2009.02.015>.
- Lefebvre, H, C Duparc, N Chartrel, S Jegou, A Pellerin, A Laquerriere, R Ivell, H Vaudry, et J-M Kuhn. 2003. « Intraadrenal Adrenocorticotropin Production in a Case of Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia Causing Cushing's Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (7): 3035-42. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-030014>.

- Leventhal, S. M., D Lim, T L. Green, A E. Cantrell, K Cho, et D G. Greenhalgh. 2019. « Uncovering a Multitude of Human Glucocorticoid Receptor Variants: An Expansive Survey of a Single Gene ». *BMC Genetics* 20 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0718-z>.
- Lewis-Tuffin, L. J., et J. A. Cidlowski. 2006. « The Physiology of Human Glucocorticoid Receptor Beta (HGRbeta) and Glucocorticoid Resistance ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1069 (juin): 1-9. <https://doi.org/10.1196/annals.1351.001>.
- Libé, R, et J Bertherat. 2005. « Molecular Genetics of Adrenocortical Tumours, from Familial to Sporadic Diseases ». *European Journal of Endocrinology* 153 (4): 477-87. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02004>.
- Lightman, S. L., et B L. Conway-Campbell. 2010. « The Crucial Role of Pulsatile Activity of the HPA Axis for Continuous Dynamic Equilibration ». *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (10): 710-18. <https://doi.org/10.1038/nrn2914>.
- Liu, W, S Li, Y Zhang, J Li, et Y Li. 2018. « Efficient CRISPR-Based Genome Editing Using Tandem Guide RNAs and Editable Surrogate Reporters ». *FEBS Open Bio* 8 (7): 1167-75. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12437>.
- Lombès, M., N. Farman, M. E. Oblin, E. E. Baulieu, J. P. Bonvalet, B. F. Erlanger, et J. M. Gasc. 1990. « Immunohistochemical Localization of Renal Mineralocorticoid Receptor by Using an Anti-Idiotypic Antibody That Is an Internal Image of Aldosterone ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (3): 1086-88.
- Lonard, D. M., et B. W. O'malley. 2007. « Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation ». *Molecular Cell* 27 (5): 691-700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.012>.
- Louiset, E, C Duparc, J Young, S Renouf, M Tetsi Nomigni, I Boutelet, R Libé, et al. 2013. « Intraadrenal Corticotropin in Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia ». *The New England Journal of Medicine* 369 (22): 2115-25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215245>.
- Louiset, E, C A. Stratakis, V Perraudin, K. J. Griffin, R Libé, S Cabrol, B Fève, et al. 2009. « The Paradoxical Increase in Cortisol Secretion Induced by Dexamethasone in Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease Involves a Glucocorticoid Receptor-Mediated Effect of Dexamethasone on Protein Kinase A Catalytic Subunits ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (7): 2406-13. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0031>.

- Lu, N. Z., et J. A. Cidlowski. 2005. « Translational Regulatory Mechanisms Generate N-Terminal Glucocorticoid Receptor Isoforms with Unique Transcriptional Target Genes ». *Molecular Cell* 18 (3): 331-42. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.025>.
- Luisi, B. F., W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto, et P. B. Sigler. 1991. « Crystallographic Analysis of the Interaction of the Glucocorticoid Receptor with DNA ». *Nature* 352 (6335): 497-505. <https://doi.org/10.1038/352497a0>.
- Majnik, J, A Patocs, K Balogh, M Toth, P Gergics, A Szappanos, A Mondok, et al. 2006. « Overrepresentation of the N363S Variant of the Glucocorticoid Receptor Gene in Patients with Bilateral Adrenal Incidentalomas ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (7): 2796-99. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0066>.
- Makarova, K. S., D. H. Haft, R Barrangou, S. J. J. Brouns, E Charpentier, P Horvath, S Moineau, et al. 2011. « Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems ». *Nature Reviews. Microbiology* 9 (6): 467-77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
- Mali, P, L Yang, K. M. Esvelt, J Aach, M Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, et G. M. Church. 2013. « RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9 ». *Science* 339 (6121): 823-26. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- Mariniello, B, V Ronconi, C Sardu, A Pagliericcio, F Galletti, P Strazzullo, M Palermo, et al. 2005. « Analysis of the 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Gene (HSD11B2) in Human Essential Hypertension ». *American Journal of Hypertension* 18 (8): 1091-98. <https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2005.02.020>.
- Mason, S. A., et P. R. Housley. 1993. « Site-Directed Mutagenesis of the Phosphorylation Sites in the Mouse Glucocorticoid Receptor ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (29): 21501-4.
- McMahon, S. K., C. J. Pretorius, J. P. J. Ungerer, N. J. Salmon, L. S. Conwell, M. A. Pearen, et J. A. Batch. 2010. « Neonatal Complete Generalized Glucocorticoid Resistance and Growth Hormone Deficiency Caused by a Novel Homozygous Mutation in Helix 12 of the Ligand Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (1): 297-302. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1003>.
- Meijsing, S. H., M A. Pufall, A. Y. So, D. L. Bates, L Chen, et K. R. Yamamoto. 2009. « DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5925): 407-10. <https://doi.org/10.1126/science.1164265>.
- Mendonca, B. B., M. V. Leite, M de Castro, T Kino, L. L. K. Elias, T. A. S. Bachega, I. J. P. Arnhold, G. P. Chrousos, et A. C Latronico. 2002. « Female Pseudohermaphroditism Caused by a Novel Homozygous Missense Mutation of the GR Gene ». *The Journal of*

Clinical Endocrinology and Metabolism 87 (4): 1805-9.
<https://doi.org/10.1210/jcem.87.4.8379>.

- Miao, K, X Zhang, S Man Su, J Zeng, Z Huang, U I Chan, X Xu, et C-X Deng. 2019. « Optimizing CRISPR/Cas9 Technology for Precise Correction of the Fgfr3-G374R Mutation in Achondroplasia in Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (4): 1142-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006496>.
- Michailidou, Z., R. N. Carter, E. Marshall, H. G. Sutherland, D. G. Brownstein, E. Owen, K. Cockett, et al. 2008. « Glucocorticoid Receptor Haploinsufficiency Causes Hypertension and Attenuates Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Blood Pressure Adaptions to High-Fat Diet ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (11): 3896-3907. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111914>.
- Mifsud, K R., et J. M. H. M. Reul. 2016. « Acute Stress Enhances Heterodimerization and Binding of Corticosteroid Receptors at Glucocorticoid Target Genes in the Hippocampus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (40): 11336-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605246113>.
- Miller, W. L. 1988. « Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis ». *Endocrine Reviews* 9 (3): 295-318. <https://doi.org/10.1210/edrv-9-3-295>.
- Miller, W L. 2018. « MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Rare Defects in Adrenal Steroidogenesis ». *European Journal of Endocrinology* 179 (3): R125-41. <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0279>.
- Miranda, T. B., S. A. Morris, et G. L. Hager. 2013. « Complex Genomic Interactions in the Dynamic Regulation of Transcription by the Glucocorticoid Receptor ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 380 (1-2): 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.03.002>.
- Molnár, Á, A Patócs, I Likó, G Nyíró, K Rácz, M Tóth, et B Sárman. 2018. « An Unexpected, Mild Phenotype of Glucocorticoid Resistance Associated with Glucocorticoid Receptor Gene Mutation Case Report and Review of the Literature ». *BMC Medical Genetics* 19 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0552-6>.
- Morgan, S. A., E L. McCabe, L. L. Gathercole, Z. K. Hassan-Smith, D. P. Lerner, I. J. Bujalska, P. M. Stewart, J. W. Tomlinson, et G. G. Lavery. 2014. « 11 β -HSD1 Is the Major Regulator of the Tissue-Specific Effects of Circulating Glucocorticoid Excess ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (24): E2482-2491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323681111>.
- Morton, N. M., M. C. Holmes, C. Fiévet, B. Staels, A. Tailleux, J. J. Mullins, et J. R. Seckl. 2001. « Improved Lipid and Lipoprotein Profile, Hepatic Insulin Sensitivity, and Glucose

- Tolerance in 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Null Mice ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (44): 41293-300. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103676200>.
- Morton, N. M., J. M. Paterson, H Masuzaki, M. C. Holmes, B Staels, C Fievet, B. R. Walker, J S. Flier, J. J. Mullins, et J. R. Seckl. 2004. « Novel Adipose Tissue-Mediated Resistance to Diet-Induced Visceral Obesity in 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1-Deficient Mice ». *Diabetes* 53 (4): 931-38.
- Motlagh, H. N., J. A. Anderson, J Li, et V. J. Hilser. 2015. « Disordered Allostery: Lessons from Glucocorticoid Receptor ». *Biophysical Reviews* 7 (2): 257-65. <https://doi.org/10.1007/s12551-015-0173-7>.
- Mune, T., et P. C. White. 1996. « Apparent Mineralocorticoid Excess: Genotype Is Correlated with Biochemical Phenotype ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 27 (6): 1193-99.
- Nader, N, B. E. Bachrach, D. E. Hurt, S Gajula, A Pittman, R Lescher, et T Kino. 2010. « A Novel Point Mutation in Helix 10 of the Human Glucocorticoid Receptor Causes Generalized Glucocorticoid Resistance by Disrupting the Structure of the Ligand-Binding Domain ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (5): 2281-85. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-2463>.
- Nader, N, G. P. Chrousos, et T Kino. 2009. « Circadian Rhythm Transcription Factor CLOCK Regulates the Transcriptional Activity of the Glucocorticoid Receptor by Acetylating Its Hinge Region Lysine Cluster: Potential Physiological Implications ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (5): 1572-83. <https://doi.org/10.1096/fj.08-117697>.
- Nagy, L, et J. W. R. Schwabe. 2004. « Mechanism of the Nuclear Receptor Molecular Switch ». *Trends in Biochemical Sciences* 29 (6): 317-24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.04.006>.
- Nagy, Z, A Marta, H Butz, I Liko, K Racz, et A Patocs. 2016. « Modulation of the Circadian Clock by Glucocorticoid Receptor Isoforms in the H295R Cell Line ». *Steroids* 116 (décembre): 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.10.002>.
- Náray-Fejes-Tóth, A, G Fejes-Tóth, K A. Volk, et J. B. Stokes. 2000. « SGK is a primary glucocorticoid-induced gene in the human ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 75 (1): 51-56. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00136-9](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00136-9).
- Narlikar, G J., H-Y Fan, et R. E. Kingston. 2002. « Cooperation between Complexes That Regulate Chromatin Structure and Transcription ». *Cell* 108 (4): 475-87.
- New, M. I., L. S. Levine, E. G. Biglieri, J. Pareira, et S. Ulick. 1977. « Evidence for an Unidentified Steroid in a Child with Apparent Mineralocorticoid Hypertension ». *The*

- Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 44 (5): 924-33.
<https://doi.org/10.1210/jcem-44-5-924>.
- Newell-Price, J, X Bertagna, A B. Grossman, et L. K. Nieman. 2006. « Cushing's Syndrome ». *Lancet (London, England)* 367 (9522): 1605-17. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68699-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68699-6).
- Nicolaides, N. C., E. B. Geer, D Vlachakis, M. L. Roberts, A-M G. Psarra, P Moutsatsou, A Sertedaki, S Kossida, et E Charmandari. 2015. « A Novel Mutation of the HGR Gene Causing Chrousos Syndrome ». *European Journal of Clinical Investigation* 45 (8): 782-91. <https://doi.org/10.1111/eci.12470>.
- Nicolaides, N. C., T Kino, M. L. Roberts, E Katsantoni, A Sertedaki, P Moutsatsou, A-M. G. Psarra, G. P. Chrousos, et E Charmandari. 2017. « The Role of S-Palmitoylation of the Human Glucocorticoid Receptor (HGR) in Mediating the Nongenomic Glucocorticoid Actions ». *Journal of Molecular Biochemistry* 6 (1): 3-12.
- Nicolaides, N. C., A Lamprokostopoulou, A Polyzos, T Kino, E Katsantoni, P Triantafyllou, A Christophoridis, et al. 2015. « Transient Generalized Glucocorticoid Hypersensitivity ». *European Journal of Clinical Investigation* 45 (12): 1306-15. <https://doi.org/10.1111/eci.12554>.
- Nicolaides, N. C., M. L. Roberts, T Kino, G Braatvedt, D. E. Hurt, E Katsantoni, A Sertedaki, G. P. Chrousos, et E Charmandari. 2014. « A Novel Point Mutation of the Human Glucocorticoid Receptor Gene Causes Primary Generalized Glucocorticoid Resistance through Impaired Interaction with the LXXLL Motif of the P160 Coactivators: Dissociation of the Transactivating and Transrepressive Activities ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (5): E902-907. <https://doi.org/10.1210/jc.2013-3005>.
- Nicolaides, N. C., E Skyrla, D Vlachakis, A-M. G. Psarra, P Moutsatsou, A Sertedaki, S Kossida, et E Charmandari. 2016. « Functional Characterization of the HGR α T556I Causing Chrousos Syndrome ». *European Journal of Clinical Investigation* 46 (1): 42-49. <https://doi.org/10.1111/eci.12563>.
- Nieman, L. K., B. M. K. Biller, J. W. Findling, J Newell-Price, M. O. Savage, P. M. Stewart, et V. M. Montori. 2008. « The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (5): 1526-40. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0125>.
- Noensie, E. N., et H. C. Dietz. 2001. « A Strategy for Disease Gene Identification through Nonsense-Mediated mRNA Decay Inhibition ». *Nature Biotechnology* 19 (5): 434-39. <https://doi.org/10.1038/88099>.

- Nunez, B. S., F. M. Rogerson, T. Mune, Y. Igarashi, Y. Nakagawa, G. Phillipov, A. Moudgil, et al. 1999. « Mutants of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase (11-HSD2) with Partial Activity: Improved Correlations between Genotype and Biochemical Phenotype in Apparent Mineralocorticoid Excess ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 34 (4 Pt 1): 638-42.
- Oakley, A. E., K. M. Breen, I. J. Clarke, F. J. Karsch, Elizabeth R. Wagenmaker, et Alan J. Tilbrook. 2009. « Cortisol Reduces Gonadotropin-Releasing Hormone Pulse Frequency in Follicular Phase Ewes: Influence of Ovarian Steroids ». *Endocrinology* 150 (1): 341-49. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0587>.
- Oakley, R. H., C. M. Jewell, M. R. Yudt, D. M. Bofetiado, et J. A. Cidlowski. 1999. « The Dominant Negative Activity of the Human Glucocorticoid Receptor Beta Isoform. Specificity and Mechanisms of Action ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (39): 27857-66.
- Oakley, R. H., M. Sar, et J. A. Cidlowski. 1996. « The Human Glucocorticoid Receptor Beta Isoform. Expression, Biochemical Properties, and Putative Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9550-59.
- Oosten, M. J. M. van, R. J. E. M. Dolhain, J. W. Koper, E. F. C. van Rossum, M. Emonts, K. H. Han, J. M. G. W. Wouters, J. M. W. Hazes, S. W. J. Lamberts, et R. A. Feelders. 2010. « Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene That Modulate Glucocorticoid Sensitivity Are Associated with Rheumatoid Arthritis ». *Arthritis Research & Therapy* 12 (4): R159. <https://doi.org/10.1186/ar3118>.
- Palermo, M., C. H. Shackleton, F. Mantero, et P. M. Stewart. 1996. « Urinary Free Cortisone and the Assessment of 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Man ». *Clinical Endocrinology* 45 (5): 605-11.
- Parker, C. R., O. Faye-Petersen, A. K. Stankovic, J. I. Mason, et W. E. Grizzle. 1995. « Immunohistochemical Evaluation of the Cellular Localization and Ontogeny of 3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta 5-4 Isomerase in the Human Fetal Adrenal Gland ». *Endocrine Research* 21 (1-2): 69-80.
- Paschou, S. A., E. Kandarakis, F. Dimitropoulou, D. G. Goulis, et A. Vryonidou. 2016. « Subclinical Cushing's Syndrome in Patients with Bilateral Compared to Unilateral Adrenal Incidentalomas: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Endocrine* 51 (2): 225-35. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0776-6>.
- Paust, H.-J., S. Loeper, T. Else, A.-M. Bamberger, G. Papadopoulos, D. Pankoke, W. Saeger, et C. M. Bamberger. 2006. « Expression of the Glucocorticoid Receptor in the Human Adrenal Cortex ». *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal,*

- German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 114 (1): 6-10.
<https://doi.org/10.1055/s-2005-873007>.
- Pedram, A, M Razandi, R. C. A. Sainson, J K. Kim, C. C. Hughes, et E. R. Levin. 2007. « A Conserved Mechanism for Steroid Receptor Translocation to the Plasma Membrane ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (31): 22278-88.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M611877200>.
- Picard, D., et K. R. Yamamoto. 1987. « Two Signals Mediate Hormone-Dependent Nuclear Localization of the Glucocorticoid Receptor ». *The EMBO Journal* 6 (11): 3333-40.
- Pratt, W. B., et D. O. Toft. 1997. « Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones ». *Endocrine Reviews* 18 (3): 306-60.
<https://doi.org/10.1210/edrv.18.3.0303>.
- Pressley, L., et J. W. Funder. 1975. « Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptors in Gut Mucosa ». *Endocrinology* 97 (3): 588-96. <https://doi.org/10.1210/endo-97-3-588>.
- Quinkler, M, D Zehnder, J Lepenies, M. D. Petrelli, J. S. Moore, S. V. Hughes, P Cockwell, M Hewison, et P. M. Stewart. 2005. « Expression of Renal 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Is Decreased in Patients with Impaired Renal Function ». *European Journal of Endocrinology* 153 (2): 291-99.
<https://doi.org/10.1530/eje.1.01954>.
- Rabindran, S. K., M. Danielsen, et M. R. Stallcup. 1987. « Glucocorticoid-Resistant Lymphoma Cell Variants That Contain Functional Glucocorticoid Receptors ». *Molecular and Cellular Biology* 7 (12): 4211-17.
- Raef, H, E Y. Baitei, M Zou, et Y Shi. 2008. « Genotype-Phenotype Correlation in a Family with Primary Cortisol Resistance: Possible Modulating Effect of the ER22/23EK Polymorphism ». *European Journal of Endocrinology* 158 (4): 577-82.
<https://doi.org/10.1530/EJE-07-0629>.
- Rafestin-Oblin, M. E., M. Lombes, J. B. Michiel, A. Michaud, et M. Claire. 1984. « Mineralocorticoid Receptors in the Epithelial Cells of Human Colon and Ileum ». *Journal of Steroid Biochemistry* 20 (1): 311-15.
- Ran, F. A, P. D. Hsu, J Wright, V Agarwala, D A. Scott, et F Zhang. 2013. « Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System ». *Nature Protocols* 8 (11): 2281-2308.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>.
- Reddy, T. E., F Pauli, R O. Sprouse, N F. Neff, K. M. Newberry, M J. Garabedian, et R. M. Myers. 2009. « Genomic Determination of the Glucocorticoid Response Reveals Unexpected Mechanisms of Gene Regulation ». *Genome Research* 19 (12): 2163-71.
<https://doi.org/10.1101/gr.097022.109>.

- Reimondo, G, I Chiodini, S Puglisi, A Pia, V Morelli, D Kastelan, S Cannavo, et al. 2016. « Analysis of BCL1, N363S and ER22/23EK Polymorphisms of the Glucocorticoid Receptor Gene in Adrenal Incidentalomas ». *PloS One* 11 (9): e0162437. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162437>.
- Reincke, M., J. Nieke, G. P. Krestin, W. Saeger, B. Allolio, et W. Winkelmann. 1992. « Preclinical Cushing's Syndrome in Adrenal "Incidentalomas": Comparison with Adrenal Cushing's Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 75 (3): 826-32. <https://doi.org/10.1210/jcem.75.3.1517373>.
- Reul, J. M., F. R. van den Bosch, et E. R. de Kloet. 1987. « Relative Occupation of Type-I and Type-II Corticosteroid Receptors in Rat Brain Following Stress and Dexamethasone Treatment: Functional Implications ». *The Journal of Endocrinology* 115 (3): 459-67.
- Richards, S, N Aziz, S Bale, D Bick, S Das, J Gastier-Foster, W W. Grody, et al. 2015. « Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 17 (5): 405-24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
- Ricketts, M. L., K. J. Shoesmith, M. Hewison, A. Strain, M. C. Eggo, et P. M. Stewart. 1998. « Regulation of 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in Primary Cultures of Rat and Human Hepatocytes ». *The Journal of Endocrinology* 156 (1): 159-68.
- Roberts, M. L., T Kino, N. C. Nicolaides, D E. Hurt, E Katsantoni, A Sertedaki, F Komianou, K Kassiou, G. P. Chrousos, et E Charmandari. 2013. « A Novel Point Mutation in the DNA-Binding Domain (DBD) of the Human Glucocorticoid Receptor Causes Primary Generalized Glucocorticoid Resistance by Disrupting the Hydrophobic Structure of Its DBD ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (4): E790-795. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3549>.
- Rogers, S., R. Wells, et M. Rechsteiner. 1986. « Amino Acid Sequences Common to Rapidly Degraded Proteins: The PEST Hypothesis ». *Science (New York, N.Y.)* 234 (4774): 364-68.
- Rog-Zielinska, E. A., A Thomson, C. J. Kenyon, D. G. Brownstein, C. M. Moran, D Szumska, Z Michailidou, et al. 2013. « Glucocorticoid Receptor Is Required for Foetal Heart Maturation ». *Human Molecular Genetics* 22 (16): 3269-82. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt182>.
- Rosmond, R., Y. C. Chagnon, M. Chagnon, L. Pérusse, C. Bouchard, et P. Björntorp. 2000. « A Polymorphism of the 5'-Flanking Region of the Glucocorticoid Receptor Gene

- Locus Is Associated with Basal Cortisol Secretion in Men ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 49 (9): 1197-99. <https://doi.org/10.1053/meta.2000.7712>.
- Rosmond, R, et G Holm. 2008. « A 5-Year Follow-up Study of 3 Polymorphisms in the Human Glucocorticoid Receptor Gene in Relation to Obesity, Hypertension, and Diabetes ». *Journal of the Cardiometabolic Syndrome* 3 (3): 132-35. <https://doi.org/10.1111/j.1559-4572.2008.00008.x>.
- Rossum, E. F. C. van, E B. Binder, M Majer, J. W. Koper, M Ising, S Modell, D Salyakina, S. W. J. Lamberts, et F Holsboer. 2006. « Polymorphisms of the Glucocorticoid Receptor Gene and Major Depression ». *Biological Psychiatry* 59 (8): 681-88. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.007>.
- Rossum, E. F. C. van, J. W. Koper, A. W. van den Beld, A. G. Uitterlinden, P Arp, W Ester, J. A. M. J. L. Janssen, et al. 2003. « Identification of the BclI Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene: Association with Sensitivity to Glucocorticoids in Vivo and Body Mass Index ». *Clinical Endocrinology* 59 (5): 585-92.
- Roy, S, C Coldren, A Karunamurthy, N. S. Kip, E W. Klee, S. E. Lincoln, A Leon, et al. 2018. « Standards and Guidelines for Validating Next-Generation Sequencing Bioinformatics Pipelines: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD* 20 (1): 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.11.003>.
- Ruiz, M., U. Lind, M. Gåfväls, G. Eggertsen, J. Carlstedt-Duke, L. Nilsson, M. Holtmann, P. Stierna, A. C. Wikström, et S. Werner. 2001. « Characterization of Two Novel Mutations in the Glucocorticoid Receptor Gene in Patients with Primary Cortisol Resistance ». *Clinical Endocrinology* 55 (3): 363-71.
- Russcher, H, P Smit, E L. T. van den Akker, E. F. C. van Rossum, A O. Brinkmann, F. H. de Jong, S. W. J. Lamberts, et Jan W. Koper. 2005. « Two Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene Directly Affect Glucocorticoid-Regulated Gene Expression ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (10): 5804-10. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0646>.
- Russcher, H, P Smit, E. F. C. van Rossum, E. L. T. van den Akker, A. O. Brinkmann, L. J. M. de Heide, F. H. de Jong, J. W. Koper, et S. W. J. Lamberts. 2006. « Strategies for the Characterization of Disorders in Cortisol Sensitivity ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (2): 694-701. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2212>.
- Sacta, M. A., Y Chinenov, et I Rogatsky. 2016. « Glucocorticoid Signaling: An Update from a Genomic Perspective ». *Annual Review of Physiology* 78: 155-80. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105323>.

- Sánchez-Vega, B, et V Gandhi. 2009. « Glucocorticoid Resistance in a Multiple Myeloma Cell Line Is Regulated by a Transcription Elongation Block in the Glucocorticoid Receptor Gene (NR3C1) ». *British Journal of Haematology* 144 (6): 856-64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07549.x>.
- Sanger, F., S. Nicklen, et A. R. Coulson. 1992. « DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. 1977 ». *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 104-8.
- Santen, R. J., C. M. Jewell, W Yue, D. F. Heitjan, H Raff, K. S. Katen, et J. A. Cidlowski. 2018. « Glucocorticoid Receptor Mutations and Hypersensitivity to Endogenous and Exogenous Glucocorticoids ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 103 (10): 3630-39. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00352>.
- Sarkar, G., J. Cassady, C. D. Bottema, et S. S. Sommer. 1990. « Characterization of Polymerase Chain Reaction Amplification of Specific Alleles ». *Analytical Biochemistry* 186 (1): 64-68.
- Savory, J. G., B. Hsu, I. R. Laquian, W. Giffin, T. Reich, R. J. Haché, et Y. A. Lefebvre. 1999. « Discrimination between NL1- and NL2-Mediated Nuclear Localization of the Glucocorticoid Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (2): 1025-37.
- Savory, J. G., G. G. Préfontaine, C. Lamprecht, M. Liao, R. F. Walther, Y. A. Lefebvre, et R. J. Haché. 2001. « Glucocorticoid Receptor Homodimers and Glucocorticoid-Mineralocorticoid Receptor Heterodimers Form in the Cytoplasm through Alternative Dimerization Interfaces ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (3): 781-93. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.781-793.2001>.
- Schaaf, M. J. M., et J. A. Cidlowski. 2002. « AUUUA Motifs in the 3'UTR of Human Glucocorticoid Receptor Alpha and Beta mRNA Destabilize mRNA and Decrease Receptor Protein Expression ». *Steroids* 67 (7): 627-36.
- Schild, L. 1996. « The ENaC Channel as the Primary Determinant of Two Human Diseases: Liddle Syndrome and Pseudohypoaldosteronism ». *Nephrologie* 17 (7): 395-400.
- Schulz, M, M Eggert, A Baniahmad, A Dostert, T Heinzl, et R Renkawitz. 2002. « RU486-Induced Glucocorticoid Receptor Agonism Is Controlled by the Receptor N Terminus and by Corepressor Binding ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (29): 26238-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203268200>.
- Seckl, J. R., N. M. Morton, K. E. Chapman, et B. R. Walker. 2004. « Glucocorticoids and 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Adipose Tissue ». *Recent Progress in Hormone Research* 59: 359-93.
- Segard-Maurel, I., K. Rajkowski, N. Jibard, G. Schweizer-Groyer, E. E. Baulieu, et F. Cadepond. 1996. « Glucocorticosteroid Receptor Dimerization Investigated by

- Analysis of Receptor Binding to Glucocorticosteroid Responsive Elements Using a Monomer-Dimer Equilibrium Model ». *Biochemistry* 35 (5): 1634-42. <https://doi.org/10.1021/bi951369h>.
- Shah, R. V., V. L. Murthy, S. A. Abbasi, R Blankstein, R. Y. Kwong, A. B. Goldfine, M. Jerosch-Herold, J. A. C. Lima, J Ding, et Matthew A. Allison. 2014. « Visceral Adiposity and the Risk of Metabolic Syndrome across Body Mass Index: The MESA Study ». *JACC. Cardiovascular Imaging* 7 (12): 1221-35. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2014.07.017>.
- Shen, Y, H Cheol Roh, M Kumari, et E. D. Rosen. 2017. « Adipocyte Glucocorticoid Receptor Is Important in Lipolysis and Insulin Resistance Due to Exogenous Steroids, but Not Insulin Resistance Caused by High Fat Feeding ». *Molecular Metabolism* 6 (10): 1150-60. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2017.06.013>.
- Sherling, D Harris, P Perumareddi, et C. H. Hennekens. 2017. « Metabolic Syndrome ». *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 22 (4): 365-67. <https://doi.org/10.1177/1074248416686187>.
- Solito, E, A Mulla, J. F. Morris, H. C. Christian, R. J. Flower, et J. C. Buckingham. 2003. « Dexamethasone Induces Rapid Serine-Phosphorylation and Membrane Translocation of Annexin 1 in a Human Folliculostellate Cell Line via a Novel Nongenomic Mechanism Involving the Glucocorticoid Receptor, Protein Kinase C, Phosphatidylinositol 3-Kinase, and Mitogen-Activated Protein Kinase ». *Endocrinology* 144 (4): 1164-74. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220592>.
- Song, I-H, et F Buttgereit. 2006. « Non-Genomic Glucocorticoid Effects to Provide the Basis for New Drug Developments ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 246 (1-2): 142-46. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.012>.
- Spijker, A. T., E. F. C. van Rossum, E Hoencamp, R. H. DeRijk, J Haffmans, M Blom, L Manenschijs, J. W. Koper, S. Wj Lamberts, et F. G. Zitman. 2009. « Functional Polymorphism of the Glucocorticoid Receptor Gene Associates with Mania and Hypomania in Bipolar Disorder ». *Bipolar Disorders* 11 (1): 95-101. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2008.00647.x>.
- Staab, C. A., et E Maser. 2010. « 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Is an Important Regulator at the Interface of Obesity and Inflammation ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 119 (1-2): 56-72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.12.013>.
- Starick, S. R., J Ibn-Salem, M Jurk, C Hernandez, M. I. Love, H-R Chung, M Vingron, M Thomas-Chollier, et S. H. Meijnsing. 2015. « ChIP-Exo Signal Associated with DNA-Binding Motifs Provides Insight into the Genomic Binding of the Glucocorticoid

- Receptor and Cooperating Transcription Factors ». *Genome Research* 25 (6): 825-35. <https://doi.org/10.1101/gr.185157.114>.
- Stavreva, D. A., W. G. Müller, G. L. Hager, C. L. Smith, et J. G. McNally. 2004. « Rapid Glucocorticoid Receptor Exchange at a Promoter Is Coupled to Transcription and Regulated by Chaperones and Proteasomes ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (7): 2682-97. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.7.2682-2697.2004>.
- Stellato, C. 2004. « Post-Transcriptional and Nongenomic Effects of Glucocorticoids ». *Proceedings of the American Thoracic Society* 1 (3): 255-63. <https://doi.org/10.1513/pats.200402-015MS>.
- Stewart, P. M., B. R. Walker, G. Holder, D. O'Halloran, et C. H. Shackleton. 1995. « 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity in Cushing's Syndrome: Explaining the Mineralocorticoid Excess State of the Ectopic Adrenocorticotropin Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80 (12): 3617-20. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.12.8530609>.
- Sundahl, N, J Bridelance, C Libert, K De Bosscher, et I. M. Beck. 2015. « Selective Glucocorticoid Receptor Modulation: New Directions with Non-Steroidal Scaffolds ». *Pharmacology & Therapeutics* 152 (août): 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.001>.
- Surjit, M, K Priya Ganti, A Mukherji, T Ye, G Hua, D Metzger, M Li, et P Chambon. 2011. « Widespread Negative Response Elements Mediate Direct Repression by Agonist-Liganded Glucocorticoid Receptor ». *Cell* 145 (2): 224-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.027>.
- Suzuki, S, K Koyama, A Darnel, H Ishibashi, S Kobayashi, H Kubo, T Suzuki, H Sasano, et Zygmund S. Krozowski. 2003. « Dexamethasone Upregulates 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in BEAS-2B Cells ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167 (9): 1244-49. <https://doi.org/10.1164/rccm.200210-1139OC>.
- Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, et S. Takeda. 1998. « Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells ». *The EMBO Journal* 17 (18): 5497-5508. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5497>.
- Tatsi, C, P Xekouki, O Nioti, B Bachrach, E Belyavskaya, C Lyssikatos, et C A. Stratakis. 2019. « A Novel Mutation in the Glucocorticoid Receptor Gene as a Cause of Severe Glucocorticoid Resistance Complicated by Hypertensive Encephalopathy ». *Journal of Hypertension* 37 (7): 1475-81. <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000002048>.

- Teng, Z, M Zhang, M Zhao, et W Zhang. 2013. « Glucocorticoid Exerts Its Non-Genomic Effect on IPSC by Activation of a Phospholipase C-Dependent Pathway in Prefrontal Cortex of Rats ». *The Journal of Physiology* 591 (13): 3341-53. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.254961>.
- Tian, S, H Poukka, J. J. Palvimo, et O. A. Jänne. 2002. « Small Ubiquitin-Related Modifier-1 (SUMO-1) Modification of the Glucocorticoid Receptor ». *The Biochemical Journal* 367 (Pt 3): 907-11. <https://doi.org/10.1042/BJ20021085>.
- Touray, M., F. Ryan, R. Jaggi, et F. Martin. 1991. « Characterisation of Functional Inhibition of the Glucocorticoid Receptor by Fos/Jun ». *Oncogene* 6 (7): 1227-34.
- Trebble, P., L. Matthews, J. Blaikley, A. W. O. Wayte, G. C. M. Black, A. Wilton, et D. W. Ray. 2010. « Familial Glucocorticoid Resistance Caused by a Novel Frameshift Glucocorticoid Receptor Mutation ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 95 (12): E490-499. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0705>.
- Turner, J. D., et C. P. Muller. 2005. « Structure of the Glucocorticoid Receptor (NR3C1) Gene 5' Untranslated Region: Identification, and Tissue Distribution of Multiple New Human Exon 1 ». *Journal of Molecular Endocrinology* 35 (2): 283-92. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01822>.
- Tzanela, M., E. Mantzou, K. Saltiki, M. Tampourlou, N. Kalogeris, D. Hadjidakis, S. Tsagarakis, et M. Alevizaki. 2012. « Clinical and Biochemical Impact of BCL1 Polymorphic Genotype of the Glucocorticoid Receptor Gene in Patients with Adrenal Incidentalomas ». *Journal of Endocrinological Investigation* 35 (4): 395-400. <https://doi.org/10.3275/7840>.
- Vague, J. 1996. « The Degree of Masculine Differentiation of Obesities ». *Obesity Research* 4 (2): 204-12. <https://doi.org/10.1002/j.1550-8528.1996.tb00536.x>.
- Van Eekelen, J. A., W. Jiang, E. R. De Kloet, et M. C. Bohn. 1988. « Distribution of the Mineralocorticoid and the Glucocorticoid Receptor MRNAs in the Rat Hippocampus ». *Journal of Neuroscience Research* 21 (1): 88-94. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210113>.
- Vandewalle, J, A Luybaert, K De Bosscher, et C Libert. 2018. « Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 29 (1): 42-54. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.10.010>.
- Velayos, T, G Grau, I Rica, G Pérez-Nanclares, et S Gaztambide. 2016. « Glucocorticoid Resistance Syndrome Caused by Two Novel Mutations in the NR3C1 Gene ». *Endocrinología Y Nutrición: Organó De La Sociedad Española De Endocrinología Y Nutrición* 63 (7): 369-71. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.03.010>.

- Vermeer, H, B I. Hendriks-Stegeman, B van der Burg, V Buul-Offers, S. C, et M Jansen. 2003. « Glucocorticoid-Induced Increase in Lymphocytic FKBP51 Messenger Ribonucleic Acid Expression: A Potential Marker for Glucocorticoid Sensitivity, Potency, and Bioavailability ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88 (1): 277-84. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020354>.
- Vezzosi, D, R Libé, C Baudry, M Rizk-Rabin, A Horvath, I Levy, F René-Corail, et al. 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 ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97 (11): E2063-2069. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2275>.
- Vierhapper, H., P. Nowotny, et W. Waldhäusl. 2000. « Production Rates of Testosterone in Patients with Cushing's Syndrome ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 49 (2): 229-31.
- Villares Fragoso, M. C. B, I. Q Wanichi, I Pontes Cavalcante, et B Marinho de Paula Mariani. 2016. « The Role of Gsp Mutations on the Development of Adrenocortical Tumors and Adrenal Hyperplasia ». *Frontiers in Endocrinology* 7: 104. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00104>.
- Vingerhoeds, A. C., J. H. Thijssen, et F. Schwarz. 1976. « Spontaneous Hypercortisolism without Cushing's Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 43 (5): 1128-33. <https://doi.org/10.1210/jcem-43-5-1128>.
- Vitellius, G, B Delemer, P Caron, O Chabre, J Bouligand, E Pussard, S Trabado, et M Lombes. 2019. « Impaired 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Glucocorticoid Resistant Patients ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, juin. <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00800>.
- Vitellius, G, J Fagart, B Delemer, L Amazit, N Ramos, J Bouligand, F Le Billan, et al. 2016. « Three Novel Heterozygous Point Mutations of NR3C1 Causing Glucocorticoid Resistance ». *Human Mutation*, avril. <https://doi.org/10.1002/humu.23008>.
- Vitellius, G, et M Lombès. 2019. « Partial glucocorticoid resistance in the pathophysiology of adrenal cortex hyperplasia ». *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, juillet 2019.
- Vitellius, G, S Trabado, J Bouligand, B Delemer, et M Lombès. 2018. « Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling ». *Annales D'endocrinologie* 79 (3): 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.03.001>.
- Vitellius, G, S Trabado, C Hoeffel, J Bouligand, A Bennet, F Castinetti, B Decoudier, et al. 2018. « Significant Prevalence of NR3C1 Mutations in Incidentally Discovered Bilateral

- Adrenal Hyperplasia: Results of the French MUTA-GR Study ». *European Journal of Endocrinology* 178 (4): 411-23. <https://doi.org/10.1530/EJE-17-1071>.
- Voisin, M, P de Medina, A Mallinger, F Dalenc, E Huc-Claustre, J Leignadier, N Serhan, et al. 2017. « Identification of a Tumor-Promoter Cholesterol Metabolite in Human Breast Cancers Acting through the Glucocorticoid Receptor ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (44): E9346-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707965114>.
- Vottero, A, T Kino, H Combe, P Lecomte, et G. P. Chrousos. 2002. « A Novel, C-Terminal Dominant Negative Mutation of the GR Causes Familial Glucocorticoid Resistance through Abnormal Interactions with P160 Steroid Receptor Coactivators ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87 (6): 2658-67. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8520>.
- Wallace, A. D., et J. A. Cidlowski. 2001. « Proteasome-Mediated Glucocorticoid Receptor Degradation Restricts Transcriptional Signaling by Glucocorticoids ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (46): 42714-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106033200>.
- Wallberg, A. E., K. E. Neely, A. H. Hassan, J. A. Gustafsson, J. L. Workman, et A. P. Wright. 2000. « Recruitment of the SWI-SNF Chromatin Remodeling Complex as a Mechanism of Gene Activation by the Glucocorticoid Receptor Tau1 Activation Domain ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (6): 2004-13.
- Wang, H, H Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlaty, A. W. Cheng, F Zhang, et R Jaenisch. 2013. « One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering ». *Cell* 153 (4): 910-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>.
- Webster, J. C., C. M. Jewell, J. E. Bodwell, A. Munck, M. Sar, et J. A. Cidlowski. 1997. « Mouse Glucocorticoid Receptor Phosphorylation Status Influences Multiple Functions of the Receptor Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9287-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9287>.
- Weigand, I, C. L. Ronchi, M Rizk-Rabin, G Di Dalmazi, V Wild, K Bathon, B Rubin, et al. 2017. « Differential Expression of the Protein Kinase A Subunits in Normal Adrenal Glands and Adrenocortical Adenomas ». *Scientific Reports* 7 (1): 49. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00125-8>.
- Wester, V. L., J. W. Koper, E. L. T. van den Akker, O. H. Franco, R. P. Stolk, et E. F. C. van Rossum. 2016. « Glucocorticoid Receptor Haplotype and Metabolic Syndrome: The Lifelines Cohort Study ». *European Journal of Endocrinology* 175 (6): 645-51. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0534>.

- Whirlledge, S. D., C. M. Jewell, L. M. Barber, X Xu, K. S. Katen, S. Garantziotis, et J. A. Cidlowski. 2017. « Generating Diversity in Human Glucocorticoid Signaling through a Racially Diverse Polymorphism in the Beta Isoform of the Glucocorticoid Receptor ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 97 (11): 1282-95. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.76>.
- White, P. C. 2018. « Alterations of Cortisol Metabolism in Human Disorders ». *Hormone Research in Paediatrics* 89 (5): 320-30. <https://doi.org/10.1159/000485508>.
- Xu, M., K. D. Dittmar, G. Giannoukos, W. B. Pratt, et S. S. Simons. 1998. « Binding of Hsp90 to the Glucocorticoid Receptor Requires a Specific 7-Amino Acid Sequence at the Amino Terminus of the Hormone-Binding Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (22): 13918-24.
- Yang, Z, C Guo, P Zhu, W Li, L Myatt, et K Sun. 2007. « Role of Glucocorticoid Receptor and CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha in the Feed-Forward Induction of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Expression by Cortisol in Human Amnion Fibroblasts ». *The Journal of Endocrinology* 195 (2): 241-53. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0303>.
- Yoshikawa, N, N Shimizu, M Sano, K Ohnuma, S Iwata, O Hosono, K Fukuda, C Morimoto, et H Tanaka. 2008. « Role of the Hinge Region of Glucocorticoid Receptor for HEXIM1-Mediated Transcriptional Repression ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 371 (1): 44-49. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.155>.
- Young, M. J., L Moussa, R Dilley, et J. W. Funder. 2003. « Early Inflammatory Responses in Experimental Cardiac Hypertrophy and Fibrosis: Effects of 11 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Inactivation ». *Endocrinology* 144 (3): 1121-25. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220926>.
- Yudt, M. R., C. M. Jewell, R. J. Bienstock, et J. A. Cidlowski. 2003. « Molecular Origins for the Dominant Negative Function of Human Glucocorticoid Receptor Beta ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (12): 4319-30.
- Zaret, K. S., et K. R. Yamamoto. 1984. « Reversible and Persistent Changes in Chromatin Structure Accompany Activation of a Glucocorticoid-Dependent Enhancer Element ». *Cell* 38 (1): 29-38.
- Zennaro, M. C. 1998. « Syndromes of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Resistance ». *European Journal of Endocrinology* 139 (2): 127-38.
- Zennaro, M. C., M. C. Keightley, Y. Kotelevtsev, G. S. Conway, F. Soubrier, et P. J. Fuller. 1995. « Human Mineralocorticoid Receptor Genomic Structure and Identification of Expressed Isoforms ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (36): 21016-20.

- Zhu, H-j, Y-f Dai, O Wang, M Li, L Lu, W-g Zhao, X-p Xing, H Pan, N-s Li, et F-y Gong. 2011. « Generalized Glucocorticoid Resistance Accompanied with an Adrenocortical Adenoma and Caused by a Novel Point Mutation of Human Glucocorticoid Receptor Gene ». *Chinese Medical Journal* 124 (4): 551-55.
- Zuo, Z., G. Urban, J. G. Scammell, N. M. Dean, T. K. McLean, I. Aragon, et R. E. Honkanen. 1999. « Ser/Thr Protein Phosphatase Type 5 (PP5) Is a Negative Regulator of Glucocorticoid Receptor-Mediated Growth Arrest ». *Biochemistry* 38 (28): 8849-57. <https://doi.org/10.1021/bi990842e>.

ANNEXE 1 : Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling

Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M

Ann Endocrinol, 2018



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com

**Annales
d'Endocrinologie**
Annals of Endocrinology

Annales d'Endocrinologie 79 (2018) 98–106

Klotz communication 2018: Cortisol and all its disorders
Pathophysiology of Glucocorticoid Signaling

Physiopathologie de la signalisation glucocorticoïde

Géraldine Vitellius^{a,b}, Séverine Trabado^{a,c}, Jérôme Bouligand^{a,c},
Brigitte Delemer^b, Marc Lombès^{a,d,*}

^a Inserm Umr.S U1185, faculté de médecine Paris-Sud, université Paris-Sud, université Paris-Saclay, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

^b Service d'endocrinologie diabète nutrition, CHU de Reims, hôpital Robert-Debré, 51100, France

^c Service de génétique moléculaire, pharmacogénétique et hormonologie, CHU de Bicêtre, hôpitaux universitaires Paris-Sud, AH-HP, 94275, France

^d Service d'endocrinologie et des maladies de la reproduction, hôpitaux universitaires Paris-Sud, CHU Bicêtre, AH-HP, 94275 Le Kremlin Bicêtre, France

Abstract

Glucocorticoids (GC), such as cortisol or dexamethasone, control various physiological functions, notably those involved in development, metabolism, inflammatory processes and stress, and exert most of their effects upon binding to the glucocorticoid receptor (GR, encoded by *NR3C1* gene). GC signaling follows several consecutive steps leading to target gene transactivation, including ligand binding, nuclear translocation of ligand-activated GR complexes, DNA binding, coactivator interaction and recruitment of functional transcriptional machinery. Any step may be impaired and may account for altered GC signaling. Partial or generalized glucocorticoid resistance syndrome may result in a reduced level of functional GR, a decreased hormone affinity and binding, a defect in nuclear GR translocation, a decrease or lack of DNA binding and/or post-transcriptional GR modifications. To date, 26 loss-of-function *NR3C1* mutations have been reported in the context of hypertension, hirsutism, adrenal hyperplasia or metabolic disorders. These clinical signs are generally associated with biological features including hypercortisolism without negative regulatory feedback loop on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Patients had often low plasma aldosterone and renin levels despite hypertension. Only one GR gain-of-function mutation has been described associating Cushing's syndrome phenotype with normal urinary-free cortisol. Some GR polymorphisms (ER22/23EK, GR-9β) have been linked to glucocorticoid resistance and a healthier metabolic profile whereas some others seemed to be associated with GC hypersensitivity (N363S, *BclII*), increasing cardiovascular risk (diabetes type 2, visceral obesity). This review focuses on the earlier findings on the pathophysiology of GR signaling and presents criteria facilitating identification of novel *NR3C1* mutations in selected patients.

© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *NR3C1*; Mutations; Glucocorticoid receptor; Glucocorticoid resistance; GR signaling

Résumé

Les glucocorticoïdes (GC) exercent de nombreux effets dans l'organisme, et sont impliqués dans le développement, le métabolisme, l'inflammation et le stress après liaison au récepteur des glucocorticoïdes (GR, codé par le gène *NR3C1*). Après activation par les GC, le complexe GC-GR est transféré dans le noyau où il s'homodimérise et se lie aux éléments de réponse sur l'ADN permettant la transcription de gènes cibles. La résistance aux GC peut être due à une altération de chacune des étapes de la signalisation du GR. À ce jour, 26 mutations perte de fonction du GR ont été rapportées devant des signes cliniques variés : hypertension artérielle, hirsutisme, hyperplasie surrénalienne ou troubles métaboliques. La plupart des patients ont un hypercortisolisme biologique sans rétrocontrôle négatif du cortisol sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Les patients présentent également des concentrations plasmatiques d'aldostérone et de rénine normales ou basses, associées ou non à une hypertension artérielle. Chacune mutation altère la signalisation GC. Une seule mutation gain de fonction du GR a été décrite, conduisant à un profil métabolique défavorable (adiposité viscérale, diabète de type 2). Certains polymorphismes du GR (ER22/23EK, GR-9β) sont associés à une résistance partielle

* Corresponding author. Inserm U1185, faculté de médecine, Paris-Sud, 63, rue Gabriel-Péri, 94276 Le Kremlin Bicêtre cedex, France.

E-mail address: marc.lombes@u-psud.fr (M. Lombès).

aux GC qui s'accompagne d'un meilleur profil métabolique. Enfin, d'autres polymorphismes (N363S, BclII) sont associés à une hypersensibilité GC et un profil métabolique plus défavorable. Cette revue résume les principales données récentes sur la physiopathologie du GR et présente les critères facilitant l'identification de nouvelles mutations du GR chez des patients sélectionnés.

© 2018 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : NR3C1 ; Mutations ; Récepteur aux glucocorticoïdes ; Résistance aux glucocorticoïdes ; Signalisation glucocorticoïde

1. Introduction

Glucocorticoid hormones (GC) regulate many physiological functions such as stress responses, metabolism (lipid homeostasis), immunosuppressive effects (impacting dendritic cells and proinflammatory T lymphocytes, apoptosis) and hepatic functions by maintaining glucose homeostasis (gluconeogenesis and glycogenolysis), as well as growth, development and cell differentiation [1,2].

Owing to their impacts on immune system, synthetic GC are often used in auto-immune or inflammatory diseases. GC are steroid hormones, mostly synthesized by the adrenal gland cortex under the control of pituitary AdrenoCorticoTrophic Hormone (ACTH) and hypothalamic Corticotrophin Releasing Hormone (CRH). GC also exert a negative regulatory feedback loop on ACTH and CRH release [3].

Most of GC actions are mediated through binding to and activation of the nuclear glucocorticoid receptor (GR), even though some non-genomic actions have been reported to be mediated by a membrane-bound receptor event. This review will mostly focus on the mechanisms of GC action and their pathophysiological disruption reported in humans, responsible for glucocorticoid resistance syndrome associated with the 26 GR loss-of-function mutations identified to date.

2. GR structure and function

The GR, encoded by the *NR3C1* gene, was cloned in 1985 [4]. GR is located on the chromosome 5 and belongs to the nuclear receptor superfamily, acting as a ligand-activated transcriptional

factor [5]. Human GR (*hGR*) gene consists of ten exons from 1 to 9 β . The first exon is an untranslated exon with seven alternative spliced untranslated first exons [6]. Exon 2 encoded for the entire N-Terminal Domain (Fig. 1) (395 aminoacids [aa]) and contained the coding sequence for the activating function 1 (AF-1) or tau 1 (τ 1) domain (187–244 aa) that acts independently of ligand and binding [7]. τ 1 is a major transactivating domain, known to interact with coregulatory proteins or coregulators such as p160 family members, TIF2, DRIP/TRAP and SWI/SNF complex. Exons 3 and 4 encoded for the DNA Binding domain (DBD, ~70 aa), which contains two zinc finger motifs. The first zinc finger harbors the proximal P-box, specified by 3 aa (Glycine⁴³⁹, Serine⁴⁴⁰, Valine⁴⁴³), responsible for glucocorticoid responsive element (GRE) recognition [8] while the second zinc finger harbors the D-box involved in homodimerization of receptor (5 aa: Aspartic acid⁴⁵⁸, Glycine⁴⁵⁹, Arginine⁴⁶⁰, Asparagine⁴⁶¹, Alanine⁴⁶²) localized at the N-terminus of the second zinc finger. Exons 5 to 9 encoded for the ligand binding domain (LBD), containing the tau 2 (τ 2) domain, localized from 526 to 556 aa and an activating AF2 domain (753–768 aa), whose function is activated upon ligand binding [9]. The LBD interacts with an LXXLL motif also referred to as Nuclear Receptor (NR) box of coactivators. The LBD is a highly structured domain, composed of eleven alpha-helices (H1-H12, H2 is somehow absent) and 4 small beta strands. Helices H1 and H3 form one side of a helical sandwich pocket, while helices H7 to H10 compose the other side of this sandwich, helices H4, H5, H8 and H9 are present on the top of the ligand-binding pocket. A cavity in the bottom half, allows GC agonist molecule binding [10]. GR may exist in multiple isoforms generated by alternative splicing:

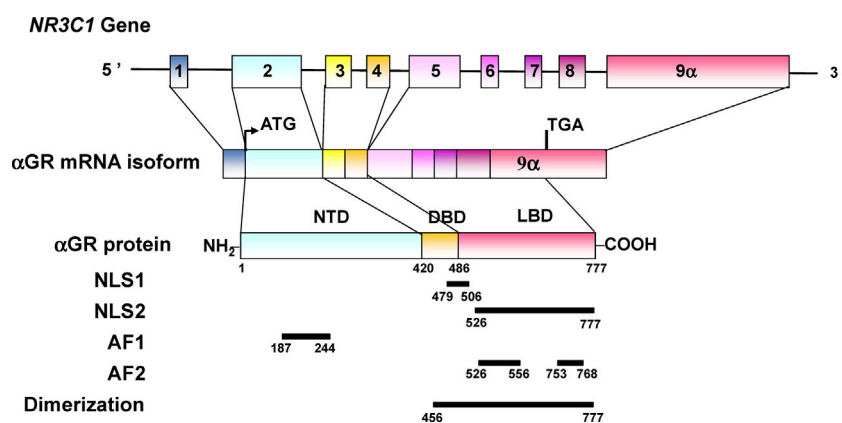


Fig. 1. Schematic representation of human *NR3C1* gene structure, mRNA and GR protein and its functional domains, adapted from Nicolaidis et al., 2010 and Wallberg et al., 2000. AF: transactivation domain; DBD: DNA binding domain; LBD: ligand binding domain; NLS: nuclear localization signal; NTD: N-Terminal domain.

hGR α , hGR β , hGR γ , hGR-A and hGR-P and eight alternative initiation sites into hGR α have been previously described [11,12], leading to distinct GR protein variants (GR α -A to D3). GR α -A results from translation of the GR mRNA from the first AUG codon (Methionine¹) while the shorter GR α -B results from translation from the second AUG codon (Methionine²⁷). Each GR isoform may be submitted to various post-translational modifications, such as phosphorylation or sumoylation [1,13]. Alternative splicing of exon 9 α or 9 β results in a protein of 777 aa for hGR α and a protein of 742 aa for hGR β , respectively. hGR α and hGR β are identical proteins up through aa 727 corresponding to the end of C-terminus of helice H10 of the LBD.

hGR β has an additional 15 aa coding for a unique sequence in helice H11. As a result, hGR β is unable to bind ligand [14].

Natural or synthesized lipophilic GC such as dexamethasone (DXM) or more recently non-steroidal compounds [15] are ligands binding to hGR α . Cortisol, the main endogenous GC, diffuses through the cell membrane. In the absence of ligand, intracellular GR predominantly resides in the cytoplasm under an heterooligomeric, multiprotein chaperon complex including hsp90, hsp70, immunophilins, through interaction with the helice H1, preventing GR degradation [16]. Upon agonist ligand binding, GR conformational change occurs, leading to the repositioning of the helice H12 of the LBD and to the exposure

Table 1
27 GR mutations reported in the literature (Feb 2018).

c DNA GR mutations	GR Protein	Genotype	Sex	Age of diagnostic (y)	Localization on NR3C1 gene	Localization on the hGR protein	Transactivation	References
c.1201 G>C	D401H	Heterozygous	W	43	Exon 2	NTD	↗:	Charmandari, JCEM, 2008
c.1268 T>C	V423A	Heterozygous	M	9	Exon 3	DBD	↘:	Roberts, JCEM, 2013
c.1405 C>T	R469X	Heterozygous	M	46	Exon 4	DBD	0	Bouligand, Plos One, 2010
c.1430 G>A	R477H	Heterozygous	W	41	Exon 4	DBD	0	Ruiz, Clin End, 2001
c.1429 C>A	R477S	Heterozygous	W	30	Exon 4	DBD	0	Vitellius, Hum Mut, 2016
c.1429 C>T	R477C	Heterozygous	W	12	Exon 4	DBD	NA	Velayos, Endocrinol Nut, 2017
c.1433 A>G	Y478C	Heterozygous	M	49	Exon 4	DBD	↘:	Vitellius, Hum Mut, 2016
c.1471 C>T	R491X	Heterozygous	M	44	Exon 5	LBD	0	Vitellius, Eur J Endocrinol, 2018
c.1503 G>T	Q501H	Heterozygous	W	60	Exon 5	LBD	↘:	Vitellius, Eur J Endocrinol, 2018
c.1667 G>T	T556I	Heterozygous	M	53	Exon 5	LBD	↘:	Zhu, Chinese Medical journal, 2011
c.1676 T>A	I559N	Heterozygous	M	33	Exon 5	LBD	↘:	Karl, Proc Assos Am Physicians, 1996
c.1712 T>C	V571A	Homozygous	W	9	Exon 5	LBD	↘:	Mendonca, JCEM, 2002
c.1724 T>G	V575G	Heterozygous	M	70	Exon 5	LBD	↘:	Nicolaides, JCEM, 2014
c.1762-1763insTTAC	H588Lfs*5	Heterozygous	W	41	Exon 6	LBD	NA	Velayos, Endocrinol Nut, 2017
c.1835 delC	Δ 612GR 4 bp deletion	Heterozygous Heterozygous	W W	20 26	Exon 6 Intron 6	LBD	0 NA	Trebbles, JCEM 2010 Karl M, JCEM, 1993
c.2054 A>T	D641V	Homozygous	M	48	Exon 7	LBD	0	Chrousos, JCI, 1990
c.2015 T>C	L672P	Heterozygous	M	60	Exon 7	LBD	0	Vitellius, Hum Mut, 2016
c.2035 G>A	G679S	Homozygous	M	19	Exon 8	LBD	NA	Raef, EJE, 2008
c.2035 G>A	G679S	Heterozygous	W	31	Exon 8	LBD	↘:	Ruiz et al, Clin Endocrinol, 2001
c.2141 G>A	R714Q	Heterozygous	W	2	Exon 8	LBD	↘:	Nader, JCEM, 2010
c.2177 A>G	H726R	Heterozygous	W	30	Exon 9	LBD	↘:	Nicolaides, EJCI, 2015
c.2185 G>A	V729I	Homozygous	M	6	Exon 9	LBD	↘:	Charmandari, JCEM, 2004
c.2209 T>C	F737L	Heterozygous	M	7	Exon 9	LBD	↘:	Charmandari, JCEM, 2007
c.2241 T>G	I747M	Heterozygous	W	18	Exon 9	LBD	↘:	Vottero, JCEM, 2002
c.2318T>C	L773P	Heterozygous	W	29	Exon 9	LBD	↘:	Charmandari, JCEM, 2005
c.2317-2318 delCT	L773X	Heterozygous	M	27	Exon 9	LBD	0	Donner, EJE, 2013
c.2318-2319 delTG	F774Sfs*24	Homozygous	M	Baby	Exon 9	LBD	0	McMahon, JCEM, 2010

One GR gain-of-function mutation was reported and 26 GR loss-of-function mutations were described, among which one mutation (G679S) was reported in two unrelated probands. Nine GR mutations had no ability to transactivate GRE luciferase: R469X, R477H, R477S, R491X, Δ 612GR, D641V, L672P, L773X and F774Sfs*24. Others GR mutations showed a decreased ability to transactivate GRE for V423A, T556I, V571A, V575G, G679S, R714Q, H726R, F737L, I747M, L773P and an increased ability to transactivate GRE luciferase for D401H mutant. M/W: men/women; NTD: N-Terminal domain; DBD: DNA binding domain; LBD: ligand binding domain; NA: not available; ↗: Increased; ↘: Decreased; 0: Activity null.

and activation of the two nuclear localization sequences NLS1 and NLS2. hGR α interacts with nuclear receptor coactivators through multiple amphipathic LXXLL motifs, thanks to AF2 and AF1 domains. To exert genomic effects, GR-GC homodimers or heterodimers interact directly with glucocorticoid responsive elements (GRE) or GRE half-sites in promoter regions of target genes or indirectly with other transcriptional factors, like AP1, NF- κ B, STAT families [17].

Classical GRE sequences consist of inverted repeats of hexameric half-sites separated a three base-pair sequence, AGAACAx_{xx}TGTTCT. GRE sequences affect GR conformation, leading to different degrees of dimer affinity and recruitment of various types of transcriptional coactivators and chromatin-modeling complexes [18]. Non-genomic effects of GC have been also reported via impacts with other signaling pathways such as Mitogen-activated protein kinase (MAPK), Phosphatidylinositol 3 phosphate, Ca²⁺/Calmodulin dependent protein kinase II or phospholipase C pathway [19–21].

The transactivation of *GR* target genes could be modulated in the presence of specific isoforms or variants of hGR α . For instance, it has been reported that GR α -B has a higher transcriptional activity than GR α -A, [11] whereas hGR α -D has the lowest transactivation ability on endogenously expressed genes or on reported gene assays [22]. On the other hand, hGR β exerts a dominant negative effect on hGR α in a dose-dependent manner as demonstrated by cotransfection assays with hGR α and hGR β , even though the expression level of hGR β is much lower than that of hGR α in human tissues [23]. With respect to post-translational modifications, it is well established that hGR α becomes hyperphosphorylated upon GC binding. Six serine residues on hGR α may be phosphorylated. The phosphorylation of Serine²¹¹ has been associated to the transcriptionally active form of hGR α whereas phosphorylation of Serine²²⁶ impaired GC signaling [13]. Modifications of hGR α transcriptional activity are responsible for glucocorticoid hypersensitivity or resistance syndrome.

3. GR resistance syndrome

The definition and classification of Glucocorticoid resistance syndrome are somehow very variable and largely depend on the molecular mechanisms involved. Given that GC belong to an important therapeutic class of molecules, often used in the treatment of inflammatory diseases (rheumatoid arthritis, asthma, lupus. . .) and hematopoietic cancers or respiratory diseases, it is not surprising that a persistent disease despite of a full dose of GC therapy could be classified as DXM-treatment resistance. Moreover, partial glucocorticoid resistance syndrome has been associated with the resistance of cells to DXM-induced apoptosis, whereas generalized glucocorticoid resistance syndrome has been defined by an absence of overt Cushing's syndrome signs with biological hypercortisolism and an absence of negative feedback loop of cortisol on hypothalamic-pituitary axis (HPA). Glucocorticoid resistance syndrome may be related to various underlying molecular mechanisms, which impaired glucocorticoid signaling including a low level of functional GR [24], GR haploinsufficiency by t (3;5) (q21;q31) translocation [25],

a decreased hormone-binding affinity (as observed in somatic GR mutations [26]), a decrease or an absence of DNA-binding capacity (as demonstrated in some germinal GR mutations [27]), a defect in GR phosphorylation [2], the blockade of transcription elongation [28] and an imbalance between hGR α and hGR β expression [14]. Generalized glucocorticoid resistance is mainly described in the context of GR loss-of-functions mutations, which could impair GC signaling at each step of the target gene transactivation cascade [27].

4. GR loss-of-functions mutations

Twenty-six germinal GR loss-of-function mutations have been described to date (February 2018), as illustrated in Fig. 2 and Table 1. Of note, a total of 27 patients have been reported since one mutation (G679S) has been identified in two unrelated probands. Among the 26 GR loss-of-function mutations, 19 were missense mutations, 4 frameshift mutations while 3 nonsense (stop) mutations have been reported. Six mutations were located in the DBD (V423A, R469X, R477H, R477C, R477S, Y478C), while twenty were located in the LBD. Five GR mutations were homozygous while the others were heterozygous. The age of onset was very variable from birth to adulthood, correlating with the severity of the disease, the more severe, the earlier. Three patients with homozygous GR mutations were young and for the two others, GR mutations were discovered at the adult age. Clinical signs varied from neonatal hypoglycemia, isosexual precocious pseudopuberty, severe dehydration, ambiguous genital development, to severe high blood pressure associated with hypokalemia (Fig. 3). However, several clinical signs seemed to be unrelated to the degree of impaired GR signaling (Table 1).

Others clinical signs may orientate towards genetic alterations of GR signaling such as resistant high blood pressure, hyperandrogenism in women with hirsutism and irregular menstrual cycles, unilateral or bilateral adrenal incidentalomas. Some patients had non-specific signs such as obesity or neuropsychiatric disorders. Sequencing *NR3C1* in family's members of affected patients revealed 12 familial mutations.

In accordance with the lack of appropriate GC action, none of GC resistant patients had overt Cushing's syndrome signs such as skin atrophy, proximal myopathy, truncal and visceral obesity or osteoporosis. In the context of GC resistance syndrome, it was initially suggested that the lack of GC feedback loop on HPA axis, led to ACTH overstimulation of adrenal glands, which may account for increased circulating GC, androgens and mineralocorticoid-like steroids (corticosterone, deoxycorticosterone), responsible for sodium retention and high blood pressure [29]. Eighteen patients had high 24 h urinary-free cortisol (UFC above reference values) while 21 patients had non-suppressed plasma cortisol concentrations after DXM suppression test (DST) by using at least 1 mg DXM overnight. Only one patient had normal cortisol after DST. Of interest, 15 patients had increased ACTH levels but six patients had normal ACTH levels (Fig. 4).

As reported in the literature when the information is available and illustrated in Fig. 4, nine out of 14 mutated women (64%) presented with hirsutism. Among the nine women, ACTH level

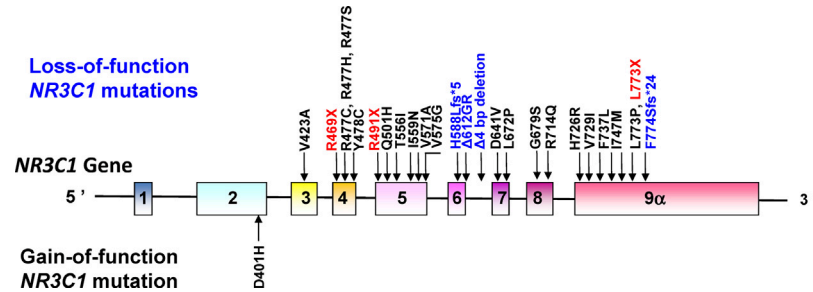


Fig. 2. 26 GR loss-of-function mutations and one GR gain-of-function mutation and their localization on the human *NR3C1* gene. Twenty-six GR loss-of-function mutations have been identified to date in 27 patients given that one mutation (G679S) was reported in two unrelated probands. Six GR mutations were located in the DBD (encoded by exons 3 and 4). V423A: substitution of a valine by an alanine; R469X: substitution of an arginine by a codon stop; R477C: substitution of an arginine by a cysteine; R477H: substitution of an arginine by an histidine; R447S: substitution of a tyrosine by a cysteine while 20 were located in the LBD (encoded by exons 5 to 9); R491X: substitution of an arginine by a codon stop; Q501H: substitution of a glutamine by a histidine; T556I: substitution of a threonine by an isoleucine; I559V: substitution of an isoleucine by a valine; V571A: substitution of a valine by an alanine; V575G: substitution of a valine by a glycine; H588Lfs*5: substitution of an histidine by a leucine, followed by a frameshift and premature stop codon; Δ612GR: deletion of 1 bp, Δ4 bp deletion: deletion of 4 bp, D641V: substitution of an aspartic acid by a valine; L672P: substitution of an leucine by a proline, G679S: substitution of a glycine by a serine; R714Q: substitution of an arginine by a glutamine; H726R: substitution of an histidine by an arginine; V729I: substitution of a valine by an isoleucine; F737L: substitution of a phenylalanine by a leucine; I747M: substitution of an isoleucine by a methionine; L773P: substitution of a leucine by a proline; L773X: substitution of a leucine by a codon stop; F774Sfs*24: substitution of a phenylalanine by a serine, followed by a frameshift and premature stop codon. D401H mutation is a gain-of mutation corresponding to the substitution of an aspartic acid by an histidine and is located in the N-terminal Domain (encoded by exon 2). DBD: DNA binding domain; LBD: ligand-binding domain; bp: base of pairs. In red letters: stop mutations; in blue letters: frameshift mutations often associated with a deletion and leading to premature stop codon; in black letters: missense mutations.

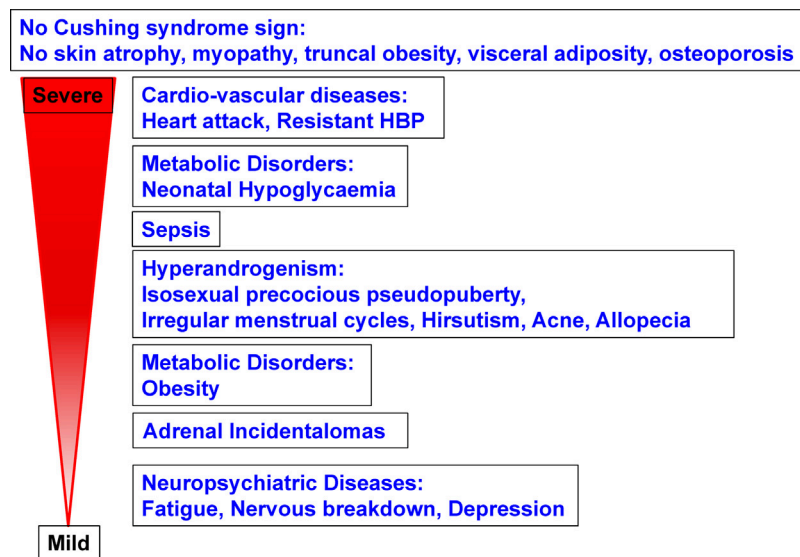


Fig. 3. Clinical features of patients presenting with GR loss-of-function mutations. Broad clinical spectrum with various clinical phenotype signs: from severe diseases like heart attack or resistant HBP to nonspecific and relatively mild symptoms such as fatigue or nervous breakdown. HBP: High blood pressure.

was normal for 1 patient and high for 5 patients while ACTH levels were not reported for others patients. 17-OH-Progesterone was high and only measured for 1 patient, DHEA-S levels were normal in 2 patients and high for 1 patient, Δ4-Androstenedione was normal for 1 patient and high for 2 patients. Taken together, most of female patients presenting with hirsutism had high ACTH levels.

Eleven patients out of 27 probands (41%) had hypertension (HBP) and 14 had normal blood pressure. Kalemia was low among all seven reported mutated patients with HBP. Corticosterone and DOC concentrations were reported high in only one patient. Aldosterone levels reported in 6 patients with HBP were normal for 3 patients but low for others, whereas renin levels were reported low in five patients. Interestingly, among patients

with no HBP, steroids with mineralocorticoid agonist activity (deoxycorticosterone and corticosterone) were high in one out of 3 reported patients whereas plasma aldosterone concentrations were low for these 3 patients associated with low renin level for 1 patient. We recently demonstrated a relatively high prevalence of *NR3C1* mutations (44%) among patients presenting with bilateral adrenal incidentalomas, biological hypercortisolism without Cushing's syndrome signs, kalemia below 4 mmol/L and low aldosterone levels, irrespective to the presence of HBP [30].

The activation of mineralocorticoid pathway in the context of GR mutations could be explained by two non-exclusive mechanisms. On one hand, DOC or corticosterone whose secretion is stimulated by ACTH, may bind and activate the

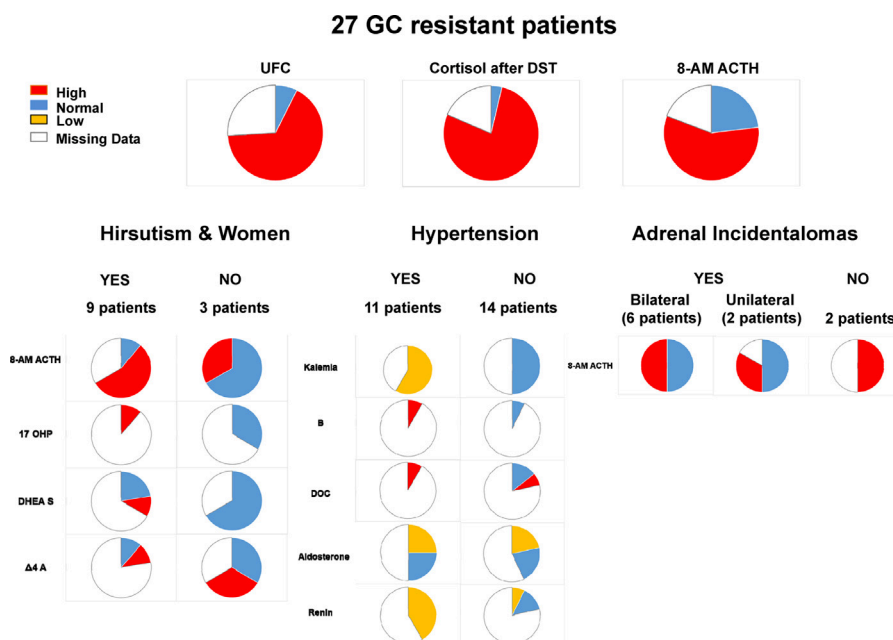


Fig. 4. Biological features of probands carrying mutated GR. Eighteen patients had high UFC while 21 patients had high cortisol after DST. Nine patients had hirsutism among 13 women harboring GR loss-of-function mutations. The presence of hirsutism was not reported in one patient. 8-AM ACTH, 17OHP, DHEA-S and Δ 4-A levels are reported, according to published articles, see Fig. 6. Eleven patients had HBP and 14 had normal blood pressure among 27 mutated patients. Kalemia, B, DOC, aldosterone and renin levels are summarized according to published articles (see Fig. 3). Eight patients had adrenal incidentalomas: six were bilateral and 2 unilateral incidentalomas and two patients had no adrenal incidentaloma. 8-AM ACTH levels are also reported according to published articles. These values are missing for 18 patients. UFC: Urinary free cortisol; DST: Dexamethasone suppression test; 17OHP: 17OH-Progesterone; S-DHEA: Sulfate Dehydroepiandrosterone; Δ 4-A: Delta 4 androstenedione; HBP: High Blood Pressure; B: Corticosterone; DOC: Deoxycorticosterone.

mineralocorticoid receptor in the kidney [31]. This could lead to sodium retention, volume expansion, high blood pressure and hypokalemia. On the other hand, an alternative molecular mechanism of apparent mineralocorticoid excess (AME) was proposed. The renal enzyme 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β HSD2), which metabolizes cortisol into cortisone, prevents cortisol to bind the mineralocorticoid receptor (MR). Indeed, cortisol has the same affinity for MR than aldosterone. Thus, cortisol excess in GR mutated patients, owing to the defect in GC breakdown, inappropriately overactivated the mineralocorticoid-signaling pathway. We recently provided evidence for an impaired 11β HSD2 enzymatic activity in GR mutant carriers [32], associated with HBP, hypokalemia, normal DOC levels and low aldosterone concentrations, supporting the partial defect in 11β HSD2 activity in the pathogenesis of AME in this disease.

Among the reported patients with GC resistance, eight out of 10 patients had adrenal incidentalomas (80%); 2 had unilateral and 6 had bilateral adrenal incidentalomas. Patients with adrenal incidentalomas had either normal or high ACTH levels, however one patient with normal adrenal glands had high ACTH level. Bilateral adrenal incidentalomas could be easily explained by ACTH overstimulation of adrenal cortex [33]. The GR haploinsufficiency observed in mutated patients may also constitute an alternative pathophysiological mechanism. Indeed, Michailidou et al., [34] showed adrenal gland enlargement in heterozygous GR +/- mice, carrying only one functional GR allele, despite normal ACTH levels. Recently, we demonstrated GR haploinsufficiency in *ex-vivo* models consisting of fibroblasts from four

patients carrying heterozygous *NR3C1* mutations originating from the Muta-GR cohort [30]. We could not exclude a prominent role of the ultrashort ACTH loop in adrenal glands in the pathogenesis of bilateral macronodular hyperplasia, recently identified by Louiset et al. [35]. However, its clinical relevance could not be easily assayed in these patients.

The metabolic profile of patients harboring GR loss-of-function mutations has not been precisely described. However, as revealed by recent publications and the MUTA-GR study [30], eight *NR3C1* mutated patients had high body mass index (BMI), from overweighted (BMI > 25 kg/m²) to obese patients (BMI ranging from 31 to 47 kg/m²) while 6 GR mutated patients had normal BMI. Thus, obesity does not seem to directly correlate with molecular defect of GR mutants.

5. Molecular mechanisms of altered GR signaling associated with GR mutations

The molecular mechanisms by which GR mutants affect GR signaling have been investigated *in vitro* for twenty-three GR mutants using several complementary approaches (Fig. 3).

Transactivation assays demonstrated that nine GR mutants were unable to transactivate GRE-driven luciferase reporter gene. Among them, three mutations were located in the GR DBD: R469X, a truncated receptor lacking the LBD was unable to bind GC, R477H and R477S mutants lost their ability to bind DNA. Five mutations were located in the GR LBD: R491X and Δ 612GR mutations led to a premature codon stop, D641V had a decreased affinity for GC. The L672P mutant did not interact

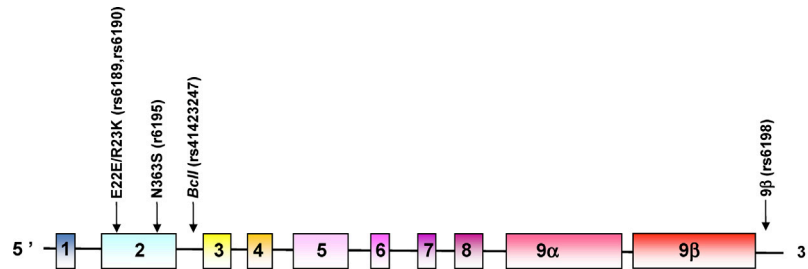


Fig. 5. Localization of common GR polymorphisms. ER22/23EK (rs6189, rs6190) polymorphism corresponds to two linked polymorphisms in codons 22 and 23, GGA. GAG to GAA. AAG, leading to one amino acid change R to K at position aa 23 and is located in the exon 2 of the *NR3C1* gene, N363S (rs6195) is the result in A → G change and is also located in the exon 2, *BclI* (rs41423247) located in the intron 2, is a C → G change and 9β (rs6198 or A3669G) is a A → G change, located in the 3' UTR end of the exon 9β. rs: Single Nucleotide Polymorphism.

with chaperon proteins and, as a result, was very unstable, resulting in an accelerated proteasome-induced degradation [36] while L773X and F774Sfs*24 mutants were also unable to bind ligands.

It was also established that the ability of others GR mutants to transactivate GRE luciferase vector was reduced. As expected, the V423A GR mutant located in the DBD had a decreased ability to bind DNA. Others mutants located in the LBD differentially impaired GR signaling. Most of GR mutants had a decreased affinity for GC binding, associated with a slower or reduced nuclear translocation, likely related to a defect of ligand-activated NLS2 associated function. A decrease in coactivator interaction for GR LBD mutants or through dominant negative effect (R714Q) exerts on wildtype hGRα [27] may also account for altered GR signaling.

6. GR gain-of-function mutation

GC hypersensitivity syndrome is often defined as the development of a typical Cushing's phenotype in spite of normal plasma cortisol concentrations. This syndrome has been suggested in the context of visceral obesity observed during acquired immune deficiency syndrome (AIDS) or of metabolic syndrome. HIV-1 infected patients present with Cushing's syndrome-like signs such as muscle wasting, myopathy, osteoporosis, visceral obesity and metabolic disorders including insulin resistance and dyslipidemia. Kino et al., showed that a HIV-1 associated protein, Vpr, acts as a GR coactivator and enhances its activity [37]. Few cases of GC hypersensitivity syndrome have been reported in the literature [38], spontaneously or after exogenous corticosteroid therapy. Investigation on the underlying molecular mechanisms found an increased GR transcriptional activity or a higher GR expression in peripheral lymphocytes without affecting GC affinity [38].

Only one GR mutation was described in the context of GR hypersensitivity by Charmandari et al., [39]. A 43-year-old woman had hypertension, visceral obesity with elevated waist to hip ratio but normal BMI. Biological investigations revealed dyslipidemia and type 2 diabetes. Hormonal investigations showed normal UFC. Genetic investigations discovered a heterozygous D401H GR mutation. Further functional characterization of this GR mutant showed an increased transactivation capacity with no impact on GC binding affinity, normal GR nuclear translocation,

and similar DNA binding properties or coactivator interaction, as compared to the wild-type GR [39].

7. GR polymorphisms

As illustrated in Fig. 5 and Table 2, GC resistance syndrome may be associated with some polymorphisms such as ER22/23EK or GR-9β in the context of healthier metabolic syndrome. In contrast, GC hypersensitivity has been reported when N363S and BclI polymorphisms were present in the context of visceral obesity. ER22/23EK (rs6189 and rs6190) polymorphism corresponds to a change of GAG AGG in GAA AAG in the exon 2 and is found in 2% of subjects in the general population, as estimated by the exome aggregation consortium (ExaC: <https://www.exac.broadinstitute.org/and> 1000 genomes: <http://www.internationalgenome.org/>). The presence of this polymorphism is associated with healthier metabolic profile, including lower total cholesterol levels, lower fasting insulin levels, increased insulin sensitivity and a lower risk of type 2 diabetes mellitus [40]. This polymorphism is also associated with a lower risk to develop dementia in elderly patients [41]. The molecular mechanism investigated by Russcher et al., [42], shows a significant reduction of transactivating capacity of hGRα associated with an increase in hGRα-A isoform expression [43], which had a lower transactivation activity compared to hGRα-B variant [11].

GR-9β (rs6198 or A3669G) polymorphism is a A to G substitution, in the 3' UTR end of the exon 9β (GTTTA motif). This polymorphism, recovered in 8% of the general population, is associated with decreased obesity risk in women, and healthier metabolic syndrome with decreased total cholesterol levels and increased HDL cholesterol levels. In vitro, GR-9β variant led to a more stable GRβ mRNA and increased the hGRβ protein expression. *Ex vivo*, there was no difference of GC induced up regulation of GILZ mRNA compared to non GR-9β variant [44].

BclI polymorphism (rs41423247), located in the intron 2, is a C to G nucleotide change and is found in 25% of the general population. Buemann et al., [45] showed a higher frequency of *BclI* polymorphism in leaner patients with abdominal visceral obesity. Rosmond et al., in a study with a 5-y follow-up, showed that the presence of homozygous *BclI* was associated with higher BMI, higher waist circumference, higher fasting glucose and insulin levels in men [46]. In addition, BclI polymorphism was

Table 2
Description of four common GR polymorphisms modulating GC sensitivity.

Polymorphisms	Nomenclature	GC sensitivity	<i>In vitro</i> transactivation	Metabolic syndrome	Psychiatric disorders	Adrenal incidentalomas	Auto-immune disorders
ER22/23EK N363S	rs6189,rs6190 rs6195	Resistance Hypersensitivity	Decreased Increased		No association	No association Bilateral adrenal incidentalomas	Lower risk to develop RA
<i>BclI</i>	rs41423247	Hypersensitivity		Increased Abdominal fat and BMI	Depression	Adrenal incidentalomas	Graves' ophthalmopathy (protector)
9 β	rs6198	Resistance	Decreased				Rheumatoid arthritis (Association)

ER22/23EK (rs6189 and rs6190) leads to a reduced GC sensitivity in vitro models. N363S (rs6195) and *BclI* polymorphism (rs41423247) increase GC sensitivity. 9 β (rs6198 or A3669G) is associated with decreased GC sensitivity. RA: rheumatoid arthritis.

associated with major depression in a large Caucasian population [47] and with a risk to develop adrenal incidentalomas [48]. Boyle et al. [49] showed that the presence of *BclI* (heterozygous and homozygous) was associated with a lower severity of Graves' ophthalmopathy disease.

Finally, the N363S (rs6195) polymorphism, located in the exon 2, is found at a 2.3% frequency in the general population. It corresponds to a change of A to a G. N363S patient carriers had significantly higher BMI [50] while Reimondo et al. [51] observed a higher N363S prevalence in hypertensive patients. No associations were found between N363S and major depression. Majnik et al. [52] observed a significant over-representation of N363S variant in patients with bilateral incidentalomas while Van Oosten et al. found a weak association between N363S polymorphism and rheumatoid arthritis disease [53]. Molecular mechanism investigated by Russcher et al. showed an increase of GR transactivation capacity [42].

8. Conclusion

The GR cDNA was first cloned in 1985. GC signaling may be impaired at each step of the mechanism of GC action, which may account for GC resistance syndrome. Only 26 GR loss-of-function mutations have been described to date in the context of generalized GC resistance syndrome. Patients with GR loss-of-function mutations may present with a broad clinical spectrum and various phenotypes ranging from fatigue to resistant HBP without Cushing's syndrome signs. Biological features of mutated cases are tremendously diverse but most of mutated patients had biological hypercortisolism defined by high UFC and/or a negative DST and a lack of negative feedback loop of cortisol on HPA axis. Abnormalities of the mineralocorticoid pathway were often reported in these patients. All GR loss-of-function mutations impaired GC signaling, including GC binding, nuclear translocation, DNA binding and/or transactivation capacity. Only one GR mutation in the context of GR hypersensitivity syndrome has been described to date in a patient with visceral obesity. Some GR polymorphisms have been also described to be associated with decreased GC sensitivity, likely leading to healthier metabolic profile, while others GR polymorphisms increasing GC sensitivity, seem to be associated with higher cardiovascular risk.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

References

- [1] Beck IME, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K. Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev* 2009;30:830–82.
- [2] Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci* 2013;34:518–30.
- [3] Keller-Wood ME, Dallman MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 1984;5:1–24.
- [4] Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985;318:635–41.
- [5] Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 2005;70:407–17.
- [6] Turner JD, Muller CP. Structure of the glucocorticoid receptor (*NR3C1*) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. *J Mol Endocrinol* 2005;35:283–92.
- [7] Wallberg AE, Neely KE, Hassan AH, Gustafsson JA, Workman JL, Wright AP. Recruitment of the SWI-SNF chromatin remodeling complex as a mechanism of gene activation by the glucocorticoid receptor tau1 activation domain. *Mol Cell Biol* 2000;20:2004–13.
- [8] Danielsen M, Hinck L, Ringold GM. Two amino acids within the knuckle of the first zinc finger specify DNA response element activation by the glucocorticoid receptor. *Cell* 1989;57:1131–8.
- [9] Hollenberg SM, Giguere V, Segui P, Evans RM. Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1987;49:39–46.
- [10] Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, et al. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 2002;110:93–105.
- [11] Yudit MR, Cidlowski JA. Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2001;15:1093–103.
- [12] Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 2005;18:331–42.
- [13] Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 2011;286:3177–84.
- [14] Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1069:1–9.
- [15] Kym PR, Kort ME, Coghlan MJ, Moore JL, Tang R, Ratajczyk JD, et al. Nonsteroidal selective glucocorticoid modulators: the effect of C-10

- substitution on receptor selectivity and functional potency of 5-allyl-2,5-dihydro-2,2,4-trimethyl-1H-[1]benzopyrano[3,4-f]quinolines. *J Med Chem* 2003;46:1016–30.
- [16] Cheung J, Smith DF. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2000;14:939–46.
- [17] Sacta MA, Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoid Signaling: An update from a genomic perspective. *Annu Rev Physiol* 2016;78:155–80.
- [18] Meijsing SH, Pufall MA, So AY, Bates DL, Chen L, Yamamoto KR. DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity. *Science* 2009;324:407–10.
- [19] Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2012;26:4805–20.
- [20] Solito E, Mulla A, Morris JF, Christian HC, Flower RJ, Buckingham JC. Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin I in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 2003;144:1164–74.
- [21] Ayrout M, Simon V, Bernard V, Binart N, Cohen-Tannoudji J, Lombès M, et al. A novel non genomic glucocorticoid signaling mediated by a membrane palmitoylated glucocorticoid receptor cross talks with GnRH in gonadotrope cells. *Sci Rep* 2017;7:1537.
- [22] Lu NZ, Collins JB, Grissom SF, Cidlowski JA. Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Biol* 2007;27:7143–60.
- [23] Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 1995;95:2435–41.
- [24] Rabindran SK, Danielsen M, Stallcup MR. Glucocorticoid-resistant lymphoma cell variants that contain functional glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1987;7:4211–27.
- [25] Emadali A, Hoghoughi N, Duley S, Hajmirza A, Verhoeven En Cosset F-L, et al. Haploinsufficiency for *NR3C1*, the gene encoding the glucocorticoid receptor, in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasms. *Blood* 2016;127:3040–53.
- [26] Kunz S, Sandoval R, Carlsson P, Carlstedt-Duke J, Bloom JW, Miesfeld RL. Identification of a novel glucocorticoid receptor mutation in budenonide-resistant human bronchial epithelial cells. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2003;17:2566–82.
- [27] Nicolaides NC, Charmandari E. Novel insights into the molecular mechanisms underlying generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity syndromes. *Horm Athens Greece* 2017;16:124–38.
- [28] Sánchez-Vega B, Gandhi V. Glucocorticoid resistance in a multiple myeloma cell line is regulated by a transcription elongation block in the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*). *Br J Haematol* 2009;144:856–64.
- [29] Chrousos GP, Detera-Wadleigh SD, Karl M. Syndromes of glucocorticoid resistance. *Ann Intern Med* 1993;119:1113–24.
- [30] Vitellius G, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, et al. Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study. *Eur J Endocrinol* 2018 [In press].
- [31] Rupperecht R, Reul JM, van Steensel B, Spengler D, Söder M, Berning B, et al. Pharmacological and functional characterization of human mineralocorticoid and glucocorticoid receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 1993;247:145–54.
- [32] Bouligand J, Delemer B, Hecart A-C, Meduri G, Viengchareun S, Amazit L, et al. Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *PLoS One* 2010;5 [e13563].
- [33] Gallo-Payet N, Martinez A, Lacroix A. Editorial: ACTH action in the adrenal cortex: from molecular biology to pathophysiology. *Front Endocrinol* 2017;8:101.
- [34] Michailidou Z, Carter RN, Marshall E, Sutherland HG, Brownstein DG, Owen E, et al. Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2008;22:3896–907.
- [35] Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2013;369:2115–25.
- [36] Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, et al. Three novel heterozygous point mutations of NR3C1 causing glucocorticoid resistance. *Hum Mutat* 2016;37:794–803.
- [37] Kino T, Gragerov A, Kopp JB, Stauber RH, Pavlakis GN, Chrousos GP. The HIV-1 virion-associated protein vpr is a coactivator of the human glucocorticoid receptor. *J Exp Med* 1999;189:51–62.
- [38] Vassiliadi D, Tsagarakis S. Unusual causes of Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007;51:1245–52.
- [39] Charmandari E, Ichijo T, Jubiz W, Baid S, Zachman K, Chrousos GP, et al. A novel point mutation in the amino terminal domain of the human glucocorticoid receptor (hGR) gene enhancing hGR-mediated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4963–8.
- [40] van Rossum EFC, Koper JW, Huizenga NATM, Uitterlinden AG, Janssen JAMJL, Brinkmann AO, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. *Diabetes* 2002;51:3128–34.
- [41] van Rossum EFC, Binder EB, Majer M, Koper JW, Ising M, Modell S, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biol Psychiatry* 2006;59:681–8.
- [42] Russcher H, Smit P, van den Akker ELT, van Rossum EFC, Brinkmann AO, de Jong FH, et al. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:5804–10.
- [43] Russcher H, van Rossum EFC, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SWJ, Koper JW. Increased expression of the glucocorticoid receptor. A translational isoform as a result of the ER22/23EK polymorphism. *Mol Endocrinol Baltim Md* 2005;19:1687–96.
- [44] van den Akker ELT, Russcher H, van Rossum EFC, Brinkmann AO, de Jong FH, Hokken A, et al. Glucocorticoid receptor polymorphism affects transpression but not transactivation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2800–3.
- [45] Buemann B, Vohl MC, Chagnon M, Chagnon YC, Gagnon J, Pérusse L, et al. Abdominal visceral fat is associated with a BclI restriction fragment length polymorphism at the glucocorticoid receptor gene locus. *Obes Res* 1997;5:186–92.
- [46] Rosmond R, Holm G. A 5-year follow-up study of 3 polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene in relation to obesity, hypertension, and diabetes. *J Cardiometab Syndr* 2008;3:132–5.
- [47] Spijker AT, van Rossum EFC. Glucocorticoid receptor polymorphisms in major depression. Focus on glucocorticoid sensitivity and neurocognitive functioning. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1179:199–215.
- [48] Damjanovic SS, Antic JA, Ilic BB, Cokic BB, Ivovic M, Ognjanovic SI, et al. Glucocorticoid receptor and molecular chaperones in the pathogenesis of adrenal incidentalomas: potential role of reduced sensitivity to glucocorticoids. *Mol Med Camb Mass* 2012;18:1456–65.
- [49] Boyle B, Korányi K, Patocs A, Liko I, Szappanos A, Bertalan R, et al. Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in graves ophthalmopathy. *Br J Ophthalmol* 2008;92:131–4.
- [50] Marti A, Ochoa MC, Sánchez-Villegas A, Martínez JA, Martínez-González MA, Hebebrand J, et al. Meta-analysis on the effect of the N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor gene (GRL) on human obesity. *BMC Med Genet* 2006;7:50.
- [51] Reimondo G, Chiodini I, Puglisi S, Pia A, Morelli V, Kastelan D, et al. Analysis of BCL1, N363S and ER22/23EK polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene in adrenal incidentalomas. *PLoS One* 2016;11 [e0162437].
- [52] Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, et al. Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2796–9.
- [53] van Oosten MJM, Dolhain RJEM, Koper JW, van Rossum EFC, Emonts M, Han KH, et al. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene that modulate glucocorticoid sensitivity are associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12 [R159].

ANNEXE 2 : Partial glucocorticoid resistance in the pathophysiology of adrenal cortex hyperplasia

Vitellius G & Lombès M

Current opinion Endo Metab Res, 2019



ELSEVIER

Reviews

Partial glucocorticoid resistance in the pathophysiology of adrenal cortex hyperplasia

Géraldine Vitellius^{1,2} and Marc Lombes^{1,3}

Abstract

The pathophysiology of bilateral adrenal hyperplasia remains obscure. Even though several genetic causes have been associated with this disease, often related to overactivation of the cyclic adenosine monophosphate signaling pathway, cortisol regulation by autocrine adrenal adrenocorticotropic hormone production has also been proposed to enhance corticosteroidogenesis, cortisol secretion, and adrenal cortex growth. Recently, heterozygous glucocorticoid receptor (GR) loss-of-function mutations have been discovered in patients with bilateral adrenal hyperplasia, highlighting a potential new genetic cause of adrenal hyperplasia, as previously reported in a mouse model of GR haploinsufficiency. However, the molecular mechanisms linking adrenal hyperplasia and GR haploinsufficiency need to be further elucidated.

Addresses

¹ INSERM UMR_S U1185, Fac Med Paris-Sud, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, F-94276, France

² Service d'Endocrinologie-Diabète-Nutrition, Hôpital Robert Debré, CHU Reims, F-51100, France

³ Service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction, Hôpitaux Universitaires Paris Sud, AH-HP, CHU Bicêtre, F-94275, Le Kremlin Bicêtre, France

Corresponding author: Lombes, Marc (marc.lombes@u-psud.fr)

Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 2019, 8:22–29

This review comes from a themed issue on **Adrenal Cortex**

Edited by **André Lacroix** and **Enzo Lalli**

For a complete overview see the [Issue](#) and the [Editorial](#)

Available online 5 July 2019

<https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.011>

2451-9650/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords

NR3C1, Glucocorticoid signaling, Adrenal incidentalomas, Glucocorticoid resistance.

Abbreviations

cAMP, cyclic adenosine monophosphate; ACTH, adrenocorticotropic hormone; AI, adrenal incidentaloma; BAH, bilateral adrenal hyperplasia; CAH, congenital adrenal hyperplasia; CRH, corticotropin releasing hormone; DXM, dexamethasone; DST, DXM suppression test; GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GR, Glucocorticoid receptor; PBMAH, primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia; PHRC, Hospital Clinical Research Program; PPNAD, primary pigmented nodular adrenal disease; PKA, protein kinase A; UFC, Urinary-free Cortisol.

Introduction

Morphological criteria to define adrenal hyperplasia remain scarce. Even though the prevalence of adrenal mass incidentally discovered during imaging or adrenal incidentaloma (AI) varies between 1 and 8% following autopsy studies, it seems to increase with age [1]. A large number of AIs are nowadays discovered and frequently referred to a clinical endocrinologist. Recent guidelines [2] define benign AI with strict radiological criteria [3]. Among AIs, 15% are bilateral but mainly nonfunctional [1]. Diagnosis of bilateral adrenal hyperplasia (BAH) may be considered easy. However, the definition of normal adrenal glands is still controversial. Initially, normal adrenal glands were defined as a right lateral and medial limb measurement at 2.8 cm, with the left medial limb at 3.3 cm and lateral at 3.0 cm [4]. More recently, adrenal volume assessed by computerized tomography was used to define normality [5]. Left adrenal gland volume was estimated at $4.5 \pm 1.6 \text{ cm}^3$, whereas the volume of the right adrenal gland was $3.8 \pm 1.3 \text{ cm}^3$. Volume measurements appear to be more reproducible among investigators compared with linear measurements. The association between BAH and steroid excess facilitates diagnosis and is important to recognize, given the potential increased morbidity and mortality. Hypercortisolism occurs in 12% of AI, whereas hyperaldosteronism and catecholamine excess is observed in 2.5% and in 7% of cases, respectively [2]. Metabolic disorders (glucose intolerance, diabetes, hypertension, dyslipidemia, and osteoporosis) can be associated with AI and subclinical hypercortisolism [2]. Malignancy was described in 3% of cases [1] and congenital adrenal hyperplasia in 21% [6]. A new nomenclature of BAH associated with Cushing syndrome was recently published [7]. When the nodule size is $< 1 \text{ cm}$, thus referring to micronodular adrenals, the main cause is primary pigmented nodular adrenal disease (PPNAD). However, if their size exceeds 1 cm, primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH) should be considered [8].

In this review, we will discuss the pathogenesis of BAH in the context of subclinical hypercortisolism, highlighting the recently discovered *NR3C1* mutations as recently discussed by Nicolaidis and Chrousos [9]. Adrenal pheochromocytomas or hyperaldosteronism, carcinoma, metastasis, or etiologies of unilateral AI were excluded.

Adrenal hyperplasia

Physiology of adrenal cortex

Cortisol release is under the control of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH). As illustrated in Figure 1, CRH stimulates corticotrope cells of the anterior pituitary, which secrete adrenocorticotropic hormone (ACTH). ACTH is one of the most potent physiological modulators of steroidogenesis and binds to its 7-transmembrane G protein-coupled receptor MC2R, expressed in all zones of the adrenal cortex. ACTH binding to MC2R, in association with melanocortin-2 receptors accessory proteins, activated Gs protein, followed by activation of adenylyl cyclase, enhancing intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) concentration (Figure 2), thus stimulating protein kinase A (PKA) signaling. PKA is a heterotetramer composed of 2 catalytic subunits, encoded by three different catalytic subunits of which C α predominates in the adrenal gland plus 2 regulatory subunits, encoded by four genes (R1 α , R1 β , R2 α , and R2 β) [10]. Binding of 4 cAMP molecules to PKA regulatory subunit dimers allows release and activation of the 2 PKA catalytic subunits, which phosphorylate several targets, such as cAMP response element binding protein or steroidogenic factor 1 (SF1), regulating steroidogenic acute regulatory protein (StAR) function. Phosphodiesterase, involved in cAMP degradation, acts as negative regulators of this pathway (see Figure 2).

StAR is the first step of steroidogenesis, involved in cholesterol flux into the inner mitochondrial membrane [11]. Cortisol, the final steroidogenic compound, exerts a negative feedback loop on hypothalamic CRH and pituitary ACTH (Figure 1).

ACTH also plays a major role in the vasculature development *via* local synthesis of VEGF and in adrenal tissue growth. ACTH may be locally produced by medullary chromaffin cells, thus playing a major autocrine/paracrine role in the adrenal gland [12]. Activation of cAMP/PKA signaling pathway may lead to hypercortisolism [13]. A functional link between PKA and Wnt pathways was reported, as demonstrated by a cell-specific PKA-activated downregulation of β -catenin phosphorylation in H295R cells [14].

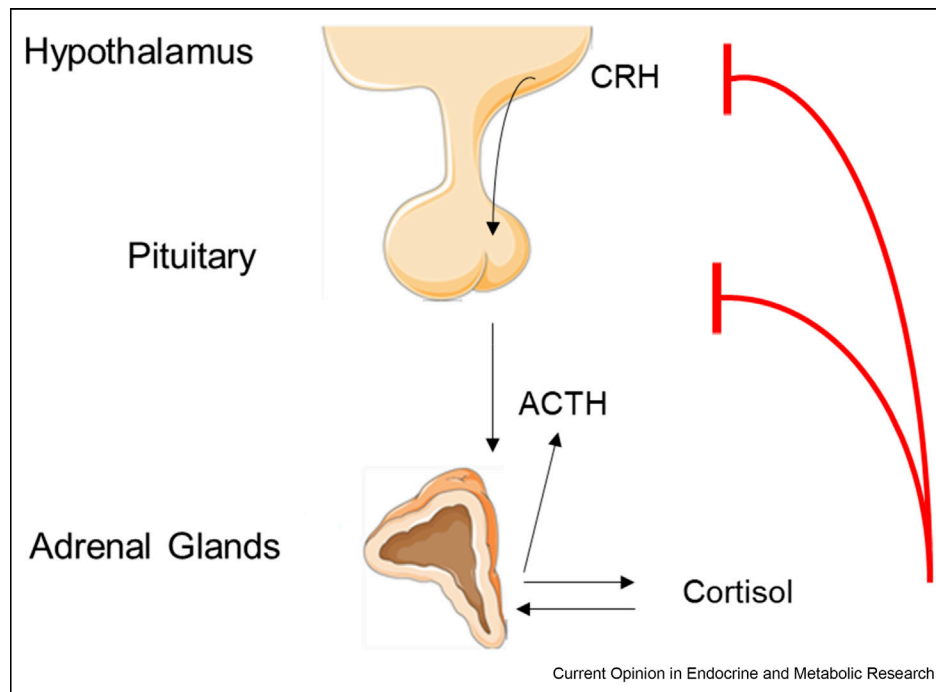
Genetic abnormalities

Every enzyme or protein involved in these pathways could be mutated and responsible for overactivation of signaling cascades resulting in hypercortisolism and adrenal hyperplasia (summarized in Table 1).

Primary pigmented nodular adrenal disease

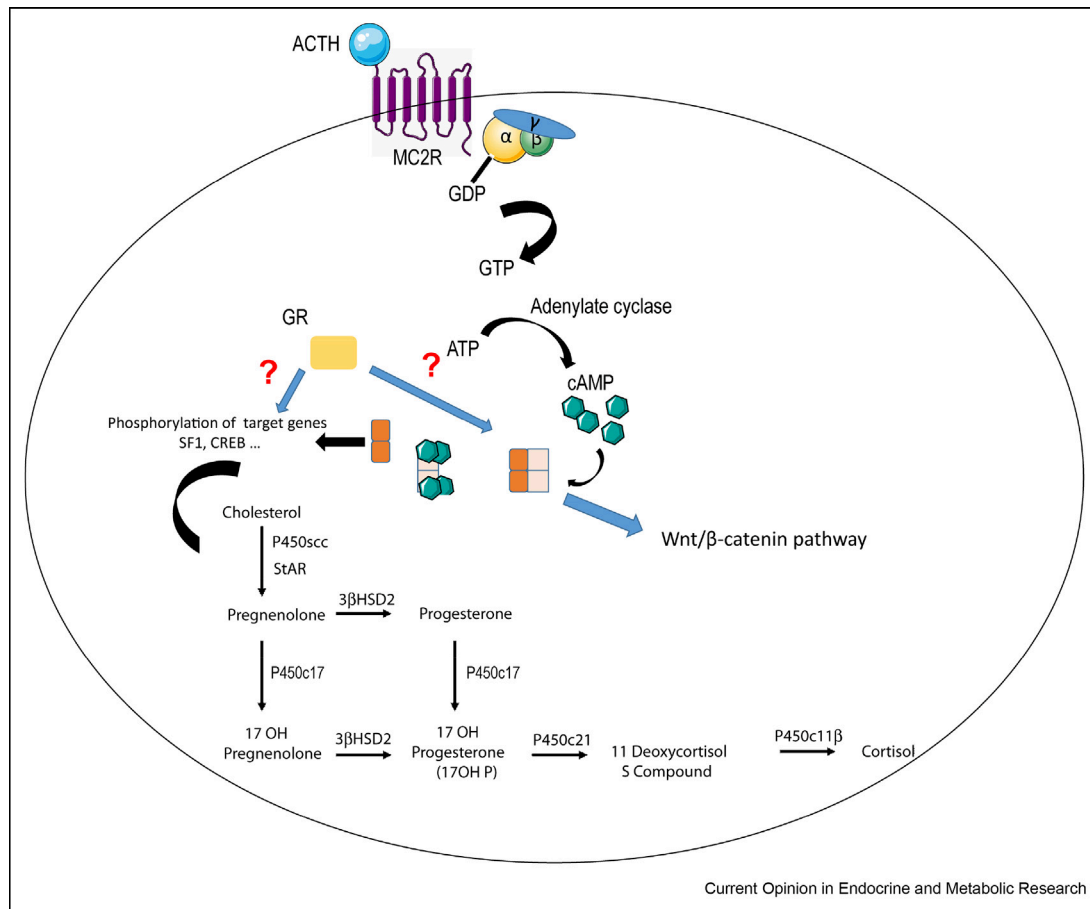
PPNAD, an autosomal dominant manner disorder, is often observed in patients with Carney complex. Seventy percent of index cases are familial, whereas the remaining cases are *de novo* germline mutations [15].

Figure 1



Hypothalamus–pituitary–adrenal gland axis. Cortisol release is under the control of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH). CRH stimulates secretion of pituitary adrenocorticotropic hormone (ACTH) which is responsible for the production of cortisol by the adrenal cortex. Paracrine/autocrine regulation of cortisol and ACTH secretion in adrenal glands has also been described [20,33]. Cortisol exerts a negative feedback loop on hypothalamic and pituitary cells.

Figure 2



Steroidogenesis in adrenal cells. ACTH binds its MC2R receptor and activates a cAMP pathway leading to PKA activation through release and activation of the 2 PKA catalytic subunits. Subsequent phosphorylation of several targets allows StAR activation. ACTH, adrenocorticotrophic hormone; PKA, protein kinase A; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; GR, glucocorticoid receptor; SF1, steroidogenic factor 1; CREB, cAMP-response element-binding protein.

One hundred and thirty-five pathogenic mutations have been reported to date. PPNAD is mainly related to germline inactivating mutations of the *PRKARIA* gene, associated with constitutive activation of PKA [16] or phosphodiesterases *PDE11A* and *PDE8B* mutations [17]. PPNAD can be associated with hypercortisolism leading to ACTH-independent Cushing syndrome. Of note, the glucocorticoid receptor (GR) was shown to be overexpressed in PPNAD nodules, underlying paradoxical dexamethasone (DXM) induction of cortisol secretion [18].

Primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia

Expression of illicit receptors in the adrenal glands (glucose-dependent insulinotropic polypeptide [GIP], Luteinizing hormone (LH)/Human chorionic gonadotropin (HGC), vasopressin, catecholamines, serotonin 5 HT, angiotensin II, or glucagon) was first identified as a leading cause of regulatory mechanism of cortisol

production in PBMAH. The prevalence of these illegitimate membrane receptors is rather high (up to 77–87% of cases), leading to cAMP/PKA pathway activation and enhanced corticosteroidogenesis [19]. Intra-adrenal ACTH secretion responsible for an autocrine/paracrine regulation in cortisol production was recently reported in PBMAH [20]. Activating MC2R mutations [19], or point mutations of the α subunit types of G proteins responsible for altered GTPase activity [21] leading to constitutive activation of the cAMP/PKA pathway, have been also described less frequently in PBMAH. Recently, a new tumor suppressor gene, inactivation of Armadillo repeat-containing family (ARMC5), was discovered after whole genome sequencing of 26 patients with corticotropin-independent macronodular hyperplasia [22]. ARMC5 was described in familial and sporadic forms of PBMAH, but the mechanism by which ARMC5 was responsible for hypercortisolism and adrenal hyperplasia remains unknown [23]. Recently, Lecoq

Table 1

Genetic alteration involved in adrenal hyperplasia.

	Gene	Bilateral adrenal hyperplasia
ACTH pathways	PRKAR1A	PPNAD
	PDE11A	PPNAD
	PDE8B	PPNAD and BAH
	MC2R	PBMAH
	GNAS	PBMAH
	ARMC5	PBMAH
	NEM 1	PBMAH
	FH	PBMAH
Steroidogenesis enzyme	StAR	Lipoid CAH
	CYP11A1 (P450 _{scc})	Lipoid CAH
	HSD3B2	CAH
	CYP17A1	CAH
	POR	CAH
GR pathways	CYP11B1	CAH
	CYP21A2	CAH
	NR3C1	BAH
	Chromosome 19q13 microduplication	BAH
Wnt/ β catenin pathway	CTNNB1	PBMAH
	APC	PBMAH

Genes involved in adrenal hyperplasia and corresponding altered signaling pathways.

ACTH, adrenocorticotrophic hormone; BAH, bilateral adrenal hyperplasia; CAH, congenital adrenal hyperplasia; GR, glucocorticoid receptor; PBMAH, primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia; PPNAD, primary pigmented nodular adrenal disease.

et al. [24] identified somatic duplications in the 19q13.32 chromosome region in three patients. These genetic rearrangements lead to a new genomic environment in which cis-regulatory regions, containing glucocorticoid response elements of the *ZMYND8* gene, drive ectopic expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) in two GIP-dependent cortisol secreting adenomas and one adrenal tumor with PBMAH. PBMAH was also described in genetic syndromes, as multiple endocrine neoplasia type 1, or APC syndrome [1].

Mutations of steroidogenesis players

Mutations of important players, either transporters (StAR) or enzymes (CYP11A1, HSD3B2, CYP17A1, POR, CYP11B1, and CYP21A2) involved in steroidogenesis, are responsible for adrenal hyperplasia associated with a cortisol secretion defect and high levels of ACTH.

Glucocorticoid resistance

Definition

Glucocorticoid hormones (including cortisol) regulate various biological functions involved in development, metabolism, inflammatory processes, and stress. Their

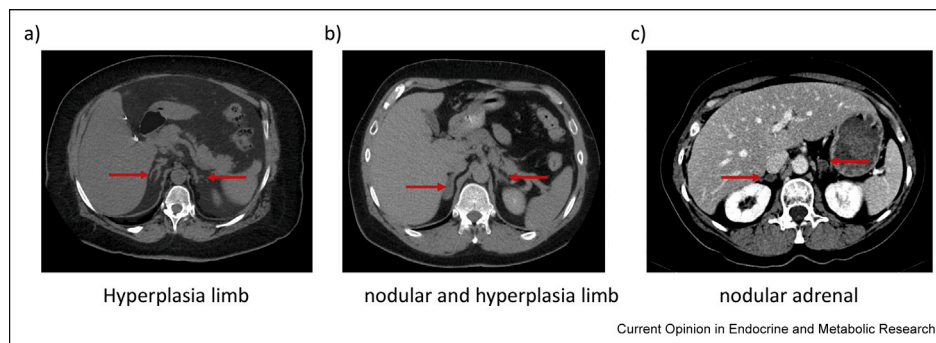
actions are mediated mainly by GR, a member of the nuclear receptor superfamily, which is an intracellular receptor protein acting as a ligand-activated transcription factor. Human GR (hGR) is encoded by the *NR3C1* gene (MIM # 138040). GR may exist in multiple isoforms generated by alternative splicing: hGR α , hGR β , hGR γ , hGR-A, and hGR-P. Eight alternative initiation sites into hGR α have been previously described [25,26], leading to distinct GR protein variants (GR α -A to D3). GR α -A results from translation of GR α mRNA from the first AUG codon (Met¹), while the shorter GR α -B results from translation beginning from the second AUG codon (Met²⁷). Even though numerous GR variants have been discovered by next-generation sequencing methods [27], only twenty-eight *NR3C1* loss-of-function mutations have been clearly associated with a glucocorticoid resistance syndrome (MIM # 615962) [28–30] while 30 index cases were studied [28–30]. Eight patients of 12, in whom an adrenal computerized tomography examination was performed, presented with BAH, bringing into question the role played by GR mutations and on the involvement of glucocorticoid resistance in the pathophysiology of adrenal hyperplasia.

Role of GR in adrenal cortex

The presence of GR in the normal adrenal gland remains controversial. Several authors reported a significant contribution of GR in the pathogenesis of hyperplastic glands [18,31]. Bourdeau et al. [18] demonstrated, by RT-qPCR and immunohistochemistry, that PPNAD cells and some PBMAH cells overexpress endogenous GR. Later, Louiset et al. [31] showed, using PPNAD cells, the involvement of GR in a paradoxical response to cortisol by measuring cortisol release by RIA in culture supernatants [31]. They demonstrated that DXM decreased cortisol production using a PKA inhibitor, indicating that DXM stimulates PKA catalytic subunits. The GR antagonist RU486 was found to decrease basal glucocorticoid production, suggesting that cortisol exerts an ultrashort positive feedback on its own production in PPNAD, *via* GR and supporting GR-dependent upregulation of PKA catalytic subunit genes [18].

More recently, our group demonstrated that GR directly impacts human adrenocortical H295R cell function by increasing key factors of steroidogenesis, including MC2R expression, as shown by pharmacological GR inhibition or RNA interference strategy [32]. Finally, the presence of GR was confirmed in normal human adrenal tissue by RT-PCR and Western Blot (WB) [33], while the GR α -D isoform, that had a reduced transcriptional activity compared with GR α -B, was reported in normal and adrenal cortex tumors [34]. Later, it was also demonstrated that an overexpression of GR variants, A3669G and *BclI* polymorphism, can be associated with AI. The *BclI* polymorphism was also overrepresented in patients with BAH [35]. To conclude, the involvement

Figure 3



Bilateral adrenal hyperplasia in patients with mutated GR. Examples of CT images in BAH patients: (a) left and right lateral and medial limb >5 mm without nodules (b) nodules and right and left lateral and medial limb >5 mm (c) adrenal macronodules >10 mm. GR, glucocorticoid receptor; CT, computerized tomography; BAH, bilateral adrenal hyperplasia. Red arrows indicate the localization of adrenal glands.

of GR in adrenal cortex and in the pathogenesis of different diseases with adrenal hyperplasia remains unclear, but its link with different signaling pathways in the adrenal cortex needs to be further elucidated. To address this issue, we recently used CRISPR/Cas 9 technology to introduce a GR loss-of-function mutation, previously functionally characterized [36], in human H295R cells.

BAH in patients with *NR3C1* mutations

The French National Hospital Clinical Research Program, Muta-GR, was launched to determine the prevalence of *NR3C1* mutations in a cohort of one hundred patients presenting with BAH, associated with high blood pressure and/or biological hypercortisolism without Cushing features (Figure 3). Forty patients had abnormal DXM suppression tests (plasma cortisol concentration remains >50 nmol/L) and high urinary free cortisol levels sometimes associated with unsuppressed ACTH levels. Five novel heterozygous *NR3C1* mutations were discovered; among which, three have been already functionally characterized [36,37], leading to the 5% prevalence of GR mutations. The phenotype of glucocorticoid-resistant patients was much milder than the initial description (Table 2) [38]. We recently unraveled the molecular mechanisms of defective GR-dependent regulation of 11 β -HSD2 in patients carrying GR loss-of-function mutations, associated with pseudohypermineralocorticoidism [39]. These findings emphasize the importance of GR genetic screening in selected patients enabling their appropriate management and optimized follow-up. Primary fibroblast cultures were obtained after skin biopsy in four mutated patients (R469X, R477S, R491X, Q501H GR mutations), and GR haploinsufficiency was further demonstrated by a reduced DXM induction of FKBP5 mRNA levels, consistent with glucocorticoid resistance observed in the mutated patients.

The study of the first heterozygous GR stop mutation, R469X, was very informative [37]. Indeed, among 8 mutated family members spanning three generations, four, including a 9-y-old child, had BAH, suggesting the involvement of GR haploinsufficiency in the pathogenesis of BAH.

However, the exact mechanisms by which GR haploinsufficiency could modulate adrenal hyperplasia remain

Table 2

Phenotype comparison between mutated GR patients described in the Muta-GR study [35] and the first mutated GR patient [38].

	Mutated patients of the Muta-GR study	First described patient	Normal range
Type of mutation	Heterozygous	Homozygous	
Age (Years)	53.2 \pm 7.7	58	
BMI (kg/m ²)	30.7 \pm 9.5	24.01	<25
SBP (mmHg)	123 \pm 4.5	190	<140
DBP (mmHg)	72 \pm 4.5	130	<90
Kalemia (mmol/L)	3.6 \pm 0.2	\	3.5–5
Aldosterone (pg/mL)	17.3 \pm 9.9	\	19–117
Renin (pg/mL)	47.2 \pm 92.6	Normal	3–16
Adrenal hyperplasia	Yes	No	
8-AM ACTH (pg/mL)	N	2.1N	<1
UFC (ULN)	1.7 \pm 0.65	30–40	<1
DST	–	–	

BMI, body mass index; SBP, systolic blood pressure; GR, glucocorticoid receptor; DBP, diastolic blood pressure; UFC, urinary free cortisol; DST, 1-mg dexamethasone suppression test; –, negative.

unknown. Up to now, it was proposed that ACTH overstimulation of the adrenal gland accounts for BAH in the context of GR loss-of-function mutations, supported by several human studies, including three heterozygous GR mutations associated with BAH and high ACTH levels [29,35,40]. This was also reminiscent of the homozygous *Nr3c1* gene inactivation in mouse models [41], in which 90% of these mice died 1–2 h postnatally, whereas an aberrant GR-binding site was recovered in different tissues of the 10% of mouse survivors despite overt glucocorticoid resistance [42]. An enlarged adrenal gland size and disorganized adrenocortical cells were reported in homozygous *GRKO* mice that presented with high corticosterone and ACTH levels, consistent with altered HPA regulation [41]. However, a heterozygous GR mouse model was recently published in which one functional GR allele, responsible for GR haploinsufficiency, also had enlarged adrenal glands [43] but normal ACTH levels, precluding an exclusive role of high circulating ACTH levels in the pathogenesis of adrenal hyperplasia.

Conclusion

Adrenal hyperplasia is often associated with over-activation of cAMP signaling pathways, related to well-characterized G protein-coupled receptor or other genetic alterations. Given that GR is expressed in the adrenal cortex and owing to the recent discovery of heterozygous GR mutations in BAH patients, it is likely that GR haploinsufficiency might affect adrenal function and proliferation. The molecular mechanisms involved remain to be elucidated. Genome editing technology may help unravel these issues.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Funding

G.V. is the recipient of a doctoral fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) and Paris-Sud University.

Acknowledgments

The authors would like to thank Pr. Brigitte Delemer (CHU Reims) who was a coprincipal investigator of the Muta-GR study. The authors thank Dr. Jérôme Bouligand and Dr Severine Trabado (Department of Molecular Genetics, Pharmacogenetics and Hormonology, CHU Bicêtre, France) for their implication in this project. G.V. is the recipient of a doctoral fellowship from the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM). The authors are also indebted to the clinical endocrinologists who referred the patients to our laboratory. The authors would like to address a very special thanks to the patients and their family and to Pr Michael DuBow (Institute for Integrative Biology of the Cell [I2BC], Université Paris Sud) for his careful editing of the manuscript for language.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- * of special interest
- ** of outstanding interest

1. Bourdeau I, El Ghorayeb N, Gagnon N, Lacroix A: **Management of endocrine disease: differential diagnosis, investigation and therapy of bilateral adrenal incidentalomas.** *Eur J Endocrinol* 2018, **179**:R57–R67, <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0296>.
2. 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**:G1–G34, <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0467>.
3. Sahdev A: **Recommendations for the management of adrenal incidentalomas: what is pertinent for radiologists?** *Br J Radiol* 2017, **90**:20160627, <https://doi.org/10.1259/bjr.20160627>.
4. Vincent JM, Morrison ID, Armstrong P, Reznick RH: **The size of normal adrenal glands on computed tomography.** *Clin Radiol* 1994, **49**:453–455.
5. Carsin-Vu A, Oubaya N, Mulé S, Janvier A, Delemer B, Soyer P, Hoeffel C: **MDCT linear and volumetric analysis of adrenal glands: normative data and multiparametric assessment.** *Eur Radiol* 2016, **26**:2494–2501, <https://doi.org/10.1007/s00330-015-4063-y>.
6. Patócs A, Tóth M, Barta C, Sasvári-Székely M, Varga I, Szűcs N, Jakab C, Gláz E, Rácz K: **Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas.** *Eur J Endocrinol* 2002, **147**:349–355.
7. Stratakis CA, Boikos SA: **Genetics of adrenal tumors associated with Cushing’s syndrome: a new classification for bilateral adrenocortical hyperplasias.** *Nature Clinical Practice. Endocrinol Metabol* 2007, **3**:748–757, <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0648>.
8. Bonnet-Serrano F, Bertherat J: **Genetics of tumors of the adrenal cortex.** *Endocr Relat Cancer* 2018, **25**:R131–R152, <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0361>.
9. Nicolaides NC, Chrousos GP: **Bilateral adrenal hyperplasia and NR3C1 mutations causing glucocorticoid resistance: is there an association?** *Eur J Endocrinol* 2018, **179**:C1–C4, <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0471>.
10. Weigand I, Ronchi CL, Rizk-Rabin M, Dalmazi GD, Wild V, Bathon K, Rubin B, Calebiro D, Beuschlein F, Bertherat J, Fassnacht M, Sbiera S: **Differential expression of the protein kinase A subunits in normal adrenal glands and adrenocortical adenomas.** *Sci Rep* 2017, **7**:49, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00125-8>.
11. Miller WL: **MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: rare defects in adrenal steroidogenesis.** *Eur J Endocrinol* 2018, **179**:R125–R141, <https://doi.org/10.1530/EJE-18-0279>.
12. Lefebvre H, Thomas M, Duparc C, Bertherat J, Louiset E: **Role of ACTH in the interactive/paracrine regulation of adrenal steroid secretion in physiological and pathophysiological conditions.** *Front Endocrinol* 2016, **7**:98, <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00098>.
13. Gallo-Payet N: **60 years of POMC: adrenal and extra-adrenal functions of ACTH.** *J Mol Endocrinol* 2016, **56**:T135–T156, <https://doi.org/10.1530/JME-15-0257>.
14. Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Tabbal H, Tauveron I, Lefrançois-Martinez AM, Pointud JC, 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**:12751, <https://doi.org/10.1038/ncomms12751>.

15. Tirosh A, Valdés N, Stratakis CA: **Genetics of micronodular adrenal hyperplasia and Carney complex.** *Presse Med* 2018, **47**:e127–e137, <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2018.07.005> (Paris, France: 1983).
16. Lefebvre H, Prévost G, Louiset E: **Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism.** *Eur J Endocrinol/Eur Fed Endocr Soc* 2013, **169**:R115–R138, <https://doi.org/10.1530/EJE-13-0308>.
- This article constitutes an exhaustive review of autocrine/paracrine actors of adrenal hyperplasia.
17. 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, Libé R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA: **A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia.** *Nat Genet* 2006, **38**:794–800, <https://doi.org/10.1038/ng1809>.
18. Bourdeau I, Lacroix A, Schürch W, Caron P, Antakly T, Stratakis CA: **Primary pigmented nodular adrenocortical disease: paradoxical responses of cortisol secretion to dexamethasone occur in vitro and are associated with increased expression of the glucocorticoid receptor.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**:3931–3937, <https://doi.org/10.1210/jc.2002-022001>.
19. Candida Barisson Villares Fragoso M, Pontes Cavalcante I, Meneses Ferreira A, Marinho de Paula Mariani B, & Ferini Pacicco Lotfi C. **Genetics of primary macronodular adrenal hyperplasia.** *Presse Med* (Paris, France: 1983) vol. 2018 47 e139–e149. (doi:10.1016/j.lpm.2018.07.002)
20. 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 JM, Anouar Y, Bertherat J, Lefebvre H: **Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia.** *N Engl J Med* 2013, **369**:2115–2125, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215245>.
- This article is the first demonstration of corticotropin production by hyperplastic adrenal tissues.
21. Fragoso MCBV, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MAA, Zerbin MCN, Lucon AM, Mendonca BB: **Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**:2147–2151, <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021362>.
22. 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, Bertherat J: **ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome.** *N Engl J Med* 2013, **369**:2105–2114, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304603>.
- This article is the first description of the involvement of the loss of heterozygosity of ARMC5 in PMAH.
23. Berthon A, Fauz FR, Espiard S, Drougat L, Bertherat J, Stratakis CA: **Age-dependent effects of Armc5 haploinsufficiency on adrenocortical function.** *Hum Mol Genet* 2017, **26**:3495–3507, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx235>.
- This article describes a model of ARMC5 haploinsufficiency providing support for the involvement of this gene in PMAH pathogenesis.
24. Lecoq AL, Stratakis CA, Viengchareun S, Chaligné R, Tosca L, Deméocq V, Hage M, Berthon A, Fauz FR, Hanna P, Boyer HG, 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, Herder W de, Louiset E, Lacroix A, Chanson P, Bouligand J, Kamenický P: **Adrenal GIPR expression and chromosome 19q13 micro-duplications in GIP-dependent Cushing's syndrome.** *JCI insight* 2017, **2**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.92184>.
- This article reports a potential mechanism responsible of GIPR expression in the adrenal cortex.
25. Yudit MR, Cidlowski JA: **Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor.** *Mol Endocrinol* 2001, **15**:1093–1103, <https://doi.org/10.1210/mend.15.7.0667> (Baltimore, Md.).
26. Lu NZ, Cidlowski JA: **Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes.** *Mol Cell* 2005, **18**:331–342, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.025>.
27. Foussier L, Vitellius G, Bouligand J, Amazit L, Bouvattier C, Young J, Trabado S, Lombès M: **Functional characterization of glucocorticoid receptor variants is required to avoid misinterpretation of NGS data.** *J Endocr Soc* 2019, **3**:865–881, <https://doi.org/10.1210/je.2019-00028>.
28. Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M: **Pathophysiology of glucocorticoid signaling.** *Ann Endocrinol* 2018, **79**:98–106, <https://doi.org/10.1016/j.ando.2018.03.001>.
29. Al Argan R, Saskin A, Yang JW, D'Agostino MD, Rivera J: **Glucocorticoid resistance syndrome caused by a novel NR3C1 point mutation.** *Endocr J* 2018, **65**:1139–1146, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ18-0135>.
30. Molnár Á, Kövesdi A, Szücs N, Tóth M, Igaz P, Rác K, Patócs A: **Polymorphisms of the GR and HSD11B1 genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease.** *Clin Endocrinol* 2016, **85**:180–188, <https://doi.org/10.1111/cen.13022>.
31. Louiset E, Stratakis CA, Perraudin V, Griffin KJ, Libé R, Cabrol S, Fève B, Young J, Groussin L, Bertherat J, Lefebvre H: **The paradoxical increase in cortisol secretion induced by dexamethasone in primary pigmented nodular adrenocortical disease involves a glucocorticoid receptor-mediated effect of dexamethasone on protein kinase A catalytic subunits.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**:2406–2413, <https://doi.org/10.1210/jc.2009-0031>.
32. Asser L, Hescot S, Viengchareun S, Delemer B, Trabado S, Lombès M: **Autocrine positive regulatory feedback of glucocorticoid secretion: glucocorticoid receptor directly impacts H295R human adrenocortical cell function.** *Mol Cell Endocrinol* 2014, **395**:1–9, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.07.012>.
- Inhibition of GR signaling by pharmacological GR antagonist or siRNA provides evidence for the involvement of GR in adrenal gland function.
33. Paust HJ, Loeper S, Else T, Bamberger AM, Papadopoulos G, Pankoke D, Saeger W, Bamberger CM: **Expression of the glucocorticoid receptor in the human adrenal cortex.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes: Off J, German Soc Endocrinol [and] German Diabetes Assoc* 2006, **114**:6–10, <https://doi.org/10.1055/s-2005-873007>.
34. Damjanovic SS, Antic JA, Ilic BB, Cokic BB, Ivovic M, Ognjanovic SI, Isailovic TV, Popovic BM, Bozic IB, Tatic S, Matic G, Todorovic VN, Paunovic I: **Glucocorticoid receptor and molecular chaperones in the pathogenesis of adrenal incidentalomas: potential role of reduced sensitivity to glucocorticoids.** *Mol Med* 2012, **18**:1456–1465, <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00261> (Cambridge, Mass.).
35. Vitellius G, Trabado S, Hoeffel C, Bouligand J, Bennet A, Castinetti F, Decoudier B, Guiochon-Mantel A, Lombès M, Delemer B, investigators of the MUTA-GR Study: **Significant prevalence of NR3C1 mutations in incidentally discovered bilateral adrenal hyperplasia: results of the French MUTA-GR Study.** *Eur J Endocrinol* 2018, **178**:411–423, <https://doi.org/10.1530/EJE-17-1071>.
- First report associating BAH and NR3C1 mutations.
36. Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Trabado S, Lombès M: **Three novel heterozygous point mutations of NR3C1 causing glucocorticoid resistance.** *Hum Mutat* 2016, **37**:794–803, <https://doi.org/10.1002/humu.23008>.
37. Bouligand J, Delemer B, Hecart AC, Meduri G, Viengchareun S, Amazit L, Trabado S, Fève B, Guiochon-Mantel A, Young J, Lombès M: **Familial glucocorticoid receptor haploinsufficiency by non-sense mediated mRNA decay, adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess.** *PLoS One* 2010, **5**:e13563, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013563>.
38. Vingerhoeds AC, Thijssen JH, Schwarz F: **Spontaneous hypercortisolism without Cushing's syndrome.** *J Clin*

Endocrinol Metab 1976, **43**:1128–1133, <https://doi.org/10.1210/jcem-43-5-1128>.

39. Vitellius G, Delemer B, Caron P, Chabre O, Bouligand J, Pussard E, Trabado S, Lombes M: **Impaired 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in glucocorticoid resistant patients.** *J Clin Endocrinol Metab* 2019, <https://doi.org/10.1210/jc.2019-00800>.

First description of alternative mechanism accounting for pseudohypoparathyroidism in glucocorticoid resistance syndrome.

40. Charmandari E, Kino T, Ichijo T, Jubiz W, Mejia L, Zachman K, Chrousos GP: **A novel point mutation in helix 11 of the ligand-binding domain of the human glucocorticoid receptor gene causing generalized glucocorticoid resistance.** *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92**:3986–3990, <https://doi.org/10.1210/jc.2006-2830>.
41. Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G: **Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene**

blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev* 1995, **9**:1608–1621.

42. Cole TJ, Myles K, Purton JF, Brereton PS, Solomon NM, Godfrey DI, Funder JW: **GRKO mice express an aberrant dexamethasone-binding glucocorticoid receptor, but are profoundly glucocorticoid resistant.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **173**:193–202.
43. Michailidou Z, Carter RN, Marshall E, Sutherland HG, Brownstein DG, Owen E, Cockett K, Kelly V, Ramage L, Al-Dujaili EaS, Ross M, Maraki I, Newton K, Holmes MC, Seckl JR, Morton NM, Kenyon CJ, Chapman KE: **Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet.** *FASEB J: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008, **22**:3896–3907, <https://doi.org/10.1096/fj.08-111914>.

This article reports the unique murine model of GR haploinsufficiency.

Titre : Implication du récepteur des glucocorticoïdes en physiopathologie humaine

Mots clés : Récepteur des glucocorticoïdes, mutations inactivatrices du GR, *NR3C1* pseudohyperaldostéronisme, hyperplasie bilatérale des surrénales, *HSD11B2*

Résumé : Les glucocorticoïdes (GC), généralement sécrétés par le cortex surrénalien, exercent de très nombreuses fonctions dans l'organisme, *via* leur liaison au récepteur des glucocorticoïdes (GR). Les rares mutations inactivatrices du GR déjà décrites, sont responsables d'un syndrome de résistance aux GC et peuvent conduire à une hypertension artérielle (HTA), une hyperplasie surrénalienne (HBS), un hirsutisme et une obésité. Dans ce travail, nous avons caractérisé fonctionnellement 13 variants hétérozygotes du GR (expression, transactivation, localisation subcellulaire,...). Six variants du GR, découverts par séquençage à haut débit (NGS) ne sont pas pathogènes alors que 7 mutations hétérozygotes originales délétères ont été identifiées dans le cadre du protocole hospitalier de recherche clinique (Muta-GR). Ce PHRC a permis de préciser une prévalence à 5% de mutations inactivatrices du GR dans une cohorte de 100 patients avec HBS associée à une HTA et/ou un hypercortisolisme biologique sans signe clinique de Cushing.

Une haploinsuffisance du GR, démontrée par la diminution d'induction par la dexaméthasone du gène cible FKBP5, a été mise en évidence dans les fibroblastes cutanés de certains patients porteurs de mutations inactivatrices du GR. Ces patients présentent souvent un hypercorticisme avec hypokaliémie, aldostérone et rénine basse, signant un pseudohyperaldostéronisme. Nous avons démontré que le gène *HSD11B2* codant pour l'enzyme 11 β -HSD2, assurant l'inactivation des GC, est une cible directe du GR comme démontré par transfection transitoire de gène-rapporteur, RT-qPCR, LC-MS/MS et ChIP. L'établissement des modèles de knock-in de mutations GR par stratégie CRISPR/Cas9 dans des lignées cellulaires préadipocytaires ou corticosurrénales humaines s'est soldé par un échec.

Ce travail devrait faciliter la sélection des patients chez qui la recherche de mutations inactivatrices du GR doit être faite et invite à un suivi régulier de ces patients.

Title : Involvement of the Glucocorticoid Receptor in human diseases

Keywords : Glucocorticoid receptor, *NR3C1*, GR loss-of-function mutation, pseudohypermineralocorticoidism, bilateral adrenal hyperplasia, *HSD11B2*

Abstract : Glucocorticoids (GC) regulate many essential biological functions by activating the glucocorticoid receptor (GR). GR loss-of-function mutations are responsible for GC resistance syndrome, often associated with high blood pressure, hirsutism, bilateral adrenal hyperplasia (BAH) and obesity. Herein, functional characterization of 13 GR variants is presented (expression and binding studies, transactivation assays, subcellular localization) 6 variants were discovered with next-generation sequencing and had no functional impact on GR signaling while 7 GR loss-of-function mutations were mainly discovered during the National Clinical Hospital Research Program, Muta-GR. This PHRC discloses a 5% prevalence of GR loss-of-function mutations in a cohort of 100 patients with BAH, biological hypercortisolism and/or hypertension without Cushing signs.

A GR haploinsufficiency was demonstrated by a reduced dexamethasone-induced FKBP5 expression in skin fibroblasts of some patients harbouring GR loss-of-function mutations. These patients often presented with hypercorticism, hypokalemia, low renin and aldosterone levels, consistent with a pseudohypermineralocorticoidism. We showed that *HSD11B2* encoding for the 11 β -HSD2 enzyme inactivating GC, is a direct GR target gene by transient transfection of reporter gene, RT-qPCR, LC-MS/MS and ChIP. We failed to introduce GR loss-of-function mutations in human preadipocytes and adrenocortical cells by Crispr/Cas 9 technology.

This work should facilitate selection of patients in whom GR mutation may be searched, enabling an appropriate follow-up.

