



HAL
open science

Implication des mastocytes et des voies de signalisation intra-cellulaire dans le développement des glandes surrénales humaines

Alexandre Naccache

► **To cite this version:**

Alexandre Naccache. Implication des mastocytes et des voies de signalisation intra-cellulaire dans le développement des glandes surrénales humaines. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR109 . tel-03346794

HAL Id: tel-03346794

<https://theses.hal.science/tel-03346794v1>

Submitted on 16 Sep 2021

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Implication des mastocytes et des voies de signalisation intra-cellulaire dans le développement des glandes surrénales humaines

Présentée et soutenue par

Alexandre NACCACHE

**Thèse soutenue publiquement le 24 Janvier 2020
devant le jury composé de**

Mme Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ	Professeur des Universités, Université de Clermont Auvergne	Rapporteuse
M. Pascal BOILEAU	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Versailles Saint Quentin	Rapporteur
Mme Laetitia MARTINERIE	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Paris Diderot	Examinatrice
M. Yves REZNIK	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Caen Normandie	Examineur
M. Hervé LEFEBVRE	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Rouen Normandie	Examineur
Mme Mireille CASTANET	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Rouen Normandie	Directrice de thèse

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



REMERCIEMENTS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Unité INSERM U1239, dirigé par le Dr Youssef ANOUAR que je remercie pour son accueil.

Madame le Pr Anne-Marie ANTOINE-MARTINEZ, vous me faites l'honneur d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur externe, je vous en suis fortement reconnaissant.

Monsieur le Pr Pascal BOILEAU, vous me faites l'honneur de juger mon travail de thèse en tant que rapporteur externe. Soyez assuré de mon profond respect.

Madame le Dr Laetitia MARTINERIE, je vous remercie vivement d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Monsieur le Pr Yves REZNIK, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Monsieur le Pr Hervé LEFEBVRE, je te suis très reconnaissant pour m'avoir accueilli dans ton équipe. Merci pour ton aide, ton encadrement, tes remarques constructives, et la transmission de ton savoir concernant la littérature scientifique « surrénales ». Ta bienveillance à mon égard a permis de me faire beaucoup progresser.

A ma directrice de thèse, Madame le Dr Mireille Castanet, merci de m'avoir ouvert au monde de la science, et de m'avoir communiqué ton enthousiasme pour le travail de recherche. Merci pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles et d'avoir essayé de me transmettre tes capacités à rebondir malgré des obstacles qui semblent parfois insurmontables. Merci de m'avoir encouragé pendant toutes ces années.

A ma co-encadrante, Madame le Dr Estelle Louiset, merci de m'avoir accueilli dans ce laboratoire de sciences, qui me paraissait si insolite les premiers temps. J'ai beaucoup appris à tes côtés sur la rigueur, la vision globale des problèmes, et la satisfaction d'un travail accompli jusqu'au bout. Les longues discussions scientifiques dans ton bureau ont toujours

été passionnantes et j'en garderai de très bons souvenirs. Merci pour m'avoir accompagné sur ce projet et m'avoir beaucoup soutenu sur les derniers mois.

Hadrien, merci de m'avoir accueilli aussi rapidement dans le labo, avec ta bonne humeur et ta spontanéité. Une vraie empathie émane de toi, même si ton énergie est parfois explosive ! Tu as été un exemple pour moi dans ta détermination farouche et ton endurance à toute épreuve dans les manip. Merci de m'avoir apporté ton soutien fidèle au cours de ce long parcours.

Julien, quel plaisir d'avoir été à tes cotés pendant ces années en sciences. Mentor aux idées toujours intéressantes même si quelques fois difficiles à suivre :). Tes connaissances dans des sujets éclectiques ont toujours été une source d'émerveillement pour moi. Merci pour ton soutien que je sais sincère.

Julie, arrivée après moi au labo, mais qui a fini sa thèse sciences avant moi ! Ces années passées avec toi ont permis d'alléger la charge de travail par ta vivacité et ton humour. Merci pour tous les chouettes moments passés à décompresser (et je m'en souviens de beaucoup !)

Alyson, tu n'as été au labo que pendant 2 ans, mais j'en garde un souvenir impérissable. Merci pour ta présence, tes fous rires, pour tes opinions tranchées, merci pour ton amitié. Nos moments partagés à la paillasse resteront des temps forts de ce labo.

Valentina, ta présence m'a donné goût à venir au labo pendant cette dernière année de thèse. Ton amitié m'a été très précieuse. Merci pour ta sincérité, ta spontanéité, ton accent italien pétillant, et les moments géniaux passés ensemble.

Antoine Guy, on ne s'est pas beaucoup vu au labo, mais, beaucoup plus en dehors, ce qui est encore mieux ! Tu es un très chouette type sur qui on peut vraiment compter pour n'importe quoi. Et surtout, tu es le maître pour arriver à relativiser et rester positif quoi qu'il arrive :).

Marion, merci d'avoir ajouté un brin de folie positive à cette équipe !

Sylvie, tu as apporté une présence maternelle à nous tous quand nous partageons le même bureau. Tu as le chic pour allier le travail dans la détente. Ta présence dans ce bureau apportait beaucoup de lien. Je pense à toi dans les moments difficiles.

Céline, merci pour tes aides ponctuelles mais précieuses dans les manip. Et, comme tant d'autres, je te suis aussi bien reconnaissant de fortement participer à la convivialité de cette équipe !

Michaël pour m'avoir apporté tes connaissances solides dans les manip d'immunohistochimie, et pour m'avoir permis de développer mon sens de l'esprit critique !

Huguette, ta présence et ta gentillesse m'ont manqué après ton départ à la retraite.

Zakariae, parti assez vite du labo, mais pour qui je garde une vraie amitié. Je te voyais en « grand » en tant que thésard de dernière année, mais, me voilà maintenant à ta place. Les années ont bien passées depuis ce temps.

Milène, merci de m'avoir aidé dans mes débuts au labo, de m'avoir épaulé, et enseigné l'immunohisto. J'ai beaucoup appris de ta façon de travailler, alliant gentillesse et une vraie efficacité aux manip !

Arnaud et Julie, je vous suis reconnaissant d'avoir été présents pour m'aider dans la gestion des souris, et planifier les manip avec une vraie volonté d'aider et de faire au mieux pour moi.

Elodie Colasse, merci d'avoir travaillé avec rapidité et efficacité pour m'aider dans ce projet, et de m'avoir toujours reçu à chaque fois avec une vraie gentillesse lors de mes passages en anapath.

Au Dr E. Lalli et à son équipe, IMPC UMR7275, merci de m'avoir chaleureusement accueilli dans votre laboratoire pendant ces 3 jours de formation.

Clémentine, merci de m'avoir beaucoup appris lors de mon passage dans le service des nourrissons. Il me reste encore beaucoup si je veux arriver à arriver à ton niveau. Merci pour ton sens de la convivialité qui est si important, et on ne te remercie pas assez pour tes efforts subtils mais appréciés pour rassembler les équipes. Merci de m'avoir permis de poursuivre ma thèse, merci de m'avoir soutenu pendant ces 2 années. Je n'y serais pas arrivé si tu ne m'avais pas accordé ton temps.

Edouard, merci d'avoir toujours été dispo pour me remplacer quand je devais aller au labo, toujours avec le sourire, avec une volonté sincère de m'aider sans jamais râler. Je suis conscient que j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme co-chef. Tu es le meilleur !

Merci à **Marie Claire** de m'avoir donné gout à la diabétologie pédiatrique. Je n'oublierai jamais tes enseignements portés par ta riche expérience. Merci pour ton amitié. Merci **Claire** et **Ariane** pour votre soutien en endocrinologie. Travailler avec vous est une vraie chance et j'apprends beaucoup à vos côtés.

Merci **Bérénice** et **Ingrid**. Le travail avec vous a toujours été des moments d'échange, et de travail en équipe constructif. Mais surtout, cela est un vrai plaisir de bosser avec vous.

A tous mes amis co-internes (Elsa, Maud, Shofi, Dodo, Florie) avec qui j'ai passé de bons moments au boulot et en dehors.

A mes parents, à qui je dois beaucoup, et pour qui je me rends compte de plus en plus avec le temps de leur valeur et de la chance que j'ai de les avoir.

A ma sœur, **Angélique**, toujours présente, attentive, et aidante, avec une force et une bonté intérieures qui forcent le respect. Je n'aurai pas voulu d'autre personne que toi comme sœur. **A Simon** et mes neveux, **James** et **Félix**, pour qui j'ai une tendre affection.

Au reste de ma famille, que je n'énumère pas ici, mais dont les liens forts et sincères qui nous lient restent très importants pour moi.

A **Karim**, ami proche présent à travers les années, qui me permet toujours de m'évader de la réalité parfois morose grâce à tes histoires d'attaque terrestre par des goa'uld menés par une femme aux lèvres pulpeuses et aux formes généreuses !

Aviva, Ali, Aurélie, Etienne, de vrais amis fidèles de longue date. Votre amitié est précieuse et j'apprécie énormément les moments où l'on se retrouve tous ensemble.

Cyndie et Julien, même si la distance nous éloigne un peu, vous comptez toujours beaucoup pour moi.

Tanguy, super ami malgré nos différences. J'ai adoré nos papotages réguliers sur toutes ces années.

RESUME DE LA THESE

La mise en place de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes au cours du développement fœtal chez l'homme reste un processus encore non totalement élucidé, que ce soit du point de vue de la chronologie d'expression des enzymes de la stéroïdogenèse ou bien des acteurs déterminant la production d'aldostérone en période péri-natale. Chez l'adulte, la sécrétion d'aldostérone est contrôlée majoritairement par des facteurs circulants tels que le système rénine angiotensine et le potassium. L'importance des mécanismes paracrines a été plus récemment démontré, impliquant différents acteurs, dont les mastocytes intra-surrénaux situés dans la région sous-capsulaire. En effet, les produits de sécrétion mastocytaire stimulent la production d'aldostérone par l'intermédiaire de la libération de sérotonine et de l'activation des récepteurs sérotoninergiques de type 4 présents à la surface des cellules stéroïdogènes. Cependant, le rôle des mastocytes et de la voie sérotoninergique dans le développement surrénalien n'a jamais été étudié.

Dans ce travail, nous montrons que les mastocytes colonisent la surrénale fœtale vers 18 semaines d'aménorrhée (SA) dans la zone définitive de façon conjointe à l'apparition des premières cellules exprimant la 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase. L'aldostérone synthase (CYP11B2) est détectée dans la même zone vers 24 SA, puis son expression augmente au cours du développement. De façon intéressante, nous mettons en évidence une densité mastocytaire ainsi qu'une expression de CYP11B2 plus importantes chez les fœtus comparés aux nouveau-nés de termes équivalents, suggérant l'implication des mastocytes dans le processus d'adaptation à la vie extra-utérine. Par ailleurs, nous rapportons une activation des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Shh au cours du développement surrénalien, qui ne semble pas contrôler la prolifération cellulaire. La voie Shh pourrait être associée à l'acquisition du phénotype stéroïdogène mature alors que la voie β -caténine qui est active antérieurement à l'expression de CYP11B2 ne semble pas suffisante pour initier la fonction minéralocorticoïde.

Globalement, ce travail montre la chronologie de la différenciation de la zone définitive surrénalienne au cours du développement et révèle pour la première fois la mise en place de système de régulation paracrine impliquée dans la production d'aldostérone en anté et post-natal.

Mots clefs : surrénale fœtale humaine, aldostérone, mastocyte, sérotonine, Sonic Hedgehog, β -caténine

ABSTRACT

Involvement of mast cells and intracellular signaling pathways in the development of the human adrenal glands

The establishment of the mineralocorticoid synthesis pathway during fetal development in humans remains a process that has not been fully elucidated, whether from the point of view of the chronology of expression of the enzymes of steroidogenesis or of the actors involved in the production of aldosterone in the peri-natal period. In adults, aldosterone secretion is mainly controlled by circulating factors such as the renin angiotensin system and potassium. The importance of paracrine mechanisms has more recently been demonstrated, involving different actors, like intra-adrenal mast cells located in the subcapsular region. Mast cell secretion stimulate the production of aldosterone through the release of serotonin and the activation of type 4 serotonergic receptors present on the surface of steroidogenic cells. However, the role of mast cells and the serotonin pathway in adrenal development has never been studied.

In this work, we show that mast cells colonize the fetal adrenal gland around 18 weeks of gestation (WG) in the definitive area in conjunction with the appearance of the first cells expressing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. Aldosterone synthase (CYP11B2) is detected in the same area around 24 weeks, and then its expression increases during development. Interestingly, we highlight a mast cell density as well as an expression of CYP11B2 higher in fetuses compared to newborns of equivalent terms, suggesting the involvement of mast cells in the process of adaptation to extra-uterine life. Furthermore, we report an activation of the Wnt/ β -catenin and Shh signaling pathways during adrenal development, which does not appear to control cell proliferation. The Shh pathway could be associated with the acquisition of the mature steroidogenic phenotype whereas the β -catenin pathway, which is active prior to the expression of CYP11B2, does not appear to be sufficient to initiate mineralocorticoid function.

Overall, this work shows the chronology of the differentiation of the definitive adrenal zone during development and reveals for the first time the establishment of the paracrine regulatory system involved in the production of aldosterone in the ante and postnatal period.

Keywords: human fetal adrenal, mast cells, serotonin, microenvironment, steroidogenesis, aldosterone, adaptation to extra-uterine life

TABLE DES MATIÈRES

ABREVIATIONS	14
TABLE DES FIGURES	18
INTRODUCTION	21
1 La glande surrénale	23
1.1 Anatomie - Histologie	23
1.2 Stéroïdogénèse surrénalienne	25
1.2.1 Apport et synthèse du cholestérol dans la cellule stéroïdogène	25
LDL et HDL cholestérol	26
Autre source de cholestérol	27
Stockage	27
1.2.2 Système enzymatique impliqué dans la stéroïdogénèse	28
Synthèse des glucocorticoïdes et des androgènes	28
Synthèse des minéralocorticoïdes	29
1.2.3 Rôle de l'aldostérone	30
Action rénale	30
Action extra-rénale	31
1.2.4 Mécanisme de régulation de l'aldostérone	32
Régulation par les facteurs circulants	32
A. Le système rénine-angiotensine	32
B. Potassium	35
C. ACTH	35
Régulation autocrine/paracrine	36
A. Le système rénine-angiotensine tissulaire surrénalien	36
B. Les cellules chromaffines	37
C. Les adipocytes	37
D. Les cellules vasculaires	38
E. Les cellules nerveuses	38
F. Les cellules du système immunitaire	39
1.3 Développement anténatal de la surrénale	40
1.3.1 Histologie fœtale	40
1.3.2 Différenciation fonctionnelle	43

Androgènes	43
Glucocorticoïdes	44
Minéralocorticoïdes	44
1.3.3 Facteurs impliqués dans le développement surrénalien	45
Facteurs hormonaux	45
Facteurs de transcription	45
Facteurs de croissance	47
2 Mécanismes impliqués dans la prolifération et la différenciation surrénalienne	48
2.1 Voie Shh	48
2.1.1 Description de la voie Shh	48
2.1.2 Rôle de la voie Shh dans la surrénale	50
Dans la surrénale de rongeurs	50
Dans la surrénale humaine	51
2.2 Voie Wnt/β-caténine	52
2.2.1 Description de la Voie Wnt	52
2.2.2 Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la surrénale	54
Dans la surrénale de rongeurs	54
Dans la surrénale humaine	55
3 Les mastocytes	56
3.1 Description et caractérisation	56
3.2 Sécrétions des mastocytes	57
3.2.1 Histamine	58
3.2.2 Héparine et chondroïtine sulfate	58
3.2.3 Protéases : tryptase, chymase et carboxypeptidase A	58
3.2.4 Sérotonine	59
3.2.5 Autres facteurs	60
3.3 Activation des mastocytes	60
3.4 Rôles des mastocytes	61
3.4.1 Rôles en physiologie	61
3.4.2 Rôles en pathologie tumorale	62
3.4.3 Mastocytes et surrénale normale	63
3.4.4 Mastocytes et surrénale tumorale	66
4 Les surrénales à la naissance : mécanismes d'adaptation à la vie extra-utérine	67
4.1 Homéostasie hydro-électrolytique	67

4.2	Transition anatomique de la surrénale	68
4.3	Fonction surrénalienne péri-natale	69
	OBJECTIFS	71
	RESULTATS	75
	Article 1 :	77
	Article 2 :	91
	Article 3 :	104
	DISCUSSION	121
1	Développement de la surrénale	123
2	Différenciation fonctionnelle de la zone définitive	125
2.1	Mise en place des acteurs impliqués dans la stéroïdogénèse	125
2.1.1	Transport du cholestérol	125
2.1.2	3 β HSD et CYP21	127
2.1.3	CYP11B2	127
2.1.4	17-OH et CYP11B1	128
2.2	Production d'aldostérone au cours du développement	128
3	Mise en place des fonctions minéralo- et glucocorticoïde	129
3.1	Acteurs impliqués dans la voie de synthèse des minéralocorticoïdes	129
3.1.1	Shh	130
3.1.2	β -caténine	130
3.1.3	DAB2	131
3.1.4	Récepteurs nucléaires orphelins NURR1 et NGFI-B	132
3.1.5	Mastocytes	134
3.1.6	Sérotonine	134
3.2	Absence de la voie de synthèse des glucocorticoïdes	135
4	Régulation de la synthèse et la sécrétion de l'aldostérone	135
4.1	Régulation au cours du développement	135
4.2	Régulation en période postnatale	140
5	Etude du rôle des mastocytes dans le développement surrénalien dans un modèle murin	143

CONCLUSION	149
BIBLIOGRAPHIE	153
ANNEXE	175

ABREVIATIONS

1,2,3..

11 β -HSD2 : 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

17 α -OH : 17 α -hydroxylase

17-OHP : 17-hydroxyprogestérone

21-OH : 21-hydroxylase

3 β HSD2 : 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2

5-HT : 5-hydroxytryptamine ou sérotonine

5-HTXR : récepteur sérotoninergique de type X

A

ACTH : *adrenocorticotropic hormone*, adrénocorticotrophine ou hormone corticotrope

AngII : angiotensine II

AMP(c) : adénosine monophosphate (cyclique)

APA : adénome producteur d'aldostérone

APC : *adenomatous polyposis coli*

AT1R : récepteur de l'angiotensine de type 1

AT2R : récepteur de l'angiotensine de type 2

C

CamKII : Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase

C-KIT : *tyrosine-protein kinase Kit* ou CD117

CREB : *cAMP-responsive element binding protein*

CRH : *corticotropin releasing hormone* ou corticolibérine

CTRP-3 : *c1q/TNF[tumor necrosis factor]-related protein-3*

CYP11B1 : 11 β -hydroxylase (11 β -OH)

CYP11B2 : aldostérone synthase

D

DAG : diacylglycérol

DAX1 : *DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1*

DHEA : déhydroépiandrostérone

E

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine I

EGF : *epidermal growth factor*

ENaC : *epithelial sodium channel*, canal sodique épithélial

ET-1 : endothéline

ET_A/ET_B : récepteur de l'endothéline de type A/B

F

FcεRI : *Fc epsilon RI*, récepteur des IgE de type 1 de forte affinité

FGF : *fibroblast growth factor*

G

GLI1/2/3 : *glioma-associated oncogene 1/2/3*

GSK3 : glycogène synthase kinase 3

H

HDL : *high-density lipoprotein*

HMG CoA réductase : hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase

I

IGF-I : *insulin-like growth factor I*

IGF-II : *insulin-like growth factor II*

IL-1: interleukine de type 1

IL-6 : interleukine de type 6

IP3 : inositol trisphosphate

L

LDL : *low-density lipoprotein*

LEF1 : *lymphoid enhancer-binding factor 1*

LH : *luteinizing hormone*, hormone lutéinisante

M

MC2-R : *melanocortin-2 receptor*, récepteur mélanocortine de type 2

MR : *mineralocorticoid receptor*, récepteur des minéralocorticoïdes

N

NANC : non-adrénergique non-cholinergique

NGFB : *neuronal growth factor-induced clone B*

NPY : neuropeptide Y

NURR1: *nuclear receptor related-1 protein*

P

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PKA : protéine kinase A

PLC : phospholipase C

POMC : proopiomélanocortine

PTCH1 : *patched 1*

R

ROMK : *renal outer medullary K⁺ channel 2*

RT-PCR : *real-time polymerase chain reaction*

S

SA : semaines d'aménorrhée

SCF : *stem cell factor*

SD : semaines de développement

SDHEA : sulfate de déhydroépiandrostérone

SF1 : *steroidogenic factor 1*

Shh : *sonic hedgehog*

Smo : *smoothened*

SNC : système nerveux central

SRA : système rénine-angiotensine

SR-B1 : *scavenger receptor class B1*

StAR : *steroidogenic acute regulatory (protein)*

SULT2A1 : sulfotransférase

T

TCF : *T-cell factor*

TGF β : *transforming growth factor β*

TNF α : *tumor necrosis factor α*

TPH1/TPH2: tryptophane hydroxylase de type 1/type 2

V

VIP : *vasoactive intestinal polypeptide*

Z

ZF : zone fasciculée

ZFo : zone foétale

ZG : zone glomérulée

ZR : zone réticulée

ZT : zone de transition

ZD : zone définitive

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie et histologie de la glande surrénale humaine.....	24
Figure 2 : Mécanismes d'importation et de stockage du cholestérol dans la cellule stéroïdogène corticosurrénalienne.....	27
Figure 3 : Schéma de la stéroïdogénèse surrénalienne chez l'Homme.....	29
Figure 4 : Action de l'aldostérone au niveau du néphron distal.....	31
Figure 5 : Système rénine angiotensine aldostérone.....	33
Figure 6 : Régulation de la production d'aldostérone dans la cellule stéroïdogène de la zone glomérulée.....	35
Figure 7 : Représentation schématique des facteurs de régulation paracrines impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone dans la surrénale humaine normale.....	40
Figure 8 : Origine embryologique de la surrénale fœtale.....	41
Figure 9 : Comparaison histologique des glandes surrénales humaines fœtale et adulte.....	42
Figure 10 : Description de la voie Sonic Hedgehog.....	49
Figure 11 : Description de la voie Wnt/ β -caténine.....	53
Figure 12 : Visualisation immunohistochimique des mastocytes à l'aide d'un anticorps anti-tryptase.....	56
Figure 13 : Rôles des mastocytes dans des processus physiologiques et physiopathologiques.....	63
Figure 14 : Contrôle paracrine de la production d'aldostérone par les mastocytes.....	65
Figure 15 : Frise chronologique récapitulative.....	126
Figure 16 : Distribution de DAB2 dans la surrénale fœtale humaine.....	133
Figure 17 : Expression du gène <i>POMC</i> dans la surrénale fœtale humaine.....	137

Figure 18 : Distribution de l'ACTH dans la surrénale fœtale et adulte humaine.....	139
Figure 19 : Développement de la surrénale fœtale murine.	143
Figure 20 : Comparaison des niveaux d'expression des gènes <i>Cyp11b2</i> , <i>Cyp11b1</i> et <i>Hsd3b1</i> entre le modèle <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> et le modèle sauvage entre E18 et P14.....	144
Figure 21 : Comparaison des niveaux d'expression du gène <i>Ren1</i> au niveau surrénalien et rénal et du gène <i>At1r</i> entre le modèle <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> et le modèle sauvage entre E18 et P14. .	145
Figure 22 : Comparaison des valeurs d'aldostérone et de corticostérone plasmatiques entre le modèle <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> et le modèle sauvage entre P0 et P7.	147

INTRODUCTION

1 La glande surrénale

1.1 Anatomie - Histologie

Les surrénales sont des glandes endocrines paires entourées d'une capsule fibreuse et situées au pôle supérieur des deux reins, dans l'espace rétropéritonéal. Elles mesurent chez l'adulte entre 4 et 5 cm de longueur, 2 à 4 cm de largeur, et moins de 1 cm d'épaisseur. Leur poids moyen est de 5-6 g.

Elles sont richement vascularisées par les artères surréaliennes qui prennent leur origine au niveau des branches de l'aorte, des artères phréniques et des artères rénales. Le réseau artériel est réparti uniformément à la surface de la glande, puis un réseau de capillaires infiltre l'ensemble des couches de la surrénale. Ce réseau vasculaire très dense permet une étroite communication entre les cellules endothéliales et les cellules stéroïdogènes, facilitant les échanges entre les deux types cellulaires. Le retour veineux est assuré par un réseau vasculaire qui converge vers la veine surréalienne centrale unique de gros diamètre. Le sang veineux se draine ensuite, pour la surrénale droite, dans la veine cave inférieure, et, pour la surrénale gauche, dans la veine rénale homolatérale. Les surrénales sont innervées à la fois par les systèmes sympathique et parasympathique.

Chaque surrénale est composée de deux zones distinctes : la corticosurrénale en périphérie et la médullosurrénale en profondeur (**Figure 1**).

La médullosurrénale ou medulla, constitue le centre de la surrénale. Elle dérive sur le plan embryonnaire du neuroectoderme (Sucheston and Cannon, 1968; Mesiano and Jaffe, 1997a). La médullosurrénale est composée de cellules chromaffines, responsables de la production des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui sont libérées dans la circulation sanguine en situation de stress physique et émotionnel avec principalement des effets tachycardisant et hypertenseur.

La corticosurrénale ou cortex surrénalien dérive du mésoderme. Le cortex est divisé en 3 zones concentriques, histologiquement et fonctionnellement distinctes, avec de la périphérie vers le centre : les zones glomérulée, fasciculée et réticulée.

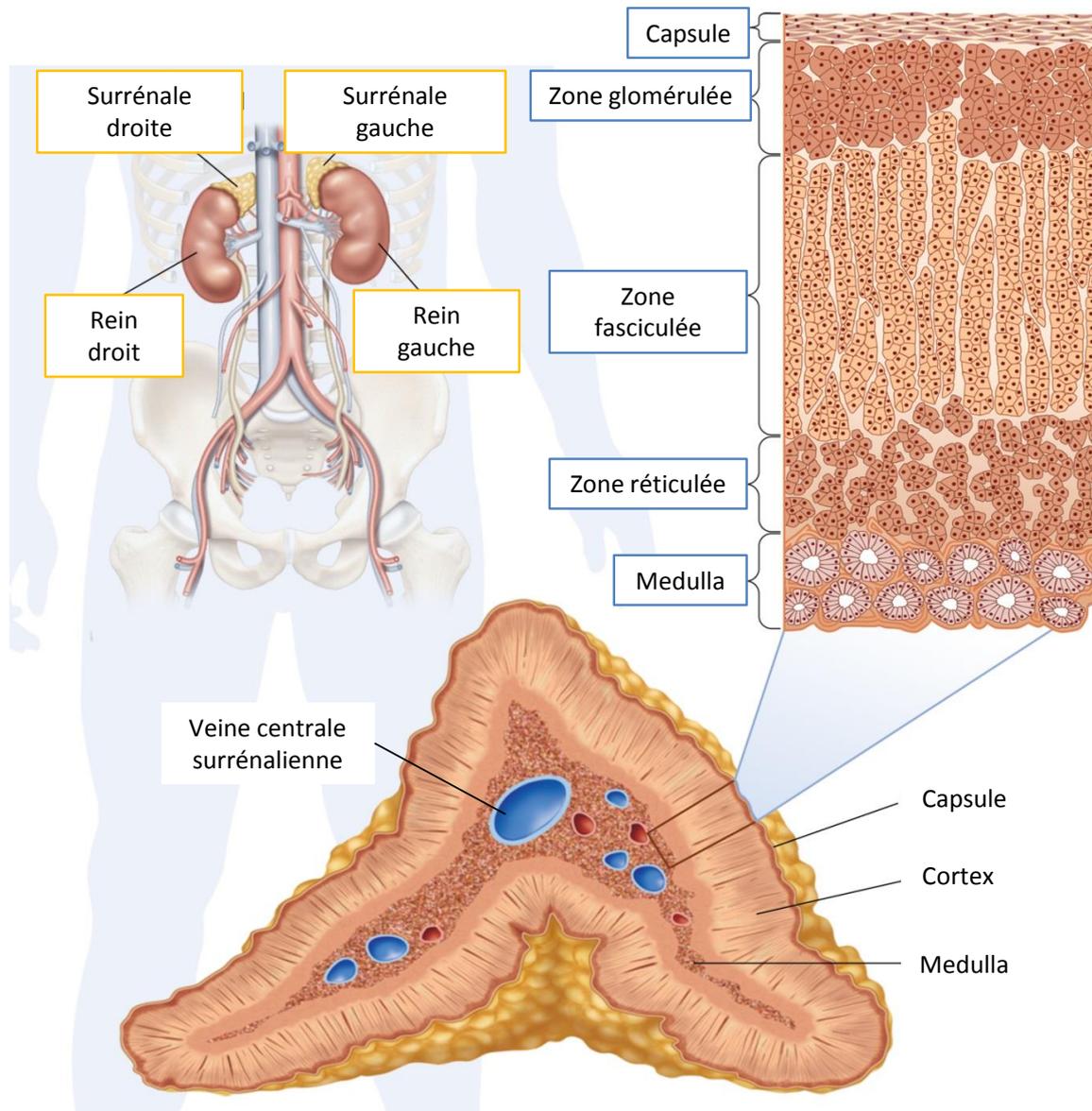


Figure 1 : Anatomie et histologie de la glande surrénale humaine.

La glande surrénale est composée de la medulla et du cortex, lui-même subdivisé en 3 zones : zones glomérulée, fasciculée et réticulée.

Image issue de Encyclopædia Britannica, Inc., 2010

La zone glomérulée, située sous la capsule, est peu épaisse et se compose de cellules de petites tailles au cytoplasme acidophile organisées en glomérules. Elle est le lieu de synthèse des minéralocorticoïdes, dont le principal membre est l'aldostérone. Cette hormone intervient dans le contrôle de la tension artérielle par l'intermédiaire de la régulation de l'homéostasie hydrosodée et de la volémie.

La zone fasciculée est la plus épaisse du cortex surrénalien. Elle est composée de longs cordons cellulaires parallèles, séparés par des travées de tissu conjonctif contenant des capillaires sanguins. Les cellules qui la composent ont un cytoplasme abondant, riche en vacuoles lipidiques. Ces cellules synthétisent les glucocorticoïdes dont le principal est le cortisol qui possède de multiples actions physiologiques (régulateur du métabolisme énergétique, effet hyperglycémiant, anti-inflammatoire, rôle dans l'adaptation au stress...).

La zone réticulée est la couche la plus interne du cortex. Elle est organisée en cordons cellulaires sans orientation particulière. Elle est le lieu de synthèse des androgènes surrénaliens, principalement la dihydroépiandrostérone (DHEA), son dérivé sulfaté (SDHEA), et l'androstènedione. Chez la femme, la surrénale représente une source importante d'androgènes. La DHEA et la SDHEA sont cependant principalement voués à être transformés en testostérone et œstradiol dans les gonades. Par ailleurs, les androgènes surrénaliens ont également une action paracrine sur la médullosurrénale, ou ils semblent impliqués dans la différenciation et la prolifération des cellules chromaffines (Sicard et al., 2007).

1.2 Stéroïdogénèse surrénalienne

La surrénale est le principal lieu de synthèse des stéroïdes. Le cholestérol est le précurseur commun à tous les stéroïdes. Tous les tissus ayant la capacité de convertir le cholestérol en prégnénolone à l'aide de l'enzyme cytochrome P450 *side chain cleavage* (P450_{sc}) ont la possibilité de produire des stéroïdes. Chez l'homme, de nombreux organes sont doués d'une activité stéroïdogénique : en plus du cortex surrénalien, on peut citer les cellules de Leydig des testicules, les cellules de la granulosa et les cellules thécales des ovaires, et les syncytiotrophoblastes du placenta. Il a été démontré de façon plus récente une activité stéroïdogénique dans d'autres localisations : au niveau du cerveau, des organes lymphoïdes, et de l'intestin. Les tissus reçoivent ainsi des stéroïdes localement dont l'action vient moduler celles des stéroïdes circulants (Taves et al., 2011; MacKenzie et al., 2012; Fokidis et al., 2015).

1.2.1 Apport et synthèse du cholestérol dans la cellule stéroïdogène

Les origines du cholestérol métabolisé dans les cellules stéroïdogènes sont multiples. Cependant, la synthèse des corticostéroïdes utilise principalement le cholestérol plasmatique, issu lui-même de l'alimentation et d'une production hépatique (**Figure 2**).

LDL et HDL cholestérol

Dans le sang, le cholestérol est lié aux lipoprotéines de haute densité, HDL (*High Density Lipoprotein*) ou faible densité, LDL (*Low Density Lipoprotein*). Les récepteurs de ces deux lipoprotéines sont présents à la surface membranaire des cellules stéroïdogènes surrénaliennes (Kraemer, 2007). L'entrée du LDL cholestérol dans la cellule stéroïdogène s'effectue après liaison avec le récepteur membranaire des LDL, qui est internalisé par endocytose une fois le complexe lipoprotéine/récepteur formé. Les récepteurs sont ensuite recyclés à la surface membranaire. Le récepteur HDL (ou SRB1, *Scavenger Receptor class B member 1*) n'est, quant à lui, pas internalisé après sa liaison avec les HDL (Acton et al., 1996).

L'importance relative des 2 types de récepteurs dans l'apport de cholestérol aux cellules stéroïdogènes reste discutée. Des études effectuées sur des cultures primaires de cellules stéroïdogènes ou la lignée de cellules corticosurrénaliennes humaines H295 ont conclu à une contribution majoritaire du LDL cholestérol (Martin et al., 1999; Liu et al., 2000). Les données cliniques sont plus nuancées. Ainsi, il a été observé chez un patient présentant un déficit complet en β lipoprotéines que l'absence de LDL n'avait pas d'impact sur la sécrétion de cortisol à l'état basal, mais entraînait en revanche un défaut de réponse au test de stimulation à l'ACTH (Illingworth et al., 1982), révélant l'importance du LDL dans la synthèse de stéroïdes en situation de stress. Il existe cependant des arguments en faveur de la contribution du cholestérol lié aux HDL à la stéroïdogénèse surrénalienne via le récepteur au HDL. En effet, Vergeer *et al.* ont ainsi observé une réduction de l'activité stéroïdogénique surrénalienne chez des individus porteurs d'une mutation inactivatrice du gène codant SRB1 (Vergeer et al., 2011). De plus, Bochem *et al.* ont montré que l'excrétion urinaire de 17-cétostéroïdes, témoins de l'activité stéroïdogène, était réduite d'environ 30 % chez des patients présentant des taux faibles de HDL cholestérol circulant (Bochem et al., 2013). Enfin, il faut ajouter que la contribution respective des lipoprotéines semble différente selon les espèces (Azhar and Reaven, 2002). Chez la souris, le HDL cholestérol serait une source majeure de cholestérol, comme en témoigne la diminution de 40-50% de l'activité stéroïdogène en cas d'altération du récepteur HDL (Hoekstra et al., 2009; Hoekstra and Van Eck, 2016).

Autre source de cholestérol

Le cholestérol nécessaire à la stéroïdogénèse peut également être d'origine endogène. Sa synthèse *de novo* dans le reticulum endoplasmique de la cellule stéroïdogène se fait à partir de l'acétate. L'HMG-Co réductase est l'enzyme limitante de cette synthèse.

Stockage

Le cholestérol est stocké dans des gouttelettes lipidiques cytosoliques sous forme d'esters. En fonction des besoins, les esters de cholestérol seront hydrolysés en cholestérol libre pour servir de précurseurs à la stéroïdogénèse surrénalienne (Hu et al., 2010).

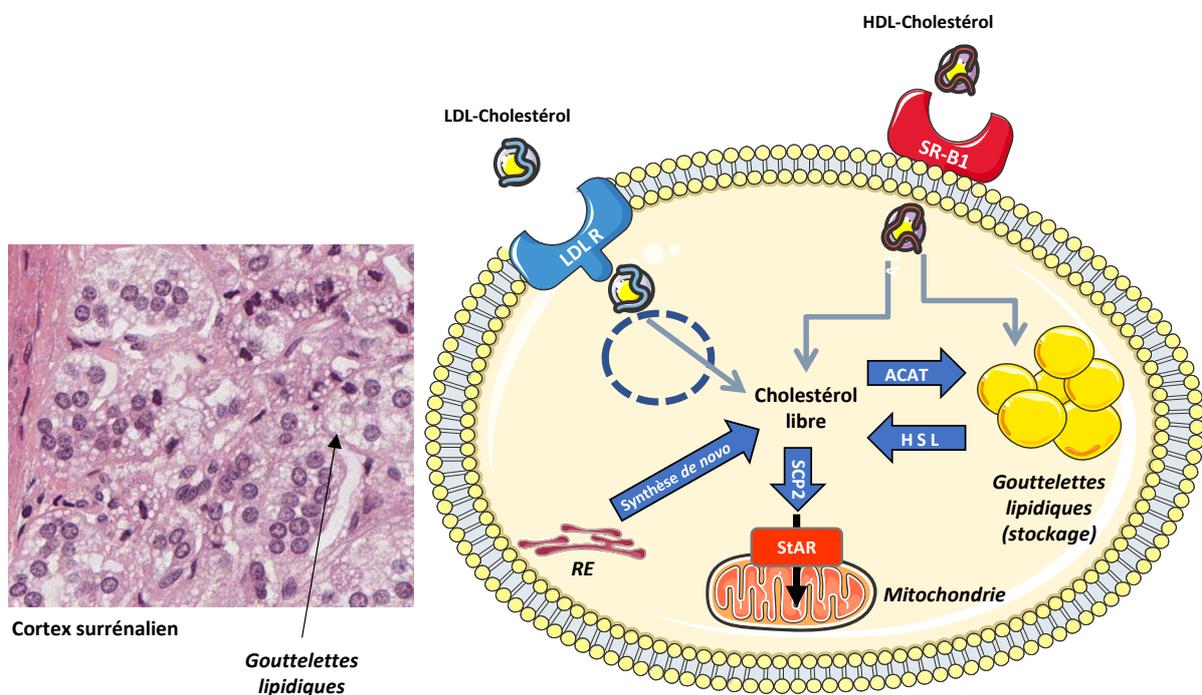


Figure 2 : Mécanismes d'importation et de stockage du cholestérol dans la cellule stéroïdogène corticosurrénalienne.

Le cholestérol provient majoritairement des HDL et des LDL importées respectivement par les récepteurs SR-B1 et LDL-R. Dans le cytoplasme, le cholestérol est estérifié pour être stocké sous forme de gouttelettes d'ester de cholestérol.

ACAT : acétyl-coA acétyl-transférase, HDL : *high density lipoproteins*, HSL : hormone sensitive-lipase, LDL : *low density lipoproteins*, RE : reticulum endoplasmique, SCP2 : *sterol carrier protein 2*, SR-B1 : *scavenger receptor B1*, StAR : *steroidogenic acute regulatory protein*

Image d'histologie surrénalienne provenant du *UT Southwestern Medical Center-Department of cell biology*

1.2.2 Système enzymatique impliqué dans la stéroïdogénèse

Au niveau des cellules du cortex surrénalien, le transfert du cholestérol libre du cytosol vers la membrane externe des mitochondries constitue la première étape commune à la synthèse de l'ensemble des stéroïdes. Il s'effectue grâce à la protéine de transport StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*) qui constitue un des facteurs limitant la biosynthèse des stéroïdes. Deux types d'enzymes sont impliquées dans la stéroïdogénèse : celles de la famille du cytochrome P450, et celles ayant une activité hydroxystéroïde déshydrogénase. Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines catalysant des réactions d'oxydation. Leur nom provient de leur forte absorbance à 450 nm en spectrophotométrie. Après l'internalisation du cholestérol dans la mitochondrie, le cholestérol est catabolisé par l'enzyme de clivage de la chaîne latérale (P450_{scc} codée par le gène *CYP11A1*) pour former la prégnénolone. Dans le reticulum endoplasmique, la prégnénolone est ensuite convertie en progestérone sous l'action de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 ou 3 β HSD2 (codée par le gène *HSD3B2*).

Par la suite, la spécificité d'expression enzymatique définit une voie de synthèse propre à chaque zone du cortex surrénalien (**Figure 3**).

Synthèse des glucocorticoïdes et des androgènes

La 17 α -hydroxylation oriente la synthèse des stéroïdes vers la voie de production des glucocorticoïdes et des androgènes surrénaliens. L'activité 17 α -hydroxylase (17 α -OH) de P450_{c17} (codée par le gène *CYP17A1*) présente dans les zones fasciculée et réticulée permet ainsi d'hydroxyler la progestérone et la prégnénolone en 17-hydroxyprogestérone et 17-hydroxyprégnénolone.

Par la suite, dans la zone fasciculée, la 17-hydroxyprogestérone est convertie en 11-désoxycorticostérol par l'action de la 21-hydroxylase (codée par le gène *CYP21A2*). Enfin, la 11-désoxycorticostérol est transformée en cortisol, principal glucocorticoïde, par l'action de la 11 β -hydroxylase (codée par le gène *CYP11B1*).

Dans la zone réticulée, l'activité 17,20 lyase de la 17 α -OH permet la production des androgènes surrénaliens : la déhydroépiandrostérone (DHEA), et de son dérivé sulfaté, la SDHEA, après action de la sulfotransférase.

Synthèse des minéralocorticoïdes

La zone glomérulée n'exprimant pas la 17 α -hydroxylase, la synthèse des stéroïdes est dans cette zone orientée vers la production des minéralocorticoïdes. Ainsi, la progestérone est tout d'abord doublement hydroxylée d'une part par l'action de la 21-hydroxylase en désoxycorticostérone puis par l'action de l'aldostérone synthase (codée par le gène *CYP11B2*) pour produire de la corticostérone. La corticostérone est transformée en aldostérone par une nouvelle étape d'hydroxylation, suivie d'une oxydation. Ces 2 dernières étapes de la synthèse d'aldostérone, principal minéralocorticoïde chez l'homme, sont également contrôlées par l'aldostérone synthase, exprimée uniquement au niveau de la zone glomérulée. Deux phases sont particulièrement cruciales pour la synthèse d'aldostérone car elles constituent des étapes limitantes de la chaîne de réactions enzymatiques : le transport du cholestérol à la mitochondrie sous le contrôle de l'expression et de la phosphorylation de StAR (Hattangady et al., 2012), et la transformation de la corticostérone en aldostérone sous le contrôle de *CYP11B2* (Curnow et al., 1991).

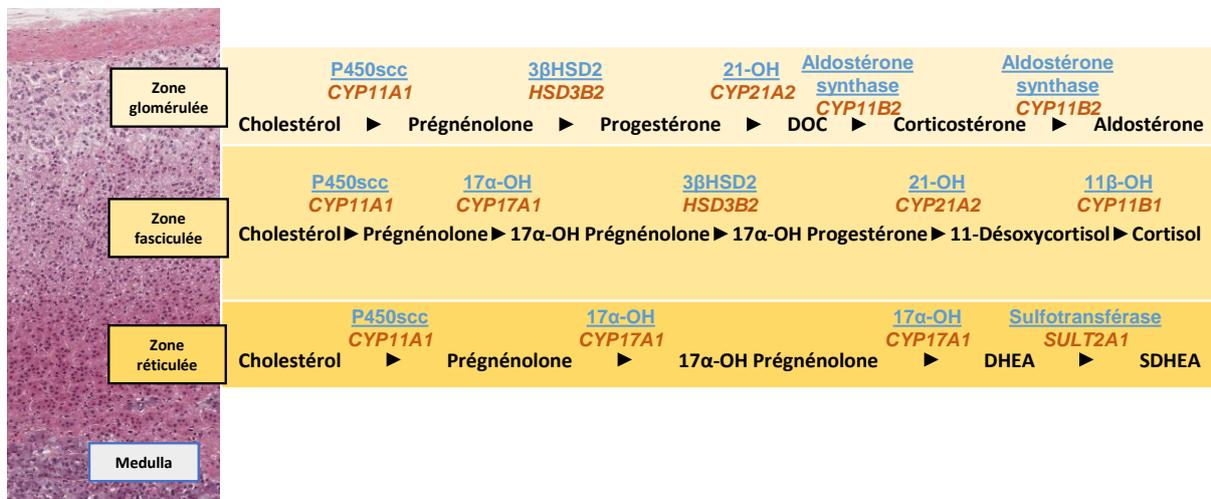


Figure 3 : Schéma de la stéroïdogénèse surrénalienne chez l'Homme.

Les noms des gènes sont indiqués en rouge et les enzymes correspondantes figurent en bleu. Image d'histologie surrénalienne provenant du *UT Southwestern Medical Center-Department of cell biology*

Les protéines *CYP11B1* et *CYP11B2* possèdent de fortes homologues de structure, en lien avec une concordance d'acides aminés de 93%. Ainsi, ces 2 enzymes sont capables d'hydroxyler la 11-désoxycorticostérone en corticostérone, bien que *CYP11B1* soit plus efficace (Schiffer et al., 2015). La localisation cellulaire précise de ces 2 enzymes n'a été évaluée que récemment,

avec le développement d'anticorps spécifiques. Les cellules exprimant CYP11B2 sont ainsi localisées dans la région sous capsulaire : soit regroupées en amas de cellules (ou *aldosterone-producing cell clusters*), soit plus éparses (Gomez-Sanchez et al., 2014). Des modifications histologiques de la distribution de CYP11B2 ont été observées en fonction de l'âge (Nanba et al., 2018). Ainsi, l'expression continue de CYP11B2 est visualisée dans des surrénales issues de sujets jeunes, alors qu'elle est préférentiellement sous forme d'amas de cellules chez des sujets plus âgés. Contrairement à ce qui était admis dans le passé, toutes les cellules de la zone glomérulée n'expriment pas CYP11B2 chez l'adulte. Les cellules produisant CYP11B1 sont localisées essentiellement dans la zone fasciculée, mais des cellules positives pour CYP11B1 ont également été détectées sous la capsule. Toutefois, il n'a jusqu'à présent jamais été visualisé de cellules co-exprimant les 2 enzymes.

1.2.3 Rôle de l'aldostérone

Action rénale

L'aldostérone, en stimulant la réabsorption de Na^+ et l'excrétion de K^+ au niveau du tube contourné distal et du tube collecteur, est déterminante pour l'adaptation de l'excrétion de Na^+ et K^+ à l'absorption alimentaire, participant ainsi à l'équilibre de la balance hydrosodée, et par ce biais, au contrôle de la pression artérielle. De plus, cette hormone permet de maintenir la kaliémie dans une marge assez étroite afin de préserver l'excitabilité des cellules cardiaques et neuromusculaires (Kovesdy et al., 2017).

L'aldostérone diffuse de manière passive à travers la membrane plasmique des cellules, et se fixe sur son récepteur cytosolique, le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR), qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires. A l'état basal, la liaison du récepteur aux protéines chaperones maintient le MR dans un état inactif. En se fixant sur son récepteur, l'aldostérone entraîne un changement de conformation du MR permettant la formation d'un complexe ligand-récepteur qui, après translocation dans le noyau, agit comme un facteur de transcription (**Figure 4**). Sa liaison à des promoteurs spécifiques régule l'expression de gènes cibles (Rogerson et al., 2004) codant pour des protéines impliquées dans le transport électrolytique, comme le canal sodique épithélial amiloride sensible (*Epithelial sodium channel* - ENaC) et la pompe Na/K-ATPase (Shibata, 2017). Le canal ENaC, situé à la membrane apicale des cellules épithéliales du tube contourné distal et du tube collecteur, permet le

transport facilité de Na^+ du pôle urinaire vers le pôle vasculaire, étape limitante de la réabsorption de Na^+ (Thomas and Itani, 2004). La pompe Na/K -ATPase est impliquée dans le transport actif à travers la membrane basolatérale vers l'interstitium et permet la sortie de 3 ions Na^+ contre l'entrée de 2 ions K^+ grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. D'autres gènes impliqués dans le transport électrolytique rénal sont également régulés par le complexe aldostérone-MR comme les canaux potassique *Renal Outer medullary K^+ channel 2* (ROMK) (Valinsky et al., 2018).

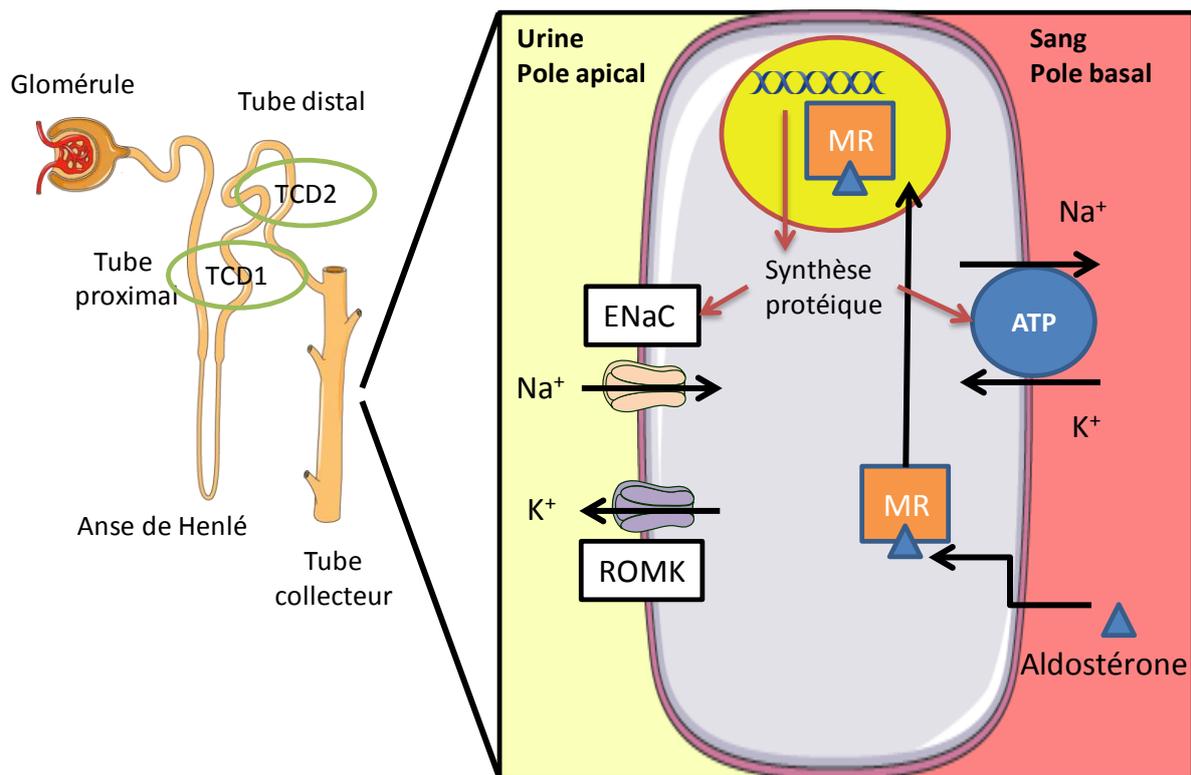


Figure 4 : Action de l'aldostérone au niveau du néphron distal.

L'aldostérone diffuse de façon passive dans la cellule du canal collecteur, où elle va se lier au récepteur des minéralocorticoïdes (MR). Après liaison avec l'aldostérone, le MR est transporté au niveau nucléaire, où il agit comme facteur de transcription de gènes comme le canal épithélial sodique (ENaC) et la pompe Na^+/K^+ ATPase. Le canal ENaC assure la réabsorption de sodium au pôle apical de la cellule tubulaire en échange de la sortie de potassium par le canal ROMK, et la pompe Na^+/K^+ ATPase au pôle basal permet la sortie de 3 ions Na^+ contre l'entrée de 2 ions K^+ .

MR : récepteur des minéralocorticoïdes, ENaC : *epithelial sodium channel*, ROMK : *renal outer medullary potassium channel*, TCD1 : tubule contourné distal précoce, TCD2 : tubule contourné distal tardif.

Adapté de Rossier et al., *Physiol Rev* 95: 297-340, 2015

Action extra-rénale

L'aldostérone possède également une action extra-rénale, en lien avec la présence du MR dans de nombreux organes. Ce récepteur est exprimé dans d'autres tissus épithéliaux, en

particulier dans le tractus gastro-intestinal où l'aldostérone participe à la réabsorption du sodium vers le secteur vasculaire par un mécanisme similaire à celui décrit dans le tubule rénal (Lienhard et al., 2012). D'autre part, le MR a également été identifié dans des tissus non épithéliaux, comme le système nerveux central, l'hypothalamus et le tronc cérébral, où il intervient dans la régulation centrale de la pression artérielle et de l'équilibre hydro-électrolytique (Gomez-Sanchez, 2011). De plus, le MR est présent au niveau cardio-vasculaire, dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, où son activation entraîne inflammation et fibrose qui participent au remodelage vasculaire (McCurley and Jaffe, 2012).

1.2.4 Mécanisme de régulation de l'aldostérone

Régulation par les facteurs circulants

La sécrétion d'aldostérone est régulée par 3 principaux facteurs circulants : l'angiotensine II, le potassium, et dans une moindre mesure, par l'hormone corticotrope (ACTH) (Williams, 2005).

A. Le système rénine angiotensine

Le système rénine-angiotensine (SRA) désigne une cascade de réactions enzymatiques de protéolyse, dont le substrat initial est l'**angiotensinogène**, peptide inactif sécrété par les hépatocytes. Cette protéine est clivée en angiotensine I par la rénine.

La **rénine** est sécrétée par les cellules juxta-glomérulaires rénales, cellules myoépithéliales endocrines, situées dans la média de l'artériole afférente du glomérule rénal au niveau du tubule contourné distal. La rénine, produite sous la forme d'une pré-prorénine inactive subit 2 étapes de maturation puis est stockée dans des granules de sécrétion.

La rénine active clive l'angiotensinogène en un autre peptide inactif, l'**angiotensine I**. Cette lyse constitue une étape limitante du SRAA. L'angiotensine I est ensuite clivée en **angiotensine II** (AngII) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), d'origine principalement pulmonaire (**Figure 5**). En parallèle de cette voie de synthèse classique, il existe d'autres enzymes capables de cliver l'angiotensine I, comme l' α -chymase, dont l'action pourrait être impliquée dans les SRA intra-tissulaires (Balcells et al., 1997; Lavoie and Sigmund, 2003).

La sécrétion de rénine est finement régulée par 2 principaux stimuli : 1) L'augmentation de la natriurèse au niveau du tube contourné distal, 2) la baisse de pression de perfusion de l'artère afférente glomérulaire. A l'inverse, l'angiotensine II, peptide le plus actif du SRA, diminue la sécrétion de rénine par le biais d'un rétrocontrôle négatif (Schnermann, 1998).

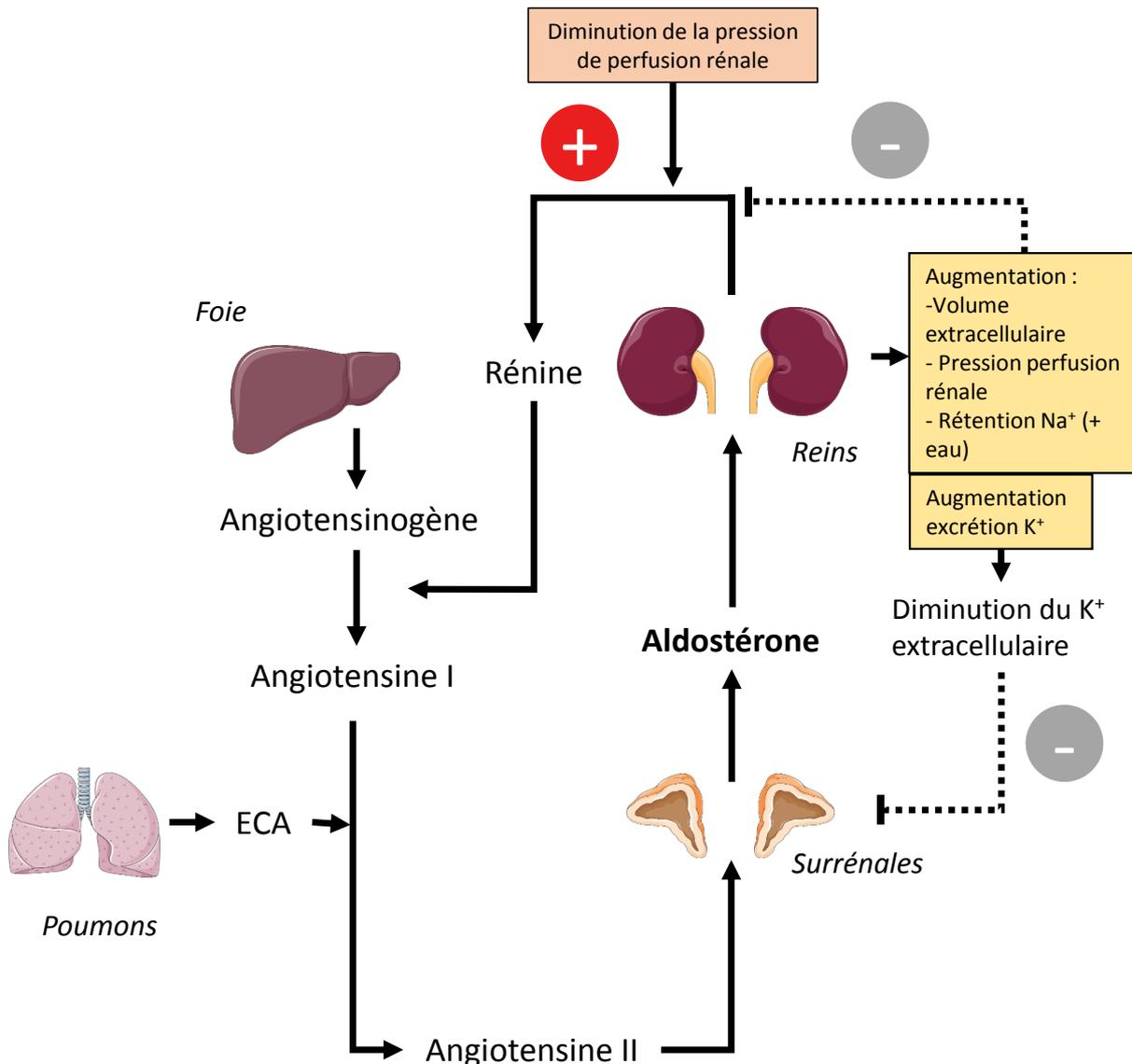


Figure 5 : Système rénine angiotensine aldostérone.

La rénine est sécrétée par l'appareil juxta-glomérulaire rénal en réponse à une baisse de pression de perfusion rénale. La rénine convertit l'angiotensinogène et angiotensine I, qui est elle-même clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II. L'angiotensine II stimule la synthèse surrénalienne d'aldostérone. Les effets physiologiques de l'aldostérone sont indiqués dans les vignettes jaunes.

L'AngII exerce ses effets en se liant à 2 récepteurs, AT1R et AT2R, qui appartiennent à la catégorie des récepteurs transmembranaires couplés à des protéines G. Leur expression

dépend du type cellulaire. Les 2 sous-types sont présents à la surface des cellules stéroïdogènes de la zone glomérulée (Tanabe et al., 1998) mais l'effet de AT1R a été plus largement étudié, car il est prépondérant dans la surrénale adulte (Breault et al., 1996). Au niveau du cortex surrénalien, la liaison de l'AngII au récepteur AT1R active différentes voies de signalisation, dont la phospholipase C, qui hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en 2 seconds messagers : l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG) (Barrett et al., 1989; Ganguly and Davis, 1994). L'IP3 entraîne une augmentation transitoire du calcium intracellulaire par le relargage des stocks intracellulaires de calcium contenus dans le réticulum endoplasmique. L'activation de AT1R entraîne également une dépolarisation membranaire par inhibition des canaux potassiques et de la pompe Na/K ATPase. La dépolarisation induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants responsable d'une entrée de Ca^{2+} d'origine extracellulaire.

L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium active des protéines kinases Ca^{2+} /calmoduline dépendantes (Pezzi et al., 1996; de Gasparo et al., 2000; Condon et al., 2002). A court terme, ces kinases sont responsables d'une phosphorylation de protéines, dont StAR ou certaines enzymes de la stéroïdogénèse, ce qui active la synthèse d'aldostérone (**Figure 6**). Les kinases ont également un effet positif à long terme en phosphorylant les facteurs de transcription contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse. En effet, ces kinases activent la transcription de gènes de la famille du *Neuronal growth factor-induced clone B* (NGFB). La fixation des membres de la famille de NGFB (NGFI-B, NURR1 et NOR1) au niveau des éléments de réponse (*response elements*) NGFB présents au sein du promoteur de *CYP11B2*, favorise la transcription du gène (Bassett et al., 2004). Les kinases participent également à la phosphorylation d'autres facteurs de transcription, comme ATF-1 et des protéines de liaisons aux *c-AMP response element binding protein* (CREB) (Cammarota et al., 2001; Spyroglou et al., 2009). L'action des membres de NGFB et des facteurs CREB auraient un effet synergétique sur la régulation de la transcription de *CYP11B2* (Nogueira and Rainey, 2010).

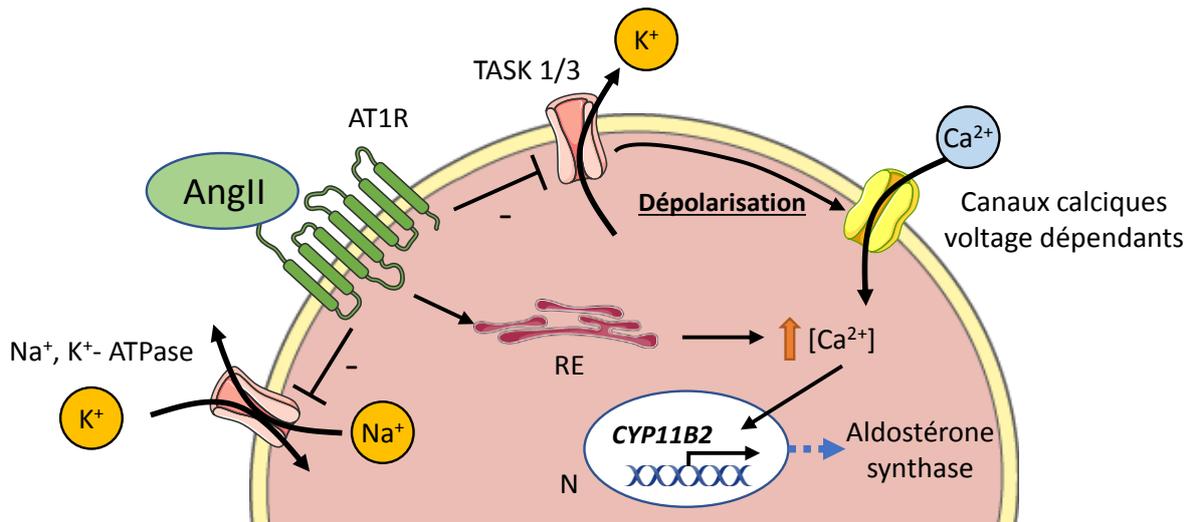


Figure 6 : Régulation de la production d'aldostérone dans la cellule stéroïdène de la zone glomérulée.

L'activation du récepteur AT1R par l'angiotensine II entraîne une dépolarisation de la membrane par inhibition des canaux potassiques et de la pompe Na^+/K^+ ATPase. La dépolarisation entraîne un influx de Ca^{2+} extra-cellulaire via l'activation des canaux Ca^{2+} voltage dépendants. De plus, elle entraîne le relargage de Ca^{2+} par le reticulum endoplasmique. L'augmentation du Ca^{2+} intra-cytosolique stimule l'expression du gène codant l'aldostérone synthase, enzyme qui catalyse les dernières étapes de synthèse de l'aldostérone.

AngII : Angiotensine II, AT1R : récepteur de l'angiotensine de type 1, RE : reticulum endoplasmique, TASK1/3 : canal potassique, N : noyau

Adapté de El Ghorayeb et al., Front. Endocrinol (Lausanne), 2016 Jun 27 ;7 :72

B. Potassium

Les cellules stéroïdènes de la zone glomérulée sont très sensibles aux variations de la kaliémie. Des fluctuations de 5 à 8% de la kaliémie suffisent à entraîner des modifications significatives des niveaux plasmatiques d'aldostérone (Himathongkam et al., 1975). De façon similaire à l'action de l'angiotensine II, l'augmentation de la concentration extracellulaire en K^+ dépolarise la membrane, ce qui induit une augmentation du flux calcique membranaire via l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. L'élévation de Ca^{2+} cytosolique qui en résulte stimule la stéroïdogénèse.

C. ACTH

L'hormone corticotrope, ou ACTH, est produite majoritairement par les cellules corticotropes de l'antéhypophyse. Cette hormone est générée par le clivage de la proopiomélanocortine (POMC) par des prohormones convertases. L'ACTH se lie à son récepteur spécifique, le récepteur de type 2 des mélanocortines (MC2R), qui fait partie de la famille des récepteurs à

7 domaines transmembranaires. L'activation du MC2R induit la production d'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase (de Jousineau et al., 2012). L'AMPc produit se lie à des domaines spécifiques de la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (PKA), ce qui permet la libération et l'activation de la sous-unité catalytique, qui phosphoryle et active StAR et les enzymes de la stéroïdogénèse. De plus, la PKA induit la transcription des gènes codant StAR et des enzymes de la stéroïdogénèse par l'intermédiaire de l'activation de facteurs de transcription de type CREB (Jo et al., 2005).

Le MC2R est exprimé par les cellules des zones glomérulée et fasciculée. Son activation régule majoritairement la sécrétion de cortisol, mais également celle d'aldostérone. L'effet de l'ACTH sur la sécrétion d'aldostérone est modeste et diffère en situation aiguë ou chronique. Ainsi, l'action de l'ACTH en aigu sur la sécrétion d'aldostérone passe par une augmentation de l'apport de cholestérol à la mitochondrie, notamment en stimulant l'expression de SRB1 et du récepteur LDL (Lehoux and Lefebvre, 1991; Shen et al., 2016). L'ACTH active également la transcription des gènes codant la 3 β HSD et la 21-OH, ce qui augmente la synthèse des précurseurs de l'aldostérone, mais n'a pas d'action directe sur l'expression de *CYP11B2* (Xing et al., 2010).

Régulation autocrine/paracrine

En marge de la régulation systémique classique, différents travaux menés *in vitro* ont montré que la synthèse des minéralocorticoïdes est également influencée par des facteurs paracrines (Figure 7).

A. Le système rénine-angiotensine tissulaire surrénalien

Au niveau surrénalien, Mulrow et Franco-Saenz ont rapporté la présence de transcrits des gènes codant la rénine, l'angiotensinogène et l'angiotensine II dans des cultures de cellules humaines (Mulrow, 1989; Racz et al., 1992; Mulrow and Franco-Saenz, 1996). La rénine a été également détectée par immunohistochimie dans des tissus surrénaliens (Naruse et al., 1983). Ainsi, l'ensemble des acteurs du SRA sont exprimés dans le cortex surrénalien, conduisant à la formation locale d'AngII (Ehrhart-Bornstein et al., 1998; Lalli et al., 2016). Cette sécrétion d'AngII interviendrait dans la régulation de la production d'aldostérone (Fallo et al., 1991; Hilbers et al., 1999). Le SRA surrénalien aurait une fonction de sensibilisation ou d'amplification du SRA circulant (Peters, 2012). L'action SRA local semble activé en

physiopathologie, notamment dans certaines néoplasies surrenaliennes associées à un hyperaldostéronisme (Oda et al., 2006; Lefebvre et al., 2013). Par ailleurs, chez les rongeurs, le premier site de production de la rénine en période fœtale est la surrenale, avec un transfert de la production au niveau rénal après la naissance, faisant émettre l'hypothèse d'une activation physiologique du SRA surrenalien quand le rein est immature (Kon et al., 1991). De plus, les effets du SRA sur la zone glomérulée sont également de type trophique et s'exercent au long cours. Leur rôle physiologique chez l'Homme est inconnu, mais il pourrait être responsable de la régulation de l'aldostérone indépendante du SRA.

B. Les cellules chromaffines

En plus de leur localisation classique dans la medulla, la présence d'ilots de cellules chromaffines exprimant la chromogranine A, marqueur neuro-endocrine, a été mise en évidence dans le cortex surrenalien, notamment dans la zone glomérulée (Bornstein et al., 1994). Il existe donc une proximité entre des cellules chromaffines et des cellules productrices d'aldostérone, suggérant une interaction directe entre ces 2 populations cellulaires. Les cellules chromaffines sont connues pour sécréter des catécholamines, dont l'adrénaline et la noradrénaline, mais elles sécrètent également une grande variété de neuropeptides, dont le VIP (*Vasoactive Intestinal Polypeptide*), le neuropeptide Y, les tachykinines, la vasopressine, la CRH, l'ACTH, qui pourraient potentiellement moduler la stéroïdogénèse (Bornstein et al., 1994; Nussdorfer, 1996; Ehrhart-Bornstein et al., 1998). Ces catécholamines et neuropeptides sont sécrétés en réponse à une stimulation splanchnique ou par des facteurs pro-inflammatoires suggérant une activation neuro-endocrine de la stéroïdogénèse en cas de stress ou de réponse inflammatoire. Des travaux ont démontré que les cellules chromaffines exercent globalement une action stimulante sur la corticostéroïdogénèse (Schinner and Bornstein, 2005; Haase et al., 2011). Des expériences menées *in vitro* sur des surrenales bovines n'ont pas retrouvé d'effet stimulant direct des catécholamines sur la synthèse d'aldostérone ; en revanche il a été rapporté que la noradrénaline activerait la sécrétion d'aldostérone dans des cultures de cellules surrenaliennes humaines (Neri et al., 1996).

C. Les adipocytes

La surrenale est entourée de tissu adipeux. Des adipocytes ont également été observés dans le cortex surrenalien humain au contact direct des cellules de la zone glomérulée (Ehrhart-

Bornstein et al., 2003). Un contrôle de la stéroïdogénèse par le tissu adipeux a été proposé devant la démonstration d'une augmentation de la synthèse d'aldostérone par les cellules de la lignée corticosurrénaliennne humaine H295R en présence de surnageant de culture adipocytaire (Schinner et al., 2007). Les facteurs adipocytaires impliqués sont partiellement connus. Ils incluraient différentes adipokines, telles que la leptine ou CTRP-3 (*C1q/TNF[*tumor necrosis factor*]-related protein-3*) (Jeon et al., 2008; Dinh Cat et al., 2016; Faulkner et al., 2018). De plus, les adipocytes expriment des acteurs du SRA, en particulier de l'angiotensinogène, qui pourraient participer à l'augmentation de la production de minéralocorticoïdes (Vogt et al., 2007).

D. Les cellules vasculaires

La vascularisation des glandes surrénales est très riche, permettant d'apporter des nutriments, du cholestérol et de l'oxygène nécessaires à la stéroïdogénèse dans les cellules corticosurrénales. Le débit sanguin surrénalien est donc un facteur déterminant de la libération d'hormones stéroïdes (Kanczkowski et al., 2016). De plus, la densité importante du réseau artériel rend possible des interactions étroites entre les cellules endothéliales et les cellules stéroïdogènes (Bassett and West, 1997; Sasano et al., 1998). Différents facteurs produits par les cellules endothéliales pourraient participer au contrôle paracrine de la stéroïdogénèse, comme l'interleukine 6, le monoxyde d'azote, et l'endothéline ET-1. Les endothélines stimulent la sécrétion d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée humaine en activant les récepteurs ETA et ETB, exprimés par les cellules stéroïdogènes (Mazzocchi et al., 1998; Rossi et al., 1999, 2001).

E. Les cellules nerveuses

L'innervation des surrénales est très dense, et un réseau complexe de ramifications nerveuses comprenant des fibres cholinergiques et adrénrgiques a été décrit dans la zone glomérulée (Gilchrist et al., 1993; McNicol et al., 1994). Des fibres du système NANC (Non-adrénrgique Non-cholinergique) ont également été mises en évidence au sein de la surrénale. Ces fibres contiennent différents neuromédiateurs : neuropeptide Y, peptide vasoactif intestinal (VIP), peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP), substance P (Li et al., 1999; Linnoila et al., 1980). La présence de nombreux renflements axonaux, sites de libération des neuromédiateurs, à proximité des cellules productrices d'aldostérone suggère un contrôle

nerveux de la production des minéralocorticoïdes (Heym et al., 1995). De plus, des études expérimentales menées *in vivo* chez le rat ont révélé que la substance P stimule la sécrétion d'aldostérone (Nussdorfer et al., 1988).

F. Les cellules du système immunitaire

Les cellules immunitaires interviennent également dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone. Ainsi, les macrophages qui infiltrent toutes les couches du cortex surrénalien, sont capables de sécréter des cytokines comme l'interleukine 1, l'interleukine 6 et le facteur de nécrose tumorale α (*tumor necrosis factor α* ; TNF α) (Bornstein et al., 2004). L'interleukine 6 pro-inflammatoire serait responsable d'une augmentation de la sécrétion d'aldostérone en condition basale et après stimulation par l'ACTH, alors que le TNF α aurait un effet inhibiteur sur les cellules bovines (Judd et al., 2000). Ces données suggèrent une modulation immuno-inflammatoire paracrine de la sécrétion des minéralocorticoïdes. L'implication des mastocytes, autres cellules du système immunitaire, dans la régulation des minéralocorticoïdes fera l'objet d'un chapitre plus complet dans la suite de l'introduction.

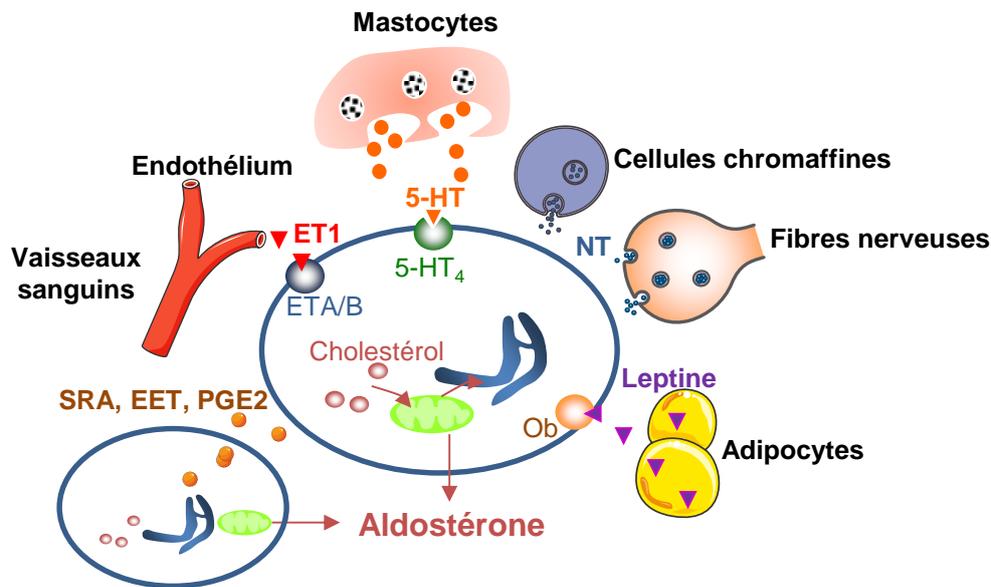


Figure 7 : Représentation schématique des facteurs de régulation paracrines impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone dans la surrénale humaine normale.

La synthèse d'aldostérone peut être influencée par des signaux bioactifs libérés par les mastocytes, les terminaisons nerveuses, les cellules chromaffines, les adipocytes, l'endothélium vasculaire et les cellules stéroïdogènes via un mécanisme paracrine.

La sérotonine (5-HT) relarguée par les mastocytes active le récepteur sérotoninergique de type 4 (5-HT₄R). Les neurotransmetteurs (NT), tels que les catécholamines et divers neuropeptides sont sécrétés par les terminaisons nerveuses. La leptine produite par les adipocytes se lie à son récepteur spécifique (Ob). L'endothéline 1 (ET-1), sécrétée par les cellules endothéliales, est capable d'activer les récepteurs ETA et ETB. Différents facteurs produits par les cellules stéroïdogènes, comme le système rénine angiotensine (SRA), l'acide époxyicosatriénoïque (EET), ou les prostaglandines E₂ (PGE₂) pourraient moduler la sécrétion d'aldostérone par un mécanisme autocrine.

D'après Lefebvre H. *et al.*, *Vitam Horm.* 2019;109:303-339

1.3 Développement anténatal de la surrénale

1.3.1 Histologie fœtale

Le cortex et la medulla surrénaliens ont des origines embryonnaires différentes. Les cellules qui forment le cortex sont originaires du mésoderme intermédiaire, alors que la medulla provient du neuro-ectoderme.

La formation du cortex fœtal est très précoce au cours du développement. Chez l'Homme, vers 4 semaines de développement, l'épithélium cœlomique se condense et prolifère pour former la crête uro-génitale, qui est à l'origine des gonades, des reins et des surrénales. Puis, le primordium adrénogonadique (qui aboutira à la formation des surrénales et des gonades) s'individualise de l'ébauche rénale, et secondairement, se scinde en primordium gonadique

et primordium surrénalien. Vers 8 semaines de développement, le primordium surrénalien se développe et 2 zones s'individualisent dans le cortex fœtal : la zone définitive (ZD) externe, et la zone fœtale (ZFo) interne (Mesiano and Jaffe, 1997a). Le cortex surrénalien est encapsulé par des cellules mésenchymateuses vers 9 semaines (**Figure 8**). La zone définitive est constituée d'une fine couche de cellules sous-capsulaires serrées de petite taille (10-20 μm) avec un cytoplasme de faible volume. La zone fœtale, qui représente 80% du volume du cortex surrénalien à ce stade, comporte des caractéristiques histologiques bien distinctes, avec des cellules éosinophiles plus espacées et de taille plus importante (20-50 μm). Ces cellules présentent de plus les caractéristiques classiques des cellules stéroïdogènes (richesse en gouttelettes lipidiques et en mitochondries à crêtes tubaires, reticulum endoplasmique développé).

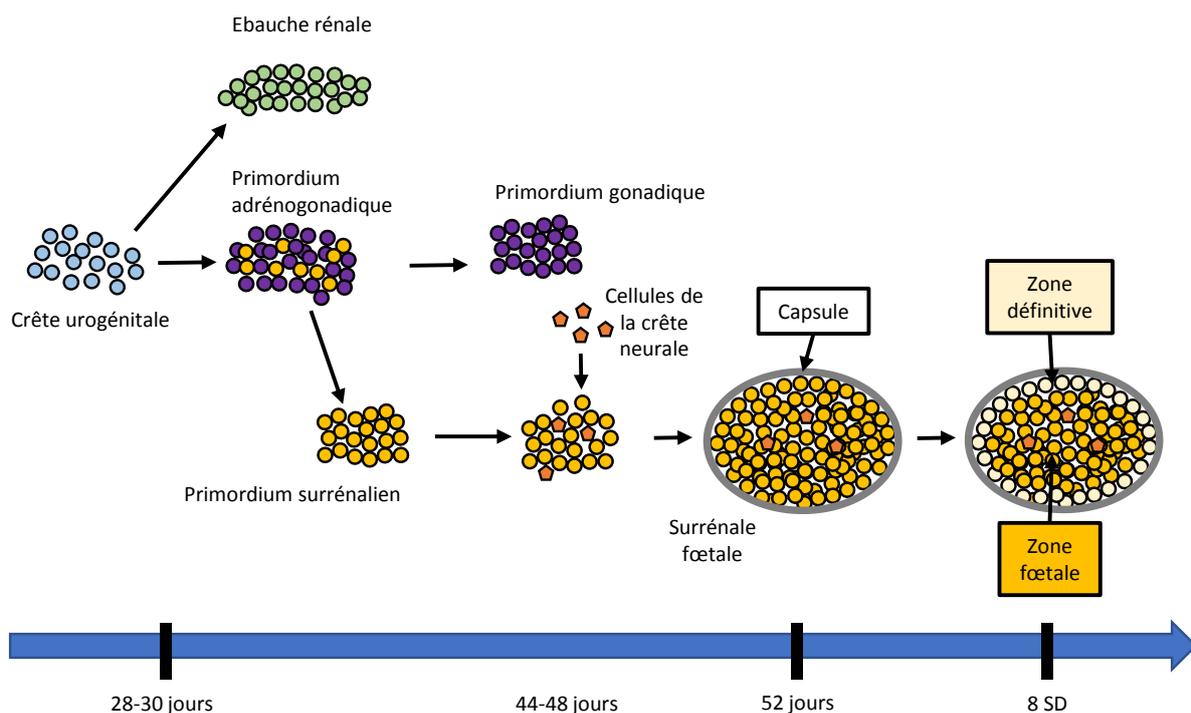


Figure 8 : Origine embryologique de la surrénale fœtale.

SD : semaines de développement

Au deuxième trimestre, une troisième zone appelée zone de transition (ZT), s'individualise entre la zone définitive et la zone fœtale. La ZT présente des caractéristiques intermédiaires, puisqu'elle est composée de cellules mixtes de morphologie similaire à la fois à celles des

cellules de la ZD et de la ZFo (Lalli, 2010). Cependant, la délimitation précise de cette zone n'est pas possible par des techniques d'histologie classique.

La médullo-surrénale dérive de cellules issues de la crête neurale dorso-lombaire qui colonisent le cortex surrénalien vers 6-7 semaines de développement sous forme d'îlots dispersés dans le cortex, puis ces îlots se regroupent autour de la veine centrale surrénalienne après la naissance pour former la medulla (**Figure 9**).

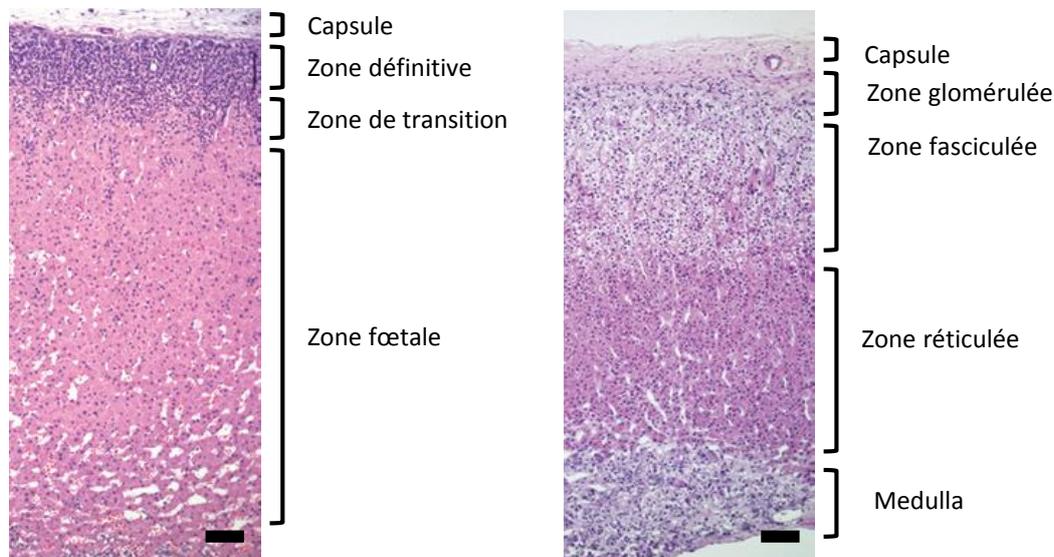


Figure 9 : Comparaison histologique des glandes surrénales humaines fœtale (à gauche) et adulte (à droite).

Barre d'échelle = 100 μ m.

D'après Monticone, S. et al. Nat. Rev. Endocrinol. 8, 2012

Pendant les trois premiers mois de la vie *in utero*, la surrénale subit une hypertrophie considérable, en particulier aux dépens de la zone fœtale. La surrénale fœtale est un organe dynamique dans lequel s'associent des processus de prolifération cellulaire et d'apoptose. L'hypothèse retenue actuellement est celle d'un modèle migratoire, avec une prolifération de cellules progénitrices au niveau sous-capsulaire, suivie d'une migration centripète des cellules associées à une différenciation, puis d'une apoptose cellulaire essentiellement localisée dans le compartiment interne. (Spencer et al., 1999). Entre 12 et 18 semaines de développement (SD), le poids de la surrénale est multipliée par 7, puis double entre 18 et 28 SD puis entre 28 et 36 SD (Mesiano and Jaffe, 1997a; Ishimoto and Jaffe, 2010). Ainsi, à mi-gestation, les

surrénales fœtales ont une taille équivalente à celles des reins fœtaux, et, à terme, ont un poids proche de celui des surrénales adultes. Il existe une bonne corrélation entre le volume des surrénales à l'échographie et l'âge gestationnel (Özgüner et al., 2012).

1.3.2 Différenciation fonctionnelle

Les 3 zones du cortex fœtal présentent des différences, tant sur le plan morphologique que sur le plan fonctionnel avec notamment une expression sélective des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse permettant une spécificité de synthèse hormonale dans chacune des zones. (Coulter and Jaffe, 1998; Narasaka et al., 2001). L'étude par immunohistochimie de l'expression de 2 enzymes clefs des différentes voies de la stéroïdogénèse (3 β HSD et 17 α -OH) a permis d'estimer la capacité fonctionnelle des 3 zones. La colocalisation des 2 enzymes signerait ainsi le lieu de synthèse de cortisol, la présence isolée de la 3 β HSD supposerait la synthèse d'aldostérone, et enfin, l'expression de la 17 α -OH isolée indiquerait la synthèse des androgènes. Toutefois, aucune étude n'a permis jusqu'à présent de préciser la localisation des enzymes CYP11B1 et CYP11B2, spécifiques de la synthèse des gluco et minéralocorticoïdes dans la surrénale en développement.

Androgènes

La zone fœtale ne possède pas l'enzyme 3 β HSD, mais présente une expression de la 17 α -OH précoce dès 6-8 SA, associée à l'expression de la sulfotransférase (SULT2A1), ce qui en fait le lieu de synthèse des androgènes surrénaux, essentiellement la DHEA et son dérivé sulfaté (hormones synthétisées dans la surrénale adulte dans la zone réticulée). La production d'androgènes en période fœtale est quantitativement importante, puisqu'elle atteint à terme des niveaux supérieurs à ceux détectés chez l'adulte (Rainey et al., 2004). Les androgènes surrénaux joueraient un rôle primordial dans la communication fœto-maternelle avec des interactions entre la surrénale et le foie du fœtus et le placenta. En effet, le SDHEA produit par la surrénale fœtale subit une hydroxylation par le foie, puis est transformé au niveau placentaire en estriol (par l'action conjointe de la 3 β HSD1, 17 β HSD1 et de l'aromatase) (Quinn et al., 2018). Les estrogènes ainsi synthétisés pourraient avoir un rôle dans la régulation de l'activité de la 3 β HSD surrénaux. De plus, l'aromatase des androgènes en œstradiol par le placenta serait impliquée dans le maintien de la grossesse, ainsi que dans le processus d'accouchement (Chamoux et al., 2005).

Glucocorticoïdes

La zone de transition, qui serait individualisée à partir de 21 SA, exprime la 3 β HSD et la 17 α -OH, 2 enzymes nécessaires à la synthèse de cortisol (Narasaka et al., 2001). Il existe une incertitude concernant la cinétique d'apparition de la 3 β HSD, puisqu'elle a été décrite dès 14 SA par Folligan *et al* (Folligan et al., 2005), alors que son expression transitoire a été rapportée par Goto *et al* de façon plus précoce, en lien avec une sécrétion de cortisol entre 6 et 8 SA (Goto, 2006). La production de cortisol, via le rétrocontrôle négatif qu'elle exerce sur l'ACTH, pourrait entraîner une freination de la production des androgènes surrénaliens dans la fenêtre de différenciation sexuelle qui s'effectue à partir de 8 SA. Ainsi, l'absence de production précoce de cortisol expliquerait la virilisation excessive des fœtus féminins porteurs d'un bloc en 21-hydroxylase, du fait de la sécrétion non contrôlée d'ACTH stimulant fortement la production d'androgènes surrénaliens (Asby et al., 2009).

Enfin, le cortisol fœtal est connu pour jouer un rôle essentiel dans l'homéostasie intra-utérine, notamment sur la maturation hépatique, pulmonaire, thyroïdienne et intestinale (Mesiano and Jaffe, 1997a).

Minéralocorticoïdes

La zone définitive n'exprime pas la 17 α -OH, et serait le lieu de synthèse de l'aldostérone à partir du cholestérol (équivalent de la zone glomérulée de la surrénale adulte). Toutefois, les données concernant la production d'aldostérone en période fœtale restent parcellaires. Aucune étude immunohistologique n'a été réalisée pour localiser l'aldostérone synthase au cours du développement. Des dosages de stéroïdes intra-surrénaliens par spectrométrie de masse réalisés chez des fœtus âgés de 9 à 20 SA n'ont pas permis de détecter la présence d'aldostérone (Johnston et al., 2018), ce qui suggère une sécrétion plutôt tardive de cette hormone. Les données plus spécifiques de la sécrétion périnatale d'aldostérone seront détaillées dans la suite de l'introduction.

Le rôle physiologique éventuel de l'aldostérone en période fœtale n'est pas connu. L'action du minéralocorticoïde ne semble pas nécessaire à la survie du fœtus car la régulation hydrosodée se fait essentiellement par le biais du placenta. Les nouveau-nés présentant un bloc en 21-hydroxylase, et donc un défaut de sécrétion d'aldostérone, ne présentent un tableau de perte de sel et de déshydratation qu'à partir de J8 de vie, suggérant l'intervention

d'autres mécanismes de régulation hydrosodée en période post-natale immédiate (Falhammar et al., 2015).

1.3.3 Facteurs impliqués dans le développement surrénalien

Les facteurs impliqués dans le développement morphologique et fonctionnel de la surrénale sont multiples : facteurs hormonaux, facteurs de transcription et facteurs de croissance.

Facteurs hormonaux

L'ACTH est un facteur majeur du développement du cortex surrénalien fœtal. Elle est sécrétée dès 8 SA par l'hypophyse fœtale, mais elle ne parait pas exercer d'effet trophique précoce. En effet, il a été rapporté une croissance surrénalienne normale entre 10 et 15 SA chez des fœtus anencéphaliques (Mesiano and Jaffe, 1997a). En revanche, chez les fœtus anencéphaliques plus âgés, une hypoplasie surrénalienne a été constatée aux dépens de la zone fœtale alors que la croissance de la zone définitive n'est pas impactée par l'absence d'ACTH. A l'inverse, il est mis en évidence d'authentiques hyperplasies surrénaliennes histologiques chez les patients présentant un déficit en 21-hydroxylase associé à une sécrétion excessive d'ACTH (Gozzi et al., 2005). L'effet trophique majoritaire de l'ACTH sur la zone fœtale est compatible avec une expression du MC2R plus forte dans cette région comparée à la zone définitive (Ishimoto, 2006).

A côté de l'ACTH, d'autres hormones telles que la LH (*Luteinizing Hormone*) hypophysaire et l'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) placentaire contribuent également au développement surrénalien.

Facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription ont également été impliqués dans le développement surrénalien fœtal ; les plus étudiés sont SF1 (*Steroidogenic Factor 1*) et DAX1 (*DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1*) (Lalli, 2010). Ces deux facteurs, membres de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, sont essentiels pour le développement normal de la surrénale.

SF1 est exprimé au niveau du cortex surrénalien, des gonades, de l'hypophyse et du noyau ventromédian de l'hypothalamus. L'activité de SF1 est modulée par des modifications post-

traductionnelles, comme la phosphorylation et la sumoylation (Hoivik et al., 2010). Les études moléculaires ont démontré que SF1 est déterminant dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse, par l'intermédiaire d'éléments de réponse à SF1 identifiés dans les régions promotrices des gènes codant respectivement le récepteur de l'ACTH, StAR, CYP17, HSD3B1, CYP21, CYP11B1 (Parker et al., 2002). L'expression du facteur SF1 est indispensable pour l'acquisition d'un phénotype cellulaire gonadique et surrénalien (Tanaka et al., 2007; Ruiz-Babot et al., 2018). Durant le développement, la protéine SF1 a été mise en évidence par immunohistochimie dès 33 jours post-conceptionnels au niveau du primordium adrénogonadique (Hanley et al., 1999). Le rôle crucial de SF1 dans le développement surrénalien a été démontré par les études menées chez la souris, comme en témoigne le décès à la naissance dans un contexte d'insuffisance surrénalienne aiguë des animaux dont le gène *Sf1* a été invalidé de façon homozygote. Ces animaux transgéniques présentent une agénésie des surrénales, des gonades et du noyau ventromédian de l'hypothalamus, ce qui atteste l'implication de SF1 dans le développement de ces organes (Luo et al., 1994; Sadovsky et al., 1995). Chez l'Homme, des mutations inactivatrices hétérozygotes ont été identifiées chez des sujets présentant des désordres du développement sexuel mais le plus souvent sans insuffisance surrénalienne associée (Suntharalingham et al., 2015). Les mutations à l'état homozygote chez l'homme n'ont pas été observées, suggérant le caractère létal d'une telle anomalie génétique.

DAX1 est un autre régulateur de la croissance surrénalienne. La distribution tissulaire de DAX1 est superposable à celle de SF1 (Ikeda et al., 1996). L'expression de DAX1 a été détectée concomitamment de celle de SF1, dès 33 jours post-conception, dans les zones définitive et fœtale de la surrénale (Hanley et al., 1999). La perte de fonction du gène codant DAX1 est responsable d'une hypoplasie surrénalienne congénitale liée à l'X, avec, sur le plan histologique une quasi absence de la zone définitive associée à une désorganisation de la zone fœtale, ce qui montre bien le rôle de ce gène durant le développement surrénalien (Lekawanvijit et al., 2011). Il est admis que DAX1 agisse comme inhibiteur de l'expression des gènes activés par d'autres facteurs de transcription (Lalli, 2014). Il existe des interactions fonctionnelles complexes entre DAX1 et SF1 : DAX1 est un répresseur des gènes cibles de SF1, comme StAR (Lalli and Alonso, 2010). Par ailleurs, DAX1 est capable d'inhiber l'activation transcriptionnelle médiée par SF1 (Kawabe et al., 1999; Babu et al., 2002).

Facteurs de croissance

Plusieurs facteurs de croissance jouent également un rôle dans le développement de la surrénale. On peut citer le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), l'IGF-I (*Insulin-like Growth Factor I*), l'IGF-II (*Insulin-like Growth Factor II*), et la famille des TGF β (*Transforming Growth Factor β*) (Mesiano and Jaffe, 1997b). Rainey *et al.* ont montré par exemple que le niveau d'expression du gène codant l'IGF-II est 25 fois plus élevé dans la surrénale fœtale comparée à l'adulte (Rainey et al., 2001). De plus, les expériences menées *in vitro* ont révélé que l'IGF-II stimule la prolifération des cellules stéroïdogènes et serait impliqué dans l'activation de la stéroïdogénèse médiée par l'ACTH (Mesiano et al., 1997). De façon intéressante, une réexpression forte du gène codant l'IGF-II est mise en évidence dans les adénocarcinomes surrénaliens, confortant son rôle dans la prolifération cellulaire surrénalienne (Angelousi et al., 2018).

Ainsi, la croissance et la différenciation des cellules stéroïdogènes sont donc soumises à un contrôle multifactoriel qui met en jeu des facteurs circulants. A ce jour, le rôle de l'environnement cellulaire, dont le rôle est bien établi dans la surrénale humaine adulte, n'a que très peu été étudié en période fœtale (Stankovic et al., 1994).

2 Mécanismes impliqués dans la prolifération et la différenciation surrénalienne

2.1 Voie Shh

De nombreuses études se sont intéressées à l'implication de la voie de signalisation Hedgehog au cours de l'embryogenèse, et, également dans la différenciation et la prolifération surrénalienne, en particulier chez les rongeurs.

2.1.1 Description de la voie Shh

L'activité de la voie Sonic Hedgehog est liée à la production et la sécrétion des ligands Hedgehog, composés de Sonic (Shh), Indian (Ihh) et Desert (Dhh). Ces ligands initient l'activation de la voie après leur liaison à leur récepteur Patched. Shh étant le ligand prépondérant exprimé au cours de l'embryogenèse, et le seul à être exprimé au niveau du cortex surrénalien, nous développerons uniquement la voie impliquant Shh dans ce mémoire.

La protéine Patched est un récepteur à 12 domaines transmembranaires spécifique des ligands Hedgehog. Patched est l'une des principales cibles transcriptionnelles de la signalisation Hedgehog, avec une induction de son expression lors de l'activation de la voie. Chez l'Homme, Patched est codée par les gènes *PTCH1* et *2*. La fonction de *PTCH2* reste indéterminée car son expression est très limitée. Patched 1 est donc le récepteur qui entraîne l'activation de la voie après liaison du ligand Shh.

La protéine Smoothened (Smo), qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, est responsable de la transmission intracellulaire du signal Hedgehog (Stone et al., 1996). En effet, Smo est constitutivement inhibé par Patched en l'absence de ligand Hedgehog, alors que cette inhibition est levée par la liaison d'une protéine Hedgehog à son récepteur (Watson et al., 2010). L'activation de Smo entraîne une stimulation de facteurs de transcriptions à doigts de zinc, les facteurs Gli (*glioma-associated oncogene*). En l'absence du ligand Shh, Gli2 et Gli3 subissent une digestion protéolytique et perdent leurs domaines d'activation, ce qui aboutit à la formation de protéines tronquées non fonctionnelles (Pan et al., 2006). Gli1 est exprimé uniquement en présence de Shh, ce qui en fait un bon marqueur de l'activation de la voie (Vokes et al., 2007) (**Figure 10**).

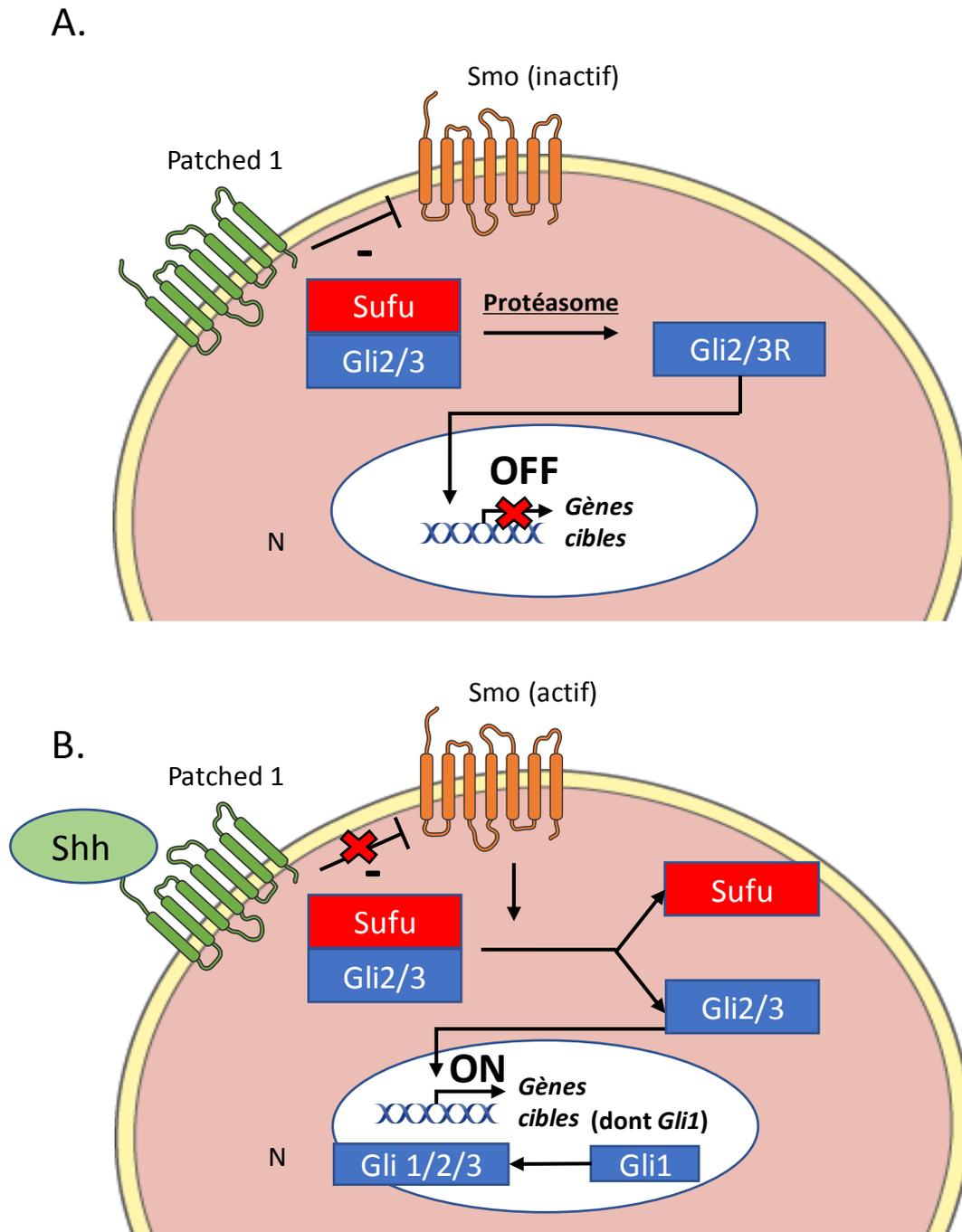


Figure 10 : Description de la voie Sonic Hedgehog

A. En absence du ligand Shh, le récepteur Patched inhibe Smoothed. Cette inhibition entraîne la dégradation protéolytique de Gli2 et le clivage de Gli3 en une forme répressive. B. En présence du ligand Shh, l'inhibition exercée par Patched sur Smo est levée, empêchant la lyse de Gli2 et Gli3, qui agissent comme activateurs transcriptionnels de la voie Shh

Shh : *Sonic Hedgehog*, Smo : *Smoothened*, N : noyau

Adapté de Drelon et al., Mol Cell Endocrinol. 2015 Jun 15;408:156-64

Toutes les protéines Gli n'exercent pas le même type de contrôle sur l'expression des gènes cibles de la voie Shh (Ruiz i Altaba, 1999). En effet, Gli1 a un rôle activateur, tandis que Gli3

exerce une activité inhibitrice, et Gli2 agit comme activateur sur certains gènes et inhibiteur sur d'autres. La voie Shh est auto-régulée dans la mesure où les protéines Gli1 et Gli3 sont elles-mêmes des cibles transcriptionnelles de cette voie, Gli1 étant activé et Gli3 réprimé (Marigo et al., 1996). Ce système d'autorégulation permettrait ainsi une modulation fine du signal.

2.1.2 Rôle de la voie Shh dans la surrénale

Dans la surrénale de rongeurs

Les données concernant l'implication de la voie Shh dans le développement surrénalien sont majoritairement issues d'expériences réalisées chez la souris et le rat. Dans ces espèces, la prolifération cellulaire a lieu majoritairement à la périphérie de la surrénale. En effet, chez le rat, il a été mis en évidence la présence de cellules marquées au BrdU, révélant les cellules en cours de division, dans la zone sous-capsulaire (Mitani, 2014).

Chez la souris en période anténatale, Shh est exprimé dès E11.5 par des cellules Sf1⁺ localisées à la périphérie de la glande. Des expériences de lignage cellulaire ont permis de suivre le devenir des cellules exprimant Shh au cours de la vie embryonnaire. Elles ont montré que ces cellules pouvaient se différencier et donner naissance, au cours d'une migration centripète, à l'ensemble des cellules matures du cortex capables de produire les enzymes spécifiques de la synthèse des minéralo et glucocorticoïdes (Cyp11b2 et Cyp11b1) (King et al., 2009). De plus, les cellules positives pour Gli1, réceptrices du signal Shh, sont capables de se différencier en cellules Shh⁺, puis en cellules stéroïdogènes. Les cellules exprimant Gli1 peuvent ainsi donner naissance à l'ensemble des cellules du cortex surrénalien mature (King et al., 2009).

Chez le rat adulte, Shh est exprimé dans des groupes de cellules localisées dans la zone sous-capsulaire. Celles-ci restent dans un état peu différencié, n'exprimant pas les enzymes terminales de la stéroïdogénèse comme Cyp11b1 ou Cyp11b2 (Guasti et al., 2011). Les cellules réceptrices du signal Shh, exprimant Patched et Gli1 sont localisées essentiellement dans la capsule. La contribution des cellules Gli1⁺ au renouvellement du cortex chez l'animal adulte semblerait moins importante qu'au cours du développement (Dörner et al., 2017).

Le rôle majeur de la signalisation Hedgehog au cours du développement a été illustré par l'invalidation des gènes codant les différentes protéines de la voie chez la souris. En particulier, il a été constaté que les souris présentant une délétion complète du gène codant le récepteur Patched décèdent entre le 9^{ème} et 10^{ème} jour embryonnaire, dans un contexte malformatif (Goodrich et al., 1997). Par ailleurs, l'invalidation de Shh spécifiquement dans les cellules engagées dans un phénotype stéroïdogène exprimant Sf1 entraîne une hypoplasie surrénalienne, associée à un amincissement de la capsule (Ching and Vilain, 2009; Huang et al., 2010). Cependant, dans ce modèle, il n'a pas été constaté d'altération majeure de la zonation surrénalienne suggérant que Shh joue un rôle crucial dans le renouvellement cellulaire, mais n'a pas de rôle majeur dans la différenciation.

Dans la surrénale humaine

Différentes données cliniques et expérimentales soulignent l'importance de la voie Shh dans le développement de la glande surrénale humaine, comme cela a pu être décrit chez la souris.

Gomes *et al.* ont mis en évidence la présence des facteurs de transcription GLI1, GLI2 et GLI3 dans le cortex surrénalien au cours du développement (Gomes *et al.*, 2014). Gli1, marqueur de l'activation de la voie Shh, semble être exprimé dans toutes les régions du cortex dès 20 SA, avec une réorganisation autour de la capsule aux stades plus tardifs, ce qui démontre que cette voie est bien active en période fœtale. La découverte de mutations du gène Gli3 chez des patients présentant un syndrome polymalformatif rare, le syndrome de Pallister-Hall, a confirmé l'importance de l'intégrité de cette voie au cours du développement (Hall, 2016). Ce syndrome, qui résulte donc d'une dysrégulation de la voie Shh, associe différentes malformations, parmi lesquelles une dysgénésie surrénalienne, des hamartomes hypophysaires (malformations d'origine embryonnaire), et des anomalies uro-génitales (Démurger et al., 2015). Le modèle murin de mutation du gène Gli3 reproduit les anomalies développementales sévères identifiées chez l'Homme, avec notamment une agénésie surrénalienne et des dysgénésies rénales (Böse et al., 2002). Ces observations mettent ainsi en lumière le rôle crucial de la voie Shh dans le développement surrénalien chez l'Homme.

Dans la surrénale humaine adulte, Gli1 a été localisée par immunohistochimie au niveau cytoplasmique et nucléaire dans les 3 zones du cortex surrénalien avec toutefois un marquage plus prononcé dans la zone glomérulée sous-capsulaire (Werminghaus et al., 2014). Il est

intéressant de noter que cette distribution est différente de celle retrouvée chez la souris, posant la question de la spécificité d'espèce de la signalisation Shh. Les auteurs n'ont cependant pas réussi à détecter la présence de Shh par cette méthode, bien que l'ARNm du gène codant Shh ait pu être retrouvé par hybridation in situ au niveau surrénalien, dans la zone glomérulée (Boulkroun et al., 2011).

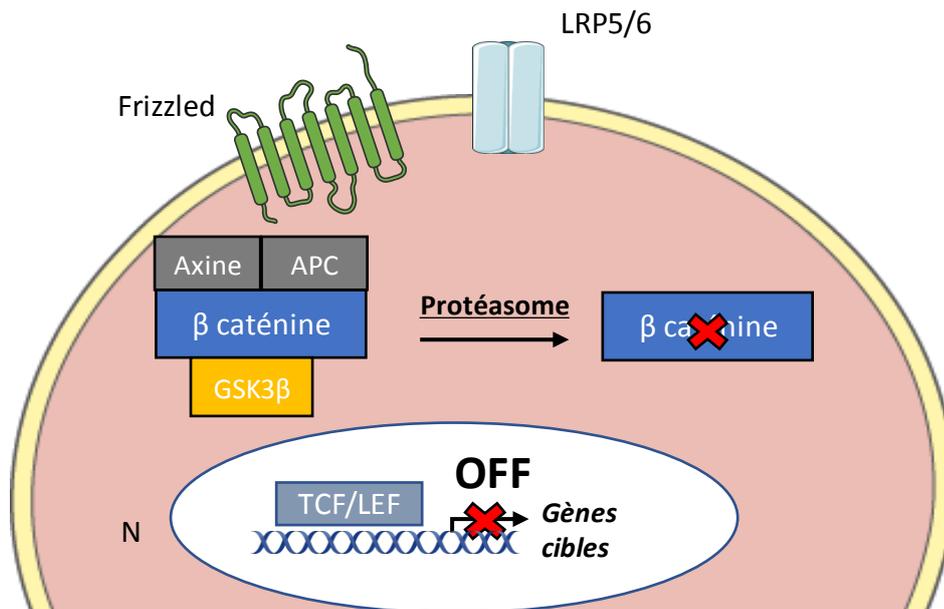
2.2 Voie Wnt/ β -caténine

2.2.1 Description de la Voie Wnt

La voie de signalisation canonique Wnt/ β -caténine pourrait être un facteur important dans la prolifération et la différenciation cellulaire surrénalienne. La voie Wnt est classiquement séparée en voie Wnt/ β -caténine, ou voie canonique, qui implique la stabilisation de la β -caténine et la transcription de gènes cibles, et en voie non canonique, qui intervient dans la polarité et la migration cellulaire (Chae and Bothwell, 2018).

En l'absence du ligand Wnt, la β -caténine est en majorité associée aux cadhérines au niveau de la membrane plasmique. Sa présence dans le cytoplasme est maintenue à de faibles concentrations car elle est alors associée à un complexe comprenant les protéines APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), axine et GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) qui phosphoryle la β -caténine, et provoque ainsi son adressage et sa dégradation dans le protéasome (Clevers and Nusse, 2012). La signalisation Wnt débute par la liaison du ligand Wnt à son récepteur Frizzled associé au co-récepteur LRP (*Low-Density Lipoprotein receptor-related protein*). L'activation du récepteur entraîne une séquestration membranaire du complexe protéique, empêchant la phosphorylation de la β -caténine. L'accumulation intracytosolique de la β -caténine qui en résulte permet son transport à l'intérieur du noyau cellulaire où elle va se lier aux facteurs de transcriptions LEF/TCF (*lymphoïde enhancer factor/T cell factor*), et permettre la transcription des gènes cibles de la voie (MacDonald et al., 2009) (**Figure 11**).

A.



B.

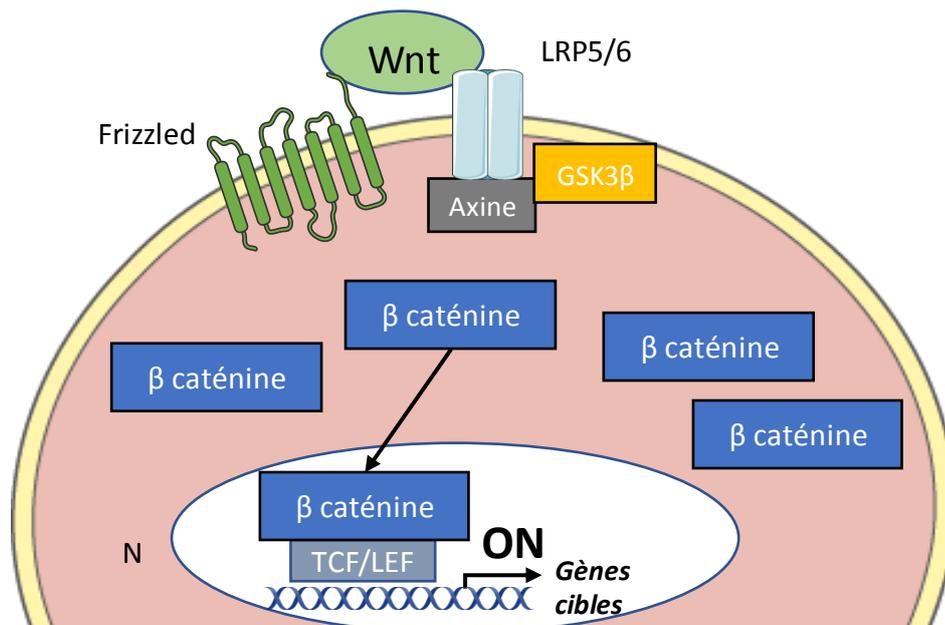


Figure 11 : Description de la voie Wnt/ β -caténine

A. En absence du ligand Wnt, la β -caténine cytoplasmique est lysée suite à l'adressage vers le protéasome après sa liaison avec un complexe protéique composé de l'axine, la GSK3 β et de la protéine APC. B. En présence du ligand Wnt, le complexe protéique est séquestré par le co-récepteur LRP5/6 à la membrane plasmique. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et dans le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcriptions TCF/LEF.

GSK3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β* , APC : *Adenomatous Polyposis Coli*, LRP : *Low-Density Lipoprotein receptor-related protein*,

Adapté de Drelon et al., *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Jun 15;408:156-64

2.2.2 Rôle de la voie Wnt/ β -caténine dans la surrénale

Dans la surrénale de rongeurs

Chez la souris adulte, les cellules exprimant la β -caténine sont localisées à la périphérie de la surrénale (Kim et al., 2008). Ces cellules peuvent être séparées en 2 sous-populations différentes : des cellules peu différenciées exprimant également Shh, et des cellules stéroïdogènes déjà orientées vers la voie de synthèse des minéralocorticoïdes n'exprimant pas Shh (Walczak et al., 2014).

Le rôle de la β -caténine dans le développement surrénalien a été démontré par le fait que l'invalidation complète du gène *Cttnb1*, codant la β -caténine, dans les cellules exprimant Sf1 entraîne une aplasie surrénalienne. De plus, l'inactivation aléatoire de ce gène est associée à un amincissement du cortex surrénalien. Ces données suggèrent donc fortement un lien entre la voie Wnt/ β -caténine et le recrutement de cellules progénitrices (Kim et al., 2008). De même, la perte de l'expression de *Rspo3* qui entraîne une baisse d'activité de la voie Wnt/ β -caténine, induit une diminution de la prolifération des cellules de la zone glomérulée (Vidal et al., 2016). A l'inverse, l'activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine dans des cellules stéroïdogènes entraîne une accumulation de cellules indifférenciées aux niveaux capsulaire et sous-capsulaire (Berthon et al., 2010).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est également impliquée dans la zonation du cortex. En effet, l'activation forcée de cette voie conduit à l'expression ectopique de *Cyp11b2* dans la zone fasciculée, associée à une augmentation de la sécrétion d'aldostérone (Berthon et al., 2012). Par ailleurs, les souris ayant une mutation inactivatrice *Wnt-4*, codant un des facteurs Wnt, sont caractérisées par un syndrome polymalformatif touchant notamment les surrénales, les reins et le système reproductif (Heikkila, 2002). Ces animaux présentent à la naissance une diminution de la production d'aldostérone sans atteinte de la fonction glucocorticoïde, suggérant que *Wnt4* serait nécessaire à la formation de la zone glomérulée et la synthèse d'aldostérone.

Ainsi, les données observées dans différents modèles murins indiquent donc que la voie Wnt/ β -caténine contrôle la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules surrénaliennes, avec un impact probable sur l'organogenèse.

Dans la surrenale humaine

La β -caténine est exprimée dans l'ensemble du cortex surrenalien de la surrenale adulte (Boulkroun et al., 2011). Chez l'Homme, un cas de mutation inactivatrice *WNT4* a été rapporté, responsable entre autre d'une dysgénésie surrenalienne associée à un désordre du développement sexuel (Mandel et al., 2008). Ces données sont cohérentes avec celles rapportées chez la souris, suggérant un rôle majeur de la voie Wnt/ β -caténine dans l'organogenèse, notamment surrenalienne. Des travaux réalisés sur des cultures de cellules corticosurrenaliennes humaines H295R ont montré que la β -caténine était impliquée dans la production d'aldostérone, que ce soit à l'état basal ou en réponse à l'AngII (Berthon et al., 2014). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine agirait à 2 niveaux. D'une part, la voie entrainerait une augmentation de l'expression du gène *AT1R*. D'autre part, l'action sur la transcription de *CYP11B2* serait indirecte via l'augmentation de l'expression des récepteurs orphelins NURR77 et NURR1, qui, une fois activés, se fixent sur des éléments promoteurs de *CYP11B2* (Berthon et al., 2014). Par ailleurs, des données ont également montré un effet de la voie Wnt/ β -caténine sur la prolifération. En effet, l'inactivation de la β -caténine dans les cellules H295R entraine une inhibition de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose (Gaujoux et al., 2013). Une activation de la voie Wnt/ β -caténine a été retrouvée dans des adénomes de Conn, suggérant son implication dans l'hyperaldostéronisme en contexte physiopathologique (Berthon et al., 2014). De plus, il a été observé des mutations activatrices de *CTNNB1* dans de nombreux adénomes surrenaliens, en particulier dans les tumeurs non sécrétantes (Tissier et al., 2005), suggérant un rôle de la voie Wnt/ β -caténine sur la prolifération cellulaire supérieure à celui sur la sécrétion stéroïdienne.

3 Les mastocytes

3.1 Description et caractérisation

Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire qui dérivent de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes localisées dans la moelle osseuse. Les précurseurs mastocytaires sont libérés dans la circulation sanguine et, sous l'action de différentes cytokines, colonisent divers tissus cibles pour y terminer leur différenciation en mastocytes matures. Sur le plan cytologique, les mastocytes sont des cellules mononuclées de taille variable (diamètre de 8 à 20 μm) (**Figure 12**). Leur noyau rond est généralement central ou légèrement excentré, et leur cytoplasme basophile contient de très nombreuses granulations. Les mastocytes circulants expriment à leur surface le récepteur C-KIT (CD117) pour le facteur de croissance *stem cell factor* (SCF), synthétisé dans les différents organes cibles. Les mastocytes sont particulièrement abondants au niveau des muqueuses et des tissus conjonctifs.

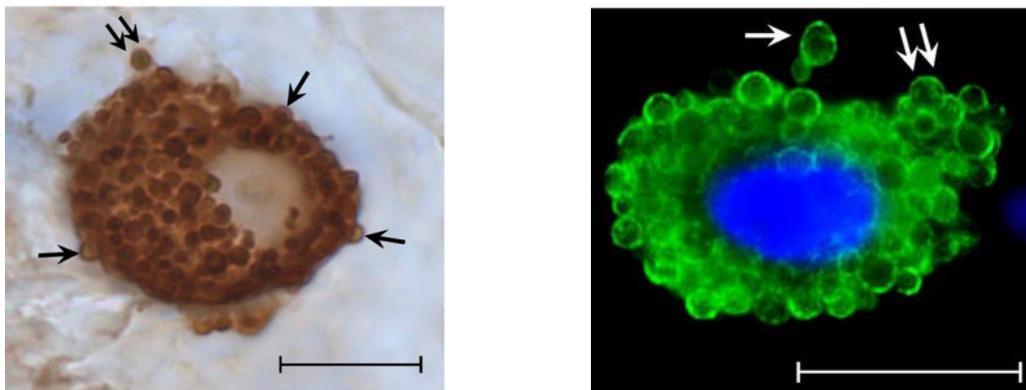


Figure 12 : Visualisation immunohistochimique des mastocytes à l'aide d'un anticorps anti-tryptase (en lumière visible à gauche et en immunofluorescence à droite).

De multiples vésicules d'exocytose peuvent être visualisées (flèches). Echelle : 10 μm .

D'après Atiakshin et al, Histochemistry and Cell Biology, 2018, Volume 149, Number 5, Page 461

Le **SCF** est le facteur de croissance principal des mastocytes. Il est sécrété par des cellules épithéliales ou mésenchymateuses. Le récepteur C-KIT relaie l'effet chimiotactique du SCF sur les mastocytes et son activation stimule la prolifération et la survie cellulaire (Nilsson et al., 1994; Okayama and Kawakami, 2006). Le récepteur KIT est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase. La fixation du SCF sur son récepteur entraîne la dimérisation de KIT,

induisant l'autophosphorylation de résidus tyrosine de la région intracellulaire du récepteur. Plusieurs voies de signalisation sont ainsi activées, telles que les voies des PI3K, Ras-Raf-MAPK ou JAK. Une inactivation du gène codant KIT entraîne chez la souris une déficience en mastocyte (Reber et al., 2012). A l'inverse, des mutations activatrices de KIT sont responsables de mastocytose, pathologie liée à une prolifération anormale de mastocytes (Brosby-Olsen et al., 2018). Si la liaison du SCF à son récepteur est un signal critique pour le développement des mastocytes, d'autres cytokines interviennent dans les mécanismes de chimiotactisme (Bradding and Arthur, 2016).

La maturation des mastocytes est orientée par le microenvironnement dans les tissus cibles. On décrit ainsi classiquement 2 sous-types de mastocytes en fonction du contenu granulaire en protéases (Irani et al., 1986; Khazaie et al., 2011). Les mastocytes exprimant uniquement la tryptase sont essentiellement retrouvés dans la muqueuse pulmonaire. Les mastocytes exprimant la tryptase, la chymase et la carboxypeptidase A3 sont détectés majoritairement dans les tissus conjonctifs. Cependant, cette distinction historique tend à être remise en question, car il a été démontré que les 2 sous-populations de mastocytes coexistent au niveau de la muqueuse pulmonaire, avec des contenus en granule différents en fonction de la localisation dans l'arbre pulmonaire (Andersson et al., 2009). L'hétérogénéité mastocytaire serait ainsi liée à l'environnement local.

La différenciation mastocytaire peut être appréciée par l'apparition successive de 3 groupes de marqueurs : des antigènes précoces présents dès les progéniteurs mastocytaires (CD34, CD117 ou KIT), des marqueurs de différenciation précoces, tels que le récepteur de haute affinité pour les IgE, ou FcεRI, tryptase, histamine), et enfin, des marqueurs de différenciation tardifs (héparine ou chymase) (Welker et al., 2000). Les 2 derniers marqueurs sont détectés uniquement dans des mastocytes infiltrés dans les tissus cibles. La chymase est exprimée également par les cardiomyocytes et les fibroblastes, alors que la tryptase est une protéine spécifique des mastocytes ; cette dernière est donc utilisée comme marqueur pour identifier les mastocytes.

3.2 Sécrétions des mastocytes

A la suite d'une stimulation, les mastocytes libèrent 3 types de médiateurs, classés selon leur cinétique de relargage dans l'espace extra-cellulaire. Les médiateurs préformés

(principalement histamine, peroxydase, sérotonine, protéases neutres dont chymase et tryptase) sont libérés dans les minutes suivant l'activation des mastocytes. Les médiateurs néoformés (essentiellement des dérivés lipidiques, dont les leucotriènes et les prostaglandines) ont une cinétique de sécrétion plus lente d'une dizaine de minutes. Enfin, les médiateurs synthétisés (cytokines et facteurs de croissance) ont une cinétique retardée de plusieurs heures, puisqu'ils nécessitent une synthèse *de novo* à la suite de l'activation de l'expression des gènes concernés.

3.2.1 Histamine

L'histamine est historiquement le premier médiateur à avoir été associé aux mastocytes. Son rôle a été largement étudié dans les réactions allergiques. L'histamine est synthétisée à partir de la L-histidine par l'action de l'histidine décarboxylase dans l'appareil de Golgi, puis stockée dans les granules des mastocytes. Une fois libérée dans la circulation, elle se fixe sur les récepteurs H1 et H2 exprimés par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, ce qui entraîne une vasodilatation, une bronchostriction, et une augmentation de la perméabilité vasculaire.

3.2.2 Héparine et chondroïtine sulfate

Les protéoglycanes sont des macromolécules constituées d'une longue chaîne peptidique essentiellement composée de résidus sérine-glycine, sur laquelle se fixe de manière covalente des chaînes de glycosaminoglycanes. Deux glycosaminoglycanes sont prépondérants : l'héparine et la chondroïtine sulfate (Mulloy et al., 2017). La propriété la plus étudiée de l'héparine est son action anti-coagulante, par sa fixation sur l'antithrombine, entraînant une augmentation majeure de l'inhibition de la thrombine et des facteurs activés de la coagulation (Onishi et al., 2016). Les protéoglycanes intra-mastocytaires ont également d'autres fonctions, notamment dans le stockage et la régulation de l'activité enzymatique des protéases (Rönnberg et al., 2012).

3.2.3 Protéases : tryptase, chymase et carboxypeptidase A

La tryptase est la protéase la plus abondante des granules de sécrétion mastocytaires. Cette enzyme clive spécifiquement les protéines au niveau de sites localisés au voisinage immédiat des résidus Lysine/Arginine. La tryptase est hautement spécifique des mastocytes, puisque

99% de la tryptase circulante est d'origine mastocytaire. Ainsi, la quantité de tryptase est estimée à 11-35 pg dans le cytoplasme d'un mastocyte, alors qu'il est de 0.05 pg environ dans les leucocytes basophiles, autres cellules du système immunitaire (Pejler et al., 2010). L'appellation tryptase regroupe plusieurs sous-groupes enzymatiques dont les propriétés diffèrent : α , β , γ et δ . Les 2 premières formes ont été les plus étudiées : les forme α et β I sont codées par le gène *TPSB1*, tandis que le gène *TPSB2* code les tryptases β II et β III. La β -tryptase serait la forme prépondérante, libérée dans la circulation lors des chocs anaphylactiques alors que l' α -tryptase serait un monomère inactif sécrété en continu, responsable du taux plasmatique circulant basal (Atiakshin et al., 2018). Sur le plan fonctionnel, la tryptase est une enzyme impliquée dans différents processus physiopathologiques dont la production de médiateurs pro-inflammatoire, l'activation de monocytes et macrophages, ainsi que le remodelage des matrices extracellulaires.

La chymase est une protéase stockée dans des granules mastocytaires différents de ceux contenant la tryptase. Cette enzyme clive une chaîne peptidique préférentiellement après des résidus aromatiques (phénylalanine et tyrosine). Il a été démontré que cette peptidase présente la capacité de cliver de façon efficace l'angiotensine I en sa forme active, l'angiotensine II (Raymond et al., 2009). L'angiotensine II ainsi générée pourrait s'opposer à la chute de la pression artérielle au cours de l'anaphylaxie ou participer à des mécanismes de remodelage vasculaire (Caughey, 2016).

La carboxypeptidase A3 est une protéase non spécifique des mastocytes, puisqu'elle est retrouvée également dans les cellules basophiles. Son action permet de cliver les acides aminés aromatiques présents à l'extrémité C terminale des peptides et protéines.

3.2.4 Sérotonine

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT), est une monoamine synthétisée à partir du L-tryptophane, acide aminé essentiel. Sa synthèse s'effectue en 2 étapes : d'une part une hydroxylation du L-tryptophane en 5-hydroxytryptophane sous le contrôle d'une enzyme spécifique, la tryptophane hydroxylase (TPH), et d'autre part une décarboxylation du 5-hydroxytryptophane en 5-hydroxytryptamine par la décarboxylase des acides aminés aromatiques. La première étape d'hydroxylation constitue l'étape limitante de la biosynthèse de la sérotonine. La TPH existe sous 2 isoformes, TPH1 et TPH2 (codées respectivement par

les gènes *TPH1* et *TPH2*), avec un profil d'expression spécifique, puisque TPH2 est essentiellement localisé au niveau du système nerveux central alors que TPH1 intervient dans la synthèse périphérique de 5-HT (Walther and Bader, 2003). La sérotonine est produite en majorité par les cellules chromaffines du tractus digestif et par les neurones du système nerveux central, mais elle est également retrouvée au niveau des granules de sécrétion mastocytaire.

Les actions physiologiques de la 5-HT sont très variées, aussi bien au niveau du système nerveux central qu'en périphérie. Cette grande diversité de ses effets biologiques s'explique par la multiplicité de ses récepteurs dont 14 types ont été caractérisés (Hoyer, 2017). Ces derniers sont répartis en 4 grandes classes selon leur structure et leur mode de couplage. Les récepteurs couplés à l'adénylcyclase incluent les récepteurs 5-HTR4, 5-HTR6 et 5-HTR7. Au niveau central, la 5-HT agit comme neurotransmetteur en modulant plusieurs comportements neuro-psychologiques dont l'agressivité, la peur, l'addiction, et la sexualité (Berger et al., 2009). Au niveau périphérique, elle module des processus biologiques divers, comme la fonction cardiovasculaire, le péristaltisme intestinal, et le métabolisme glucido-lipidique (Berger et al., 2009; Crane et al., 2015).

3.2.5 Autres facteurs

La diversité des fonctions des mastocytes est liée à la multitude de médiateurs chimiques qu'ils sécrètent, incluant notamment des agents pro-inflammatoires (histamine, tryptase), pro-angiogéniques (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) et des facteurs de croissance (TGF- β *Transforming Growth Factor* β , FGF-2 *Fibroblast Growth Factor-2*, NGF *Nerve Growth Factor*). Les mastocytes sont doués d'une plasticité remarquable comme en témoigne la grande variabilité des récepteurs qu'ils expriment et de la composition de leurs granules en réponse à l'influence du microenvironnement cellulaire.

3.3 Activation des mastocytes

Les mastocytes matures possèdent un large panel de systèmes d'activation, classiquement divisés en IgE-dépendants et IgE indépendants. Les mastocytes sont considérés comme les premiers effecteurs de la réaction allergique médiée par les IgE. Tous les mastocytes peuvent être activés par la liaison des IgE au récepteur Fc ϵ RI, exprimé à la membrane plasmique. La

liaison d'un allergène aux IgE fixées sur le FcεRI entraîne l'agrégation des récepteurs et l'activation d'une cascade de signalisation de protéines kinases. Ce signal entraîne la migration des granules sécrétoires vers la membrane plasmique et leur exocytose dans le milieu extracellulaire (Gilfillan and Tkaczyk, 2006).

Les mastocytes peuvent de plus être activés de façon indépendante des IgE, en réponse à un pathogène invasif que ce soit par l'activation du complément ou à travers les récepteurs de reconnaissance de motifs cellulaires (PRR : *pattern recognition receptors*) exprimés à leur membrane. Enfin, les mastocytes peuvent également être activés par des neuromédiateurs. En effet, les mastocytes sont fréquemment localisés à proximité de terminaisons nerveuses, et de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle de neuromédiateurs comme éléments clefs de l'interaction neurones/mastocytes. Parmi ces neuromédiateurs, la substance P a été impliquée dans la dégranulation mastocytaire après liaison avec son récepteur (récepteur NK1 pour récepteur des neurokinines de type 1) (Matsuda et al., 1989; Shi et al., 2015).

La dégranulation des mastocytes est un phénomène complexe qui fait intervenir plusieurs mécanismes, tels que le « *full fusion* », la « *piecemeal degranulation* » et le « *kiss-and-run* » (Wernersson and Pejler, 2014).

3.4 Rôles des mastocytes

3.4.1 Rôles en physiologie

Longtemps connus pour leur rôle dans l'initiation des mécanismes d'allergie dépendante des IgE, les mastocytes se sont vu attribués par la suite de nouvelles fonctions physiologiques (**Figure 13**). Ainsi, les mastocytes interviennent à plusieurs niveaux des réponses immunitaires innée et acquise, notamment en raison de leur influence sur d'autres cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les cellules Natural killer (Galli et al., 2005). Grâce à leur aptitude à sécréter des facteurs pro-angiogéniques, les mastocytes interviennent dans de nombreux processus requérant une angiogenèse, tels que la cicatrisation. Les mastocytes interviennent également dans les étapes d'inflammation, prolifération et remodelage tissulaire (Douaiher et al., 2014). Enfin, les mastocytes seraient également impliqués dans différentes phases de la reproduction, que ce soit au moment de

l'ovulation, de l'implantation embryonnaire ou dans la contraction du myomètre avant l'accouchement (Meyer and Zenclussen, 2018).

3.4.2 Rôles en pathologie tumorale

Le rôle des mastocytes dans la tumorigénèse a été décrit plus récemment avec, suivant les études, des actions pro- ou anti-tumorigènes. Ainsi, une augmentation de la densité mastocytaire au sein de l'environnement tumoral a été associée à un mauvais pronostic, que ce soit dans les tumeurs solides, telles que le cancer prostatique (Nonomura et al., 2007), l'adénocarcinome pancréatique (Strouch et al., 2010), le mélanome (Ribatti et al., 2003), ou des hémopathies comme le lymphome de Hodgkin (Molin et al., 2002). A l'inverse, l'infiltration mastocytaire a été associée à un meilleur pronostic dans d'autres types de néoplasies, comme les tumeurs mammaires (Rajput et al., 2008). Cette dualité fonctionnelle peut être expliquée par la diversité des médiateurs sécrétés par les mastocytes. Ainsi, les mastocytes pourraient promouvoir l'initiation et la progression tumorale à travers le relargage de facteurs pro-angiogéniques et pro-lymphangiogéniques, de protéases, ou par l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. A l'inverse, l'effet anti-tumoral pourrait être lié soit à une action toxique directe médiée par les dérivés réactifs de l'oxygène ou le TNF- α , soit indirecte par la libération d'héparine (impliquée dans la maturation des cellules dendritiques) et d'IL9 (responsables d'une inhibition de la croissance tumorale) (Khazaie et al., 2011; Varricchi et al., 2017).

En fait, le rôle des mastocytes en physiopathologie tumorale est probablement encore plus complexe puisqu'il semble varier selon le stade de progression de la tumeur (Carlini et al., 2010) et la localisation péri- ou intra-tumorale des mastocytes (Johansson et al., 2010).

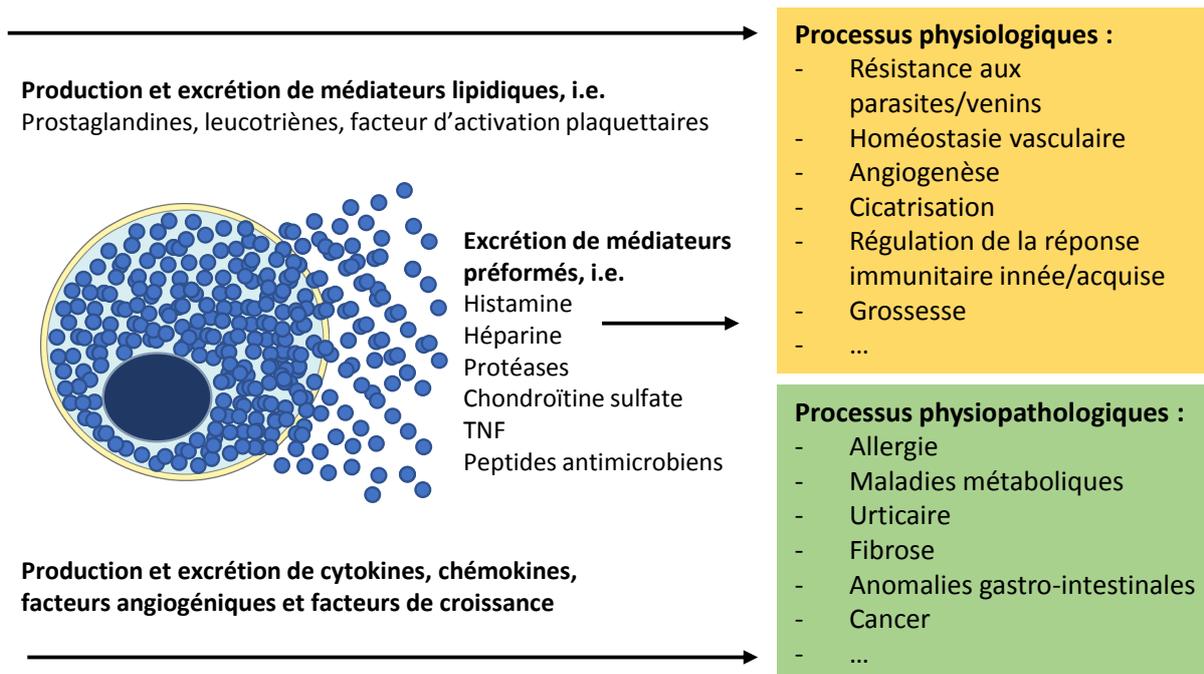


Figure 13 : Rôles des mastocytes dans des processus physiologiques et physiopathologiques
Adapté de Meyer, N Mast cells-Good guys with a bad image?, Am J Reprod Immunol. 2018 Oct;80(4)

3.4.3 Mastocytes et surrénale normale

Dans la surrénale humaine adulte, les mastocytes sont exclusivement localisés au niveau sous-capsulaire, dans la zone glomérulée, au voisinage des cellule stéroïdogènes productrices d'aldostérone (Lefebvre et al., 1992; Duparc et al., 2015). Cette proximité suggère une interaction intercellulaire entre les mastocytes et les cellules stéroïdogènes pouvant influencer la sécrétion des minéralocorticoïdes. De plus, comme dans d'autres tissus, les mastocytes intra-surréaliens établissent des connexions avec des fibres nerveuses (Duparc et al., 2015)

Des expériences menées *in vitro* au laboratoire ont révélé que les produits de sécrétion de 2 lignées mastocytaires humaines (HMC-1 et LAD2) stimulent l'expression des gènes codant les récepteurs au HDL et LDL cholestérol, *STAR*, et *CYP11B2*, ainsi que la production d'aldostérone par la lignée de cellules corticosurréaliennes humaines H295R (Duparc et al., 2015). L'effet stimulateur des produits de sécrétion mastocytaires sur la synthèse d'aldostérone est réduit par des antagonistes des récepteurs de la 5-HT, ce qui révèle l'implication de la 5-HT dans la communication intercellulaire. D'autres facteurs libérés par les mastocytes pourraient être

impliqués, comme l'histamine qui entraîne une augmentation de l'aldostérone chez le rat mais n'as pas d'effet chez l'homme (Hinson et al., 1989).

Le contrôle paracrine des mastocytes sur les cellules corticosurréaliennes a également été étudié *in vitro* sur des explants surréaliens humains. L'ensemble de ces expériences a permis de montrer que la dégranulation des mastocytes stimule la sécrétion d'aldostérone via la libération de sérotonine et l'activation des récepteurs sérotoninergiques de type 4 (5-HT₄R), couplés positivement à une activité adénylate cyclase et à un influx calcique extracellulaire (Contesse et al., 2000; Lefebvre et al., 1993, 2001) (**Figure 14**). De plus, la sérotonine et les agonistes du 5-HT₄R augmentent faiblement la production de cortisol par des cellules corticosurréaliennes en culture (Louiset et al., 2017). A cet égard, notre équipe a montré que l'administration d'agonistes du 5-HT₄R à des volontaires sains augmente l'aldostérone plasmatique sans affecter les niveaux de cortisol circulant. La supériorité de la stimulation par la 5-HT sur la fonction minéralocorticoïde s'explique probablement par la distribution des récepteurs 5-HT₄R, presque exclusivement localisés au niveau de la zone glomérulée (Cartier et al., 2005; Bram et al., 2016; Louiset et al., 2017).

Récemment, le rôle des mastocytes sur la production d'aldostérone a également été étudié *in vivo* dans 3 modèles murins : des souris BALB/c sélectionnées pour leur haute densité de mastocytes intra-surréaliens, des souris C57/Bl6 présentant une faible infiltration mastocytaire dans la surrénale, et des souris déficientes en mastocyte par mutation du gène codant KIT (souris Kit W^{-sh}/W^{-sh}) (Boyer et al., 2017). Dans les surrénales des souris BALB/c et C57/Bl6, l'expression du gène *Tpsb2*, codant la tryptase, est augmentée en régime hyposodé. Dans ces 2 souches murines, le niveau d'expression de *Tpsb2* est corrélé à celui de *Cyp11b2*. Ces données indiquent que les mastocytes sont activés en régime hyposodé, et qu'ils contribueraient à l'augmentation de la synthèse d'aldostérone induite par une restriction sodée en sel. Ce processus pourrait impliquer l'angiotensine II plasmatique, enzyme capable d'activer la dégranulation mastocytaire chez le rat (Carvalho et al., 2006). Cependant, les mastocytes ne semblent pas jouer un rôle significatif dans la régulation de la production d'aldostérone en régime normosodé, puisque les niveaux d'aldostérone plasmatiques et urinaires sont similaires chez les souris C57/Bl6 sauvages et les souris Kit W^{-sh}/W^{-sh} lorsque les animaux reçoivent des apports normaux en chlorure de sodium (Boyer et al., 2017). De façon surprenante, la réponse de l'aldostérone plasmatique au régime désodé est plus importante

que les souris déficitaires en mastocyte par comparaison avec les souris sauvages. La sévérité de cet hyperaldostéronisme est telle que les souris Kit W^{-sh}/W^{-sh} présentent alors une hypertension artérielle associée à une hypokaliémie. Il pourrait représenter un mécanisme compensateur de l'absence de mastocytes, activable lors de la restriction sodée.

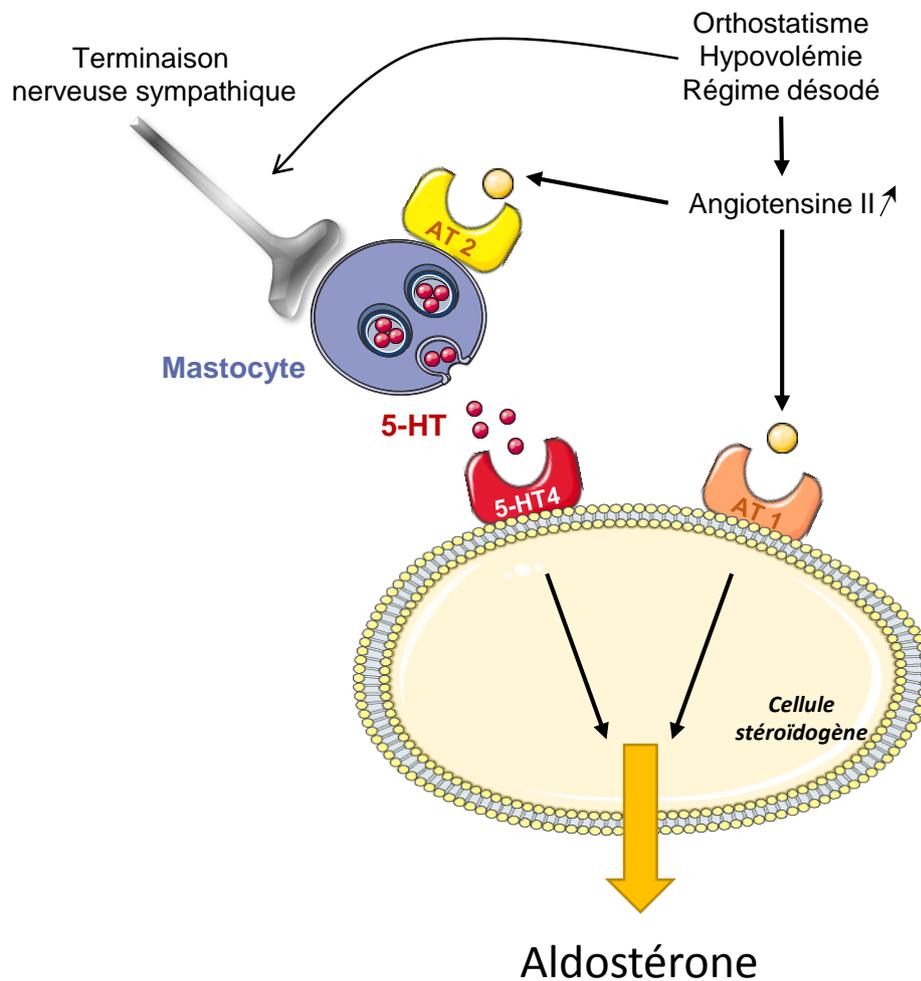


Figure 14 : Contrôle paracrine de la production d'aldostérone par les mastocytes

En dehors de la régulation nerveuse, il est probable que la dégranulation des mastocytes soit directement régulée par l'angiotensine II via son récepteur de type 2 (AT2) comme cela a pu être montré chez les rongeurs.

5-HT : Sérotonine ; 5-HT4 : récepteur sérotoninergique de type 4 ; AT1 : récepteur de l'angiotensine II de type 1

En marge de leur activité sécrétoire, les mastocytes pourraient également avoir un rôle prolifératif. Chez les souris IQI/Jic présentant une densité accrue de mastocytes surrénaliens, il a en effet été observé une hyperplasie de la zone sous-capsulaire présentant l'aspect de cellules corticosurréaliennes immatures (Kim et al., 1997).

3.4.4 Mastocytes et surrénale tumorale

La présence de mastocytes au sein de tumeurs surrénaliennes a été rapportée dès 1985 (Aiba et al., 1985). Une prolifération de mastocytes a été observée dans une tumeur sécrétant de la désoxycorticostérone et des adénomes producteurs d'aldostérone (APA, Adénome de Conn), mais n'a pas été visualisée au sein de tumeurs sécrétant du cortisol, suggérant une association privilégiée avec les cellules corticosurrénaliennes sécrétrices de minéralocorticoïdes. Plus récemment, la densité et l'infiltration mastocytaires ont été étudiées dans une large série d'APA permettant de caractériser 2 profils de distribution différents (Duparc et al., 2015). Dans un tiers des cas, les adénomes étaient le siège d'une importante infiltration mastocytaire. Dans ces tumeurs, la densité mastocytaire intra-adénomateuse était fortement corrélée à la présence de la protéine CYP11B2 en immunomarquage, et au niveau d'aldostérone plasmatique des patients, suggérant que les mastocytes intra-tumoraux stimuleraient la sécrétion d'aldostérone par un mécanisme paracrine. Dans les autres cas, les mastocytes étaient majoritairement localisés dans le cortex surrénalien adjacent à l'adénome et associés à des tumeurs plus volumineuses. Dans ces tumeurs, l'expression de l'aldostérone synthase était corrélée uniquement à la présence de mastocytes en péri-tumoral, mais non à la densité des mastocytes intra-adénomateux. Ces données suggèrent que les mastocytes péri-tumoraux exercent plutôt une action proliférative sur les APA.

Globalement, les données indiquent que les mastocytes sont impliqués dans le contrôle des activités mitogène et stéroïdogène des cellules de la glomérulée chez l'adulte. Leur rôle dans le développement surrénalien et la mise en place de la fonction minéralocorticoïde n'ont cependant pas encore été étudiés que ce soit chez l'Homme ou dans des modèles animaux.

4 Les surrénales à la naissance : mécanismes d'adaptation à la vie extra-utérine

La transition de la vie intra- à la vie extra-utérine entraîne des variations rapides des compartiments hydriques de l'organisme (compartiments plasmatique, interstitiel et intracellulaire). Cette transition intervient de manière concomitante à des modifications de la fonction rénale et des mécanismes régulant la balance hydro-électrolytique.

Ces mécanismes sont fréquemment perturbés chez les nouveau-nés prématurés (nés avant 37 semaines d'aménorrhée). La prématurité est subdivisée en 3 catégories selon le terme de naissance : la prématurité extrême pour les naissances avant 28 SA, la grande prématurité entre 28 et 31 SA, et la prématurité modérée à partir de 32 SA. Si l'on observe une amélioration significative de la survie pour les naissances après 25 SA (Ancel et al., 2015), la prise en charge de l'équilibre hydro-sodé reste difficile chez les prématurés, notamment chez les nouveau-nés présentant une prématurité sévère et/ou avec un poids de naissance inférieur à 1500 g (Bhatia, 2006; O'Brien and Walker, 2014).

4.1 Homéostasie hydro-électrolytique

A la naissance, la fonction minéralocorticoïde semble imparfaitement fonctionnelle, comme le suggère l'association d'une perte urinaire de sodium et d'une réabsorption d'eau insuffisante (Bizzarri et al., 2016). Ces manifestations semblent d'autant plus prononcées que les nouveau-nés sont prématurés (Sulyok et al., 1979). Les données publiées sur la fonctionnalité du SRA en période néonatale sont limitées. Les travaux de l'équipe de L. Martinerie ont permis d'apporter quelques explications concernant cette « immaturité rénale ». En comparant les concentrations de rénine et d'aldostérone dans le sang de cordon de nouveau-nés à terme et dans le sang de leur mère, les auteurs ont pu montrer que les valeurs étaient significativement plus élevées chez les nouveau-nés (Martinerie et al., 2009a). Cette sur-stimulation du SRA en période néonatale était associée à une hyponatrémie et une hyperkaliémie, évoquant fortement l'hypothèse d'une résistance partielle à l'aldostérone. Bien que l'aldostérone maternelle puisse traverser la barrière placentaire (Bayard et al., 1970), c'est bien la production d'aldostérone issue de surrénale fœtale qui est en jeu à ce moment. Par ailleurs, L. Martinerie *et al.* ont montré que cette résistance partielle à l'aldostérone était

associée avec une expression faible du MR rénal à la naissance. Ainsi, l'ARNm du gène codant le MR est transitoirement détecté dans le néphron entre 15 et 24 SA, puis devient faible dans les stades plus tardifs et à la naissance (Martinerie et al., 2009b).

Cette équipe s'est également intéressée à la signalisation du SRA chez le prématuré, en étudiant 3 groupes de nouveau-né âgés respectivement de < 33 SA, 33-36 SA, et > 37SA. Les niveaux d'aldostérone urinaires augmentent avec l'âge gestationnel, avec un ratio aldostérone/rénine également croissant ; suggérant un défaut de sécrétion d'aldostérone chez les nouveau-nés prématurés (Martinerie et al., 2015). De plus, la résistance à l'aldostérone a été observée chez les nouveau-nés modérément prématurés et les pré-terme, mais pas chez les prématurés les plus sévères. Entre la naissance et 1 mois de vie, le groupe < 33 SA est devenu résistant à l'aldostérone, suggérant une répression de l'expression rénale du MR dans ce groupe de façon similaire aux nouveau-nés à terme.

4.2 Transition anatomique de la surrénale

La transition entre la zonation surrénalienne fœtale (composée des zones ZD, ZT et ZFo) et celle de l'âge adulte (organisée en ZG, ZF et ZR) n'est pas totalement élucidée. Il existe un remaniement important de la surrénale dès la naissance avec une apoptose massive de la zone fœtale, une première phase d'involution rapide pendant les 2 premières semaines de vie post-natale, suivi d'une involution plus lente par la suite (Bocian-Sobkowska et al., 1998).

Les mécanismes liés à cette involution drastique sont discutés. Certains auteurs ont avancé que l'accouchement pourrait être le facteur déclenchant principal, en observant que les taux sériques des androgènes diminuent en période post-natale indépendamment du terme de naissance. L'existence d'un facteur placentaire nécessaire à la survie de la surrénale fœtale a été suggérée (Ben-David et al., 2007). D'autres auteurs ont proposé que la modification de l'oxygénation surrénalienne, avec le passage d'une hypoxie à une normoxie tissulaire au moment de la naissance, entrainerait des modifications importantes de l'expression des gènes clés impliqués dans la stéroïdogénèse (Agrawal et al., 2015).

La réorganisation de la zonation surrénalienne pose la question de l'origine des zones glomérulée et fasciculée de la corticosurrénale adulte. Pour certains auteurs, la zone définitive de la surrénale fœtale serait à l'origine des zones glomérulée et fasciculée, alors que pour

d'autres, les zones glomérulée et fasciculée dériveraient respectivement des zones définitive et de transition.

4.3 Fonction surrénalienne péri-natale

Alors que la production de cortisol est acquise bien avant la naissance, la mise en place de la fonction minéralocorticoïde au cours du développement reste imparfaitement élucidée et paraît relativement tardive. Les facteurs influençant la sécrétion d'aldostérone en période néonatale ne sont pas bien identifiés. Certains facteurs liés à la grossesse pourraient jouer un rôle, comme l'utilisation de traitement en pré partum, le mode de délivrance, l'âge gestationnel, le poids de naissance et la présence d'une maladie des membranes hyalines.

L'influence du mode de délivrance a été étudiée de façon indirecte par Costa *et al.* qui ont comparé l'excrétion urinaire d'aldostérone des premières 24 heures de 30 nouveau-nés de faible poids de naissance (< 2000 g), nés à 29 ± 2 SA. Dans cette étude, il n'a pas été retrouvé de différence entre les nouveau-nés nés par césarienne et ceux nés par voie basse (Costa et al., 2012), suggérant l'absence d'impact du mode de délivrance chez l'Homme. L'excrétion urinaire d'aldostérone était significativement corrélée à la natrémie, établissant un marqueur de la fonctionnalité du SRA dans les premières 72h de vie dans cette population.

Concernant l'impact des thérapeutiques anténatales, Kessel et al. a mis en évidence une diminution des niveaux d'aldostérone au sang de cordon ombilical de nouveau-nés dont la mère avait reçu pendant la grossesse un traitement par corticoïdes à haute dose, comme la bêtaméthasone prescrite dans le but d'améliorer la maturation pulmonaire fœtale en cas de menace d'accouchement prématuré (Kessel et al., 2009). Ce résultat suppose que la sécrétion d'aldostérone fœtale est sensible à la diminution de la sécrétion endogène d'ACTH, et suggère un contrôle, au moins partiel, de l'ACTH sur la sécrétion d'aldostérone en périnatal. Cependant, la production hypophysaire d'ACTH au cours du développement ne devient significative qu'après 30-32 SA, suggérant la présence d'autres facteurs régulateurs de la production de minéralocorticoïdes dans les stades plus précoces (Bagnoli et al., 2013).

OBJECTIFS

De nombreux facteurs participent au développement des surrénales, que ce soit des facteurs hormonaux ou des facteurs de croissance. Il est cependant probable que d'autres acteurs impliquant le microenvironnement cellulaire puissent intervenir. Des études récentes ont ainsi mis en évidence le rôle majeur des macrophages, cellules du système immunitaire, au cours de la morphogenèse testiculaire. Cependant, l'implication du microenvironnement et des cellules de l'immunité dans le développement des surrénales fœtales n'a jusqu'à présent jamais été étudiée.

Les mastocytes intra-surrénaux participent à la régulation de la synthèse d'aldostérone dans la surrénale normale, et ils paraissent également être impliqués dans la physiopathologie des adénomes de Conn, tumeurs associées à une hypersécrétion d'aldostérone. Les mastocytes ayant été détectés dans divers tissus fœtaux, on peut émettre l'hypothèse de leur présence au sein de la surrénale fœtale humaine, avec un rôle probable dans la mise en place de la production des minéralocorticoïdes.

Les travaux de cette thèse s'intègrent dans l'étude générale de l'influence des facteurs paracrines dans la production des stéroïdes surrénaux.

Notre projet a consisté à étudier le développement des surrénales fœtales, et plus spécifiquement le rôle des mastocytes dans l'établissement de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes.

La première partie de cette étude a eu pour objet de déterminer la cinétique d'apparition et la localisation des mastocytes intra-surrénaux au cours du développement. Puis, par des techniques d'immunohistochimie et de RT-QPCR, nous avons corrélé l'apparition des mastocytes aux acteurs et enzymes impliqués dans la synthèse d'aldostérone.

Nous avons ensuite évalué l'implication des mastocytes dans l'adaptation de la production de l'aldostérone à la vie extra-utérine. Dans ce cadre, nous avons cherché à mesurer l'impact de la naissance sur la synthèse d'aldostérone et la densité de mastocytes intra-surrénaux en comparant des surrénales de fœtus et de nouveau-nés.

Enfin, nous avons analysé les processus de prolifération et différenciation cellulaire en lien avec l'apparition de la fonction minéralocorticoïde au cours du développement de la surrénale fœtale en étudiant les voies Sonic Hedgehog et β -caténine.

RESULTATS

Article 1 :

Mastocytes et enzymes de la stéroïdogénèse dans la glande surrénale fœtale humaine

A. Naccache, E. Louiset, C. Duparc, A. Laquerriere, S. Patrier, S. Renouf, CE. Gomez-Sanchez, K. Mukai, H. Lefebvre, M. Castanet

Mol Cell Endocrinol. 2016 Oct 15;434:69-80

Résumé

Les mastocytes intra-surréaliens stimulent la production d'aldostérone dans les surrénales adultes normales et les adénomes de Conn par un mécanisme paracrine. Celui-ci fait intervenir la sécrétion locale de sérotonine (5-HT) et du récepteur sérotoninergique de type 4 (5-HT₄R) exprimé par les cellules de la zone glomérulée et les cellules adénomateuses productrices d'aldostérone. Jusqu'à présent, les études portant sur les facteurs de communication intercellulaire contrôlant le développement morphologique et fonctionnel de la surrénale ont révélé la participation de facteurs hormonaux et de facteurs de croissance. En revanche, l'impact des cellules immunitaires sur le développement du cortex surrénalien n'a à notre connaissance pas été exploré. Les mécanismes impliqués respectivement dans la tumorigénèse et le développement fœtal étant souvent similaires, nous avons émis l'hypothèse que les mastocytes pourraient jouer un rôle significatif dans le développement de la glande surrénale.

Dans cette étude, nous avons analysé la cinétique d'apparition des mastocytes et de l'expression des acteurs de la stéroïdogénèse par des études immunohistochimiques et RT-QPCR dans des surrénales fœtales humaines de 16 semaines d'aménorrhée (SA) jusqu'au terme.

La présence de mastocytes a été détectée dès le stade de 18 SA dans la zone sous-capsulaire. Le facteur de différenciation et de prolifération des mastocytes (ou *Stem Cell Factor*) a été détecté dès 16 SA. Les récepteurs du HDL et LDL cholestérol, voies d'entrée du cholestérol dans les cellules stéroïdogènes, sont présents dans la zone fœtale dès les premiers stades étudiés, puis apparaissent secondairement dans la zone définitive à partir de 24 SA.

Afin de corrélérer la présence des mastocytes à la mise en place des différentes enzymes de la stéroïdogénèse, des doubles immunomarquages ont été effectués. Ces marquages ont permis de montrer la co-localisation des mastocytes et des enzymes clefs de la synthèse d'aldostérone (3 β HSD et aldostérone synthase) dans la zone définitive. De plus, l'expression de la 3 β HSD est concomitante de l'apparition des mastocytes vers 18 SA, alors que celle de l'enzyme limitante de la synthèse d'aldostérone (aldostérone synthase) est objectivée 4 semaines plus tard. Ces données ont été confirmées par une étude de Q-PCR mettant en évidence l'expression croissante du gène *CYP11B2* (codant l'aldostérone synthase) à partir de 22 SA. En revanche, les expériences de co-marquage ont montré que les enzymes impliquées dans la synthèse de cortisol (17 α -hydroxylase et 11 β -hydroxylase) ne sont pas localisées dans la zone définitive quel que soit le stade.

Enfin, l'expression de la tryptophane hydroxylase (enzyme clef de la synthèse de 5-HT), et du 5-HT₄R s'intensifient fortement à 30 SA, précédant l'augmentation de l'expression de *CYP11B2*. Ces données font émettre l'hypothèse de l'implication de la voie sérotoninergique dans la production d'aldostérone au cours du développement.

L'ensemble des résultats montre pour la première fois la distribution des cellules sécrétrices de gluco- et minéralocorticoïdes dans la surrénale foetale avec une corrélation temporo-spatiale entre les mastocytes et les enzymes nécessaires à la production d'aldostérone. Cette observation suggère une contribution des mastocytes dans la mise en place de la synthèse des minéralocorticoïdes durant le développement, processus essentiel pour le maintien de l'homéostasie hydrosodée en période péri-natale.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal



Alexandre Naccache^a, Estelle Louiset^a, Céline Duparc^a, Annie Laquerrière^b,
Sophie Patrier^b, Sylvie Renouf^a, Celso E. Gomez-Sanchez^c, Kuniaki Mukai^d,
Hervé Lefebvre^{a,*}, Mireille Castanet^a

^a INSERM U982, Laboratory of Differentiation & Neuronal and Neuroendocrine Communication, Institute for Research and Innovation in Biomedicine, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

^b Pathology Laboratory, University Hospital of Rouen, Rouen, France

^c Endocrine Section, Department of Medicine, G.V. (Sonny) Montgomery VA Medical Center and University of Mississippi Medical Center, Jackson, MS, USA

^d Department of Biochemistry, School of Medicine, Keio University, Tokyo, 160-8582, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2016

Received in revised form

3 June 2016

Accepted 10 June 2016

Available online 11 June 2016

Keywords:

Human fetal adrenal

Mast cells

Serotonin

Microenvironment

Steroidogenesis

Aldosterone

ABSTRACT

Mast cells are present in the human adult adrenal with a potential role in the regulation of aldosterone secretion in both normal cortex and adrenocortical adenomas. We have investigated the human developing adrenal gland for the presence of mast cells in parallel with steroidogenic enzymes profile and serotonin signaling pathway. RT-QPCR and immunohistochemical studies were performed on adrenals at 16–41 weeks of gestation (WG). Tryptase-immunopositive mast cells were found from 18 WG in the adrenal subcapsular layer, close to 3 β HSD- and CYP11B2-immunoreactive cells, firstly detected at 18 and 24 WG, respectively. Tryptophan hydroxylase and serotonin receptor type 4 expression increased at 30 WG before the CYP11B2 expression surge. In addition, HDL and LDL cholesterol receptors were expressed in the subcapsular zone from 24 WG. Altogether, our findings suggest the implication of mast cells and serotonin in the establishment of the mineralocorticoid synthesizing pathway during fetal adrenal development.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The human fetal adrenal (HFA) cortex, which, like gonads, derives from the adreno-genital primordium, is organized by 7–8 weeks of gestation (WG) into two distinct parts: an inner fetal zone (FZ) accounting for 70–80% of the whole tissue and a thinner outer definitive zone (DZ) (Ishimoto and Jaffe, 2010). In addition, a third zone, called the transitional zone (TZ), is classically observed between the FZ and DZ during the second trimester of pregnancy. Quantification of steroid production during pregnancy and analysis

of steroidogenic enzyme expression profile have showed that active steroidogenesis occurs very early, as soon as 8 WG for androgen production (Goto et al., 2002; Mesiano and Jaffe, 1997). Steroidogenesis requires cholesterol either locally synthesized or retrieved from the circulating lipoproteins LDL and HDL via their specific receptors (Bochem et al., 2013; Liu et al., 2000). In adults, the HDL receptor, also named SRB1 (Scavenger receptor class B type 1), is crucial for adrenal cholesterol supply as demonstrated by altered corticosteroidogenesis in cases of SRB1 mutations (Vergeer et al., 2011). Although some *in vitro* studies have indicated that cholesterol uptake mainly occurs via the LDL receptor pathway in the developing adrenal (Carr et al., 1980, 1982), the demonstration of high levels of SRB1 mRNA in fetal glands suggest that HDL cholesterol could also be an important source of substrate for steroidogenesis in these tissues (Liu et al., 1997). Androgens, (dehydroepiandrosterone [DHEA] and its sulfate [DHEAS]), are the first steroids detected, owing to early expression of 17 α -hydroxylase (17 α -OH) in both the FZ and TZ (Narasaka et al., 2001). This androgen production is responsible for prenatal virilization of

* Corresponding author. INSERM U982, Department of Endocrinology, Institute for Research and Innovation in Biomedicine (IRIB), University Hospital of Rouen, 76031, Rouen Cedex, France.

E-mail addresses: alexandre.naccache@chu-rouen.fr (A. Naccache), estelle.louiset@univ-rouen.fr (E. Louiset), celine.duparc@univ-rouen.fr (C. Duparc), annie.laquerriere@chu-rouen.fr (A. Laquerrière), sophie.patrier@chu-rouen.fr (S. Patrier), sylvie.renouf@univ-rouen.fr (S. Renouf), Cgomez-sanchez@umc.edu (C.E. Gomez-Sanchez), mukaik@sc.itc.keio.ac.jp (K. Mukai), herve.lefebvre@chu-rouen.fr (H. Lefebvre), mireille.castanet@chu-rouen.fr (M. Castanet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.015>

0303-7207/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

female fetuses suffering from congenital adrenal hyperplasia (CAH) (Speiser and White, 2003).

Synthesis of mineralo- and glucocorticoids also requires 21-hydroxylase (21-OH) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD). 21-OH immunoreactivity is visualized in the fetal adrenal as soon as 14 WG (Coulter and Jaffe, 1998; Narasaka et al., 2001). However, the accurate timing of 3 β HSD expression is still controversial, since Narasaka et al. observed the presence of the enzyme in the TZ from 22 WG (Narasaka et al., 2001) while Folligan et al. detected 3 β HSD from 16 WG (Folligan et al., 2005). In addition, Goto et al. reported an earlier 3 β HSD expression from the first trimester of pregnancy with transient cortisol secretion at 8–10 WG (Goto, 2006), a finding which also suggests expression of 11 β -hydroxylase (11 β -OH) during this period. However, to our knowledge, the timing of 11 β -OH expression in the fetal human adrenal has never been studied. Similarly, the fetal expression profile of aldosterone synthase, the key enzyme for aldosterone synthesis encoded by *CYP11B2*, has not been analyzed so that the capacity of the fetal adrenal to produce aldosterone remains a matter of debate.

It is now considered that cell-to-cell interactions are critical for organogenesis in mammals (Durdu et al., 2014). Recent studies have emphasized the role of immune cells in testis morphogenesis during which macrophages have been demonstrated to play a major role in the establishment of organ vascularization and architecture (DeFalco et al., 2014; Zhang et al., 2014). However, the involvement of adrenocortical cell microenvironment in adrenal development has not yet been investigated. In the human adult adrenal, adrenocortical cells interact with various types of immune cells which control their mitogenic and secretory activities (Kanczkowski et al., 2015). We have previously demonstrated that mast cells, located in the subcapsular region of the gland, stimulate aldosterone secretion through a paracrine mechanism involving local release of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) and activation of 5-HT₄ receptors (Lefebvre et al., 2001). Consistent with this observation, incubation of the human adrenocortical cell line H295R with human mast cell line (LAD2)-conditioned medium provokes an increase in *CYP11B2* expression and aldosterone production (Duparc et al., 2015). Resident mast cells may also be involved in the pathophysiology of adrenal disorders. In fact, a positive correlation between adrenal mast cell density and plasma aldosterone levels was found in a subset of aldosterone-producing adenomas, arguing for a role of mast cells in aldosterone hypersecretion (Duparc et al., 2015). All these observations strongly suggest that mast cells may control mineralocorticoid synthesis and secretion in both physiological and pathophysiological conditions. As mast cells have been noticed in various fetal tissues (Chen et al., 2004; Noack et al., 2005; Raica et al., 2010), their presence in the human fetal adrenal gland may also be hypothesized with a particular role in the establishment of the mineralocorticoid production.

To test this hypothesis, we thus investigated the presence of mast cells in correlation with steroidogenic enzyme expression in the human developing adrenal gland.

2. Materials and methods

2.1. Tissue collection

Human fetal adrenal-kidney complexes (n = 33) from 16 to 41 WG were obtained at the time of autopsy performed either after medical terminations of the pregnancies for neurological or cardiac malformations (n = 12), spontaneous abortions (n = 10) or *in utero* death (n = 11) mainly due to chorioamnionitis. Medical termination of pregnancies had been approved by the local ethics committee of

our Prenatal Diagnosis Multidisciplinary Center according to the French Law. In each case, a complete autopsy had been performed after informed consent of parents. All adrenal glands were macroscopically and microscopically free of any lesion.

Specimens for immunohistochemistry (n = 28) were formalin-fixed, embedded in paraffin and then cut into 5 μ m sections. Adrenal samples for RNA extraction (n = 8, one sample for 18, 22, 29, 30, 33 and 41 WG, two samples for 24 WG) were immediately frozen for cryopreservation.

Normal adult adrenals from patients undergoing expanded nephrectomy for kidney cancer or brain-dead organ donors were used as positive controls for all immunohistochemistry experiments except for mast cell relative proteins immunohistochemistry for which human mastocytomas were employed as reference tissues. The kidney tissues present on the sections of fetal adrenal-kidney complexes were used as negative controls for the diverse immunostainings (Fig. S2A, B and C). The protocol of collection of the tissues and the experimental procedures were approved by the regional ethics committees and the French Agence Nationale de Biomédecine. Written informed consent from patient's relatives was obtained for all subjects.

2.2. Methods

2.2.1. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as previously reported (Duparc et al., 2015). Briefly, after deparaffinization and rehydration, tissue sections were heated with either a trypsin solution at 37 °C for 15 min (SIGMA, St. Louis, USA) or 0.01 M Na citrate buffer solution (pH = 6) at 95 °C for 20 min, for antigen retrieval. They were then treated with peroxidase and alkaline phosphatase blocking solution (Dako, Trappes, France) for 5 min. Tissue sections were incubated with the different primary antibodies described in Table S1. The sections were then incubated with a streptavidin–biotin–peroxidase or alkaline phosphatase complex. Immunoreactivities were revealed using either EnVision + System-HRP kit or Envision TM G/2 doublestain kit (Dako). Sections were finally counterstained with hematoxylin, mounted in Eukitt (Kindler, Freiburg, Germany), then cover-slipped.

For each fetal stage, one to three adrenal tissue sections were analyzed as well as sections from adult adrenal gland as control tissues.

2.2.2. Analysis of immunohistochemical data

Digital images were captured using an Eclipse E-600 microscope equipped with a CCD DXC950 camera and recorded using the Nis Elements BR software 4.0 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Immunoreactivity was semi-quantitatively assessed using McCarty's H-scoring system, in which the percentage of stained cells is multiplied by a number, 0–3, reflecting the intensity of the signal (McCarty et al., 1985). The relative intensities of immunoreactivity were characterized as not present (0), weak but detectable above control (1+), distinct (2+), and very strong (3+). Digital images of twenty separate square-shaped areas (total area 0.3 mm²) within the definitive zone were analyzed to evaluate the H scores. This analysis was performed in duplicate by 2 independent observers with the assistance of two expert fetopathologists. Final H-scores were determined as the average of all the values obtained for each section analysis. An illustration of H-score determinations is presented in supplemental data (Fig. S3).

Mast cells density was evaluated using the Mercator image analysis software (ExploraNova, La Rochelle, France) on the Cell Imaging Platform of Normandy (PRIMACEN, University of Rouen). Mast cells were identified as immunopositive cells for the mast cell specific protease tryptase or/and CD117 (Duparc et al., 2015). In

each tissue section, the distribution of mast cells in the different zones of the fetal cortex was evaluated by the percentage of tryptase immunopositive cells within the 3 β HSD-immunopositive or the 17 α -OH immunonegative areas relative to the whole tissue surface. The 3 β HSD-positive cells areas were defined at low magnification to establish the section maps and quantify surface areas. Tryptase immunopositive cells were then counted at high magnification in 3 β HSD-positive areas to assess mast cell density which was expressed as the number of tryptase-positive cells per mm².

2.2.3. Real-time RT-PCR analysis

Total RNAs were extracted from frozen tissues by using Tri Reagent (Sigma) and purified using NucleoSpin[®] RNA kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). Quality of RNAs was controlled by Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Gene expression was studied by real-time polymerase chain reaction by using a Fast RT-PCR system and SYBR Green PCR core reagents (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) with primers listed in Table S2. Quantification of cDNAs was normalized to *TATA box binding protein (TBP)* and *human porphobilinogen deaminase (PBGD)* cDNAs by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Fetal mRNA transcripts were quantified in comparison with human adult adrenal poly A⁺ RNA (Clontech, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Each sample was analyzed in duplicates in three different experiments.

3. Results

3.1. Mast cells in the human fetal adrenal gland

To assess the presence of mast cells in the fetal adrenal gland, we analyzed *TPSAB1* mRNA, encoding tryptase (specific mast cell protease), and found detectable levels from the first fetal stage studied, i.e. 18 WG. In addition, *TPSAB1* transcript levels showed a trend towards increase from 22 WG (0.094 \pm 0.09) to 33 WG (0.508 \pm 0.12) (Fig. 1A). The occurrence of mast cells in the developing gland was confirmed by immunohistochemistry using both tryptase and CD117 (or Stem Cell Factor [SCF] receptor) antibodies. We detected CD117-immunopositive cells as soon as 16 WG and few tryptase positive cells from 18 WG (Fig. 1B), both mainly located in the subcapsular layer of adrenal cortex. Furthermore, double immunostaining with antibodies to tryptase and the endothelial cell markers CD34 or CD31, revealed that mast cells were close to blood vessels (Fig. 1C).

In all organs, differentiation and proliferation of resident mast cells are driven by *SCF* (also named *KIT Ligand*) which is synthesized and released by cells of the host tissue (Schmetzer et al., 2016). We found that, in the fetal adrenal, *SCF* mRNA could be detected from the first fetal stage studied, i.e. 18 WG, at lower levels than in the adult adrenal tissues (0.41 \pm 0.05). Transcript levels subsequently increased until 30 WG (6.82 \pm 1.07) and tended to decrease at later stages (Fig. S1A). In addition, immunohistochemistry revealed the presence of SCF staining in the subcapsular layer of the gland as soon as 16 WG (Fig. S1B).

3.2. Expression pattern of cholesterol receptors in human fetal adrenal gland

3.2.1. SRB1 expression

Expression analysis of *SRB1*, encoding HDL receptor, revealed increasing transcripts levels from 18 (0.49 \pm 0.14) to 24 WG (1.05 \pm 0.31), up to mRNA levels similar to those observed in the adult adrenal. At following stages, transcripts were expressed at lower levels (0.62 \pm 0.88 at 41 WG) (Fig. 2A). SRB1 labeling revealed

an intense immunoreactivity in both the TZ and FZ as soon as 16 WG (data not shown) whereas few immunopositive cells in the DZ could be detected up to 22 WG (Fig. 2B). Subsequently, SRB1 immunostaining extended throughout the cortex and increased in intensity as illustrated by the H-score that reached high levels at 40 WG (279 \pm 17.8) Fig. 9B. At high magnification, SRB1 immunoreactivity was observed at both plasma membrane and cytoplasmic levels (Fig. 2B). In the DZ, adrenocortical cells presented as compact cells with small nucleo-cytoplasmic ratios before 24 WG. Interestingly, expression of SRB1 was concomitant with the appearance of large intracytoplasmic lipid droplets, probably indicative of the onset of steroidogenic activity (Fig. 2B).

3.2.2. LDL receptor expression

LDLR mRNA analysis showed high transcripts levels at 18 and 22 WG (5.48 \pm 1.39 and 9.42 \pm 3.71, respectively), that were markedly higher than in the adult gland. At following stages, *LDLR* expression decreased to reach transcripts levels similar to those observed in adult tissue (Fig. 3A). Immunostaining revealed the presence of LDL receptor only in the FZ at the first stage studied. From 24 WG, immunoreactive cells appeared in the DZ. Distribution and intensity of immunolabelling in the DZ increased throughout the adrenal development (Fig. 3B), as illustrated by the LDL-R H-score (Fig. 9B). By contrast, expression of LDL receptor decreased in the FZ in the same time (Fig. 3B).

3.3. Expression pattern of steroidogenic enzymes

3.3.1. 17 α -OH expression

Analysis of *CYP17A1* mRNA expression revealed high levels of transcript at 18 WG and 22 WG (3.09 \pm 0.13 and 1.38 \pm 0.23, respectively). From 24 WG to 33 WG, transcripts levels were clearly lower to that observed in the adult adrenal gland, but increased later at 41 WG (0.82 \pm 0.20) (Fig. 4A). Labeling of adrenal slices with 17 α -OH antibodies revealed intense immunostaining in both the FZ and TZ in all studied stages from 16 to 40 WG (Fig. 4B) but no immunoreactive cells in the DZ. The H-score of 17 α -OH in the definitive zone remained very low in each fetal stage analyzed (Fig. 9B).

3.3.2. 3 β HSD expression

HSD3B2 mRNA was detectable in all the 7 fetal adrenal tissues studied but at much lower levels than in adult adrenal tissues, although gradually increasing during development, from 0.0012 \pm 0.0005 to 0.45 \pm 0.03 at 18 and 41 WG, respectively (Fig. 4A). Immunohistochemistry showed the presence of 3 β HSD-immunopositive cells arranged in few clusters from 18 WG up to 22 WG in the DZ and TZ. 3 β HSD staining then extended to the whole subcapsular layer (Fig. 4B). After 24 WG, 3 β HSD labeling intensity tended to increase while the staining surface remained roughly conserved (around 100–150 μ m), except at the last fetal stages, where 3 β HSD immunopositive surface became larger. The H-score of 3 β HSD in the DZ remained at low levels until 20 WG, and then progressively increased between 22 and 40 WG (281.7 \pm 17.2 at 40 WG) (Fig. 9B).

3.3.3. 11 β -OH expression

CYP11B1 transcripts were detectable from the first stage studied at 18 WG (0.07 \pm 0.04). Transcripts levels remained at modest levels from 22 to 29 WG, then gradually increased and reached similar levels than those of adult adrenal tissues at 41 WG (1.32 \pm 0.10) (Fig. 5A). Immunohistochemistry allowed detection of 11 β -OH in the cytoplasm of adrenocortical cells from 16 WG using a specific 11 β -OH antibody (Gomez-Sanchez et al., 2014). Immunopositive cells were present in both the TZ and FZ in all studied stages except

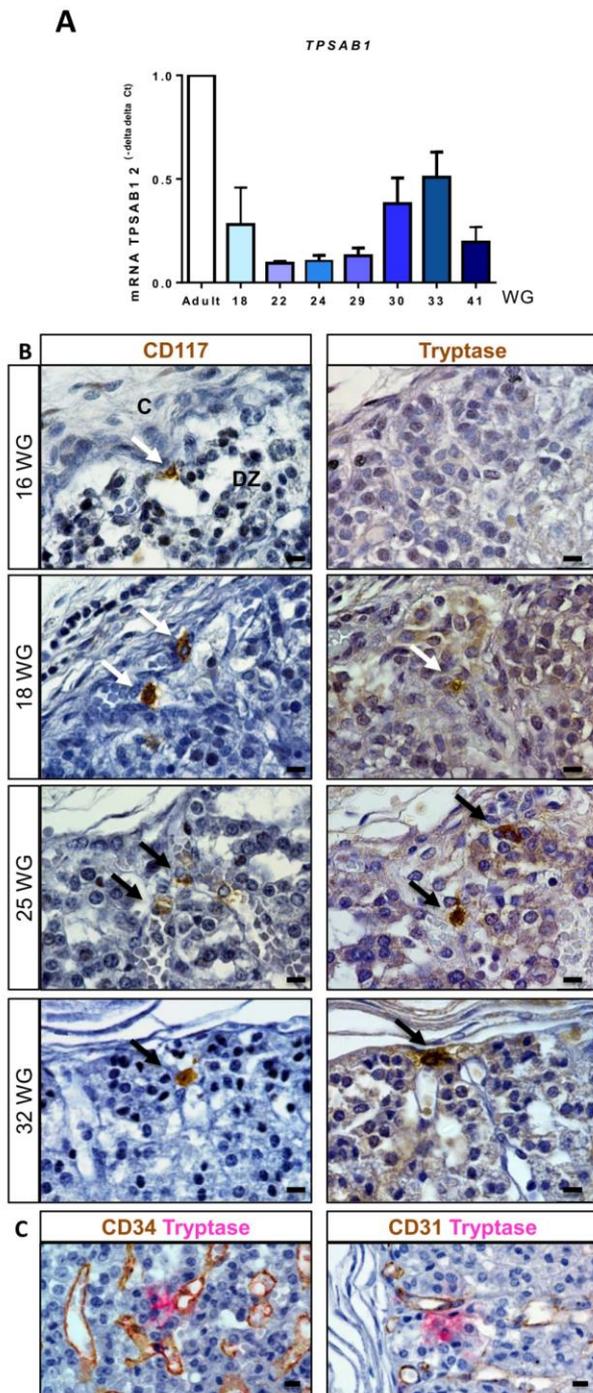


Fig. 1. Distribution of mast cells in the human fetal adrenal gland. (A) Quantification of *TPSAB1* mRNA levels in human fetal adrenals (HFA) at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 weeks of gestation (WG) compared to adult transcript levels. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) Detection of mast cells using CD117 and tryptase antibodies in the HFA at 16, 18, 25 and 32 WG. CD117-positive cells (arrows) were firstly detected at 16 WG in the subcapsular zone, while first tryptase-positive cells (arrows) were observed at 18 WG. Both CD117 and tryptase immunoreactivities were present from 18 to 32 WG. The scale bar represents 10 μ m. (C) Distribution of tryptase-positive cells (pink; black arrows) and CD34- or CD31-positive cells (brown) in the subcapsular region of the cortex at 26 WG. The scale bar represents 50 μ m on the left column and 10 μ m on the right column. C: Capsule, DZ: Definitive Zone.

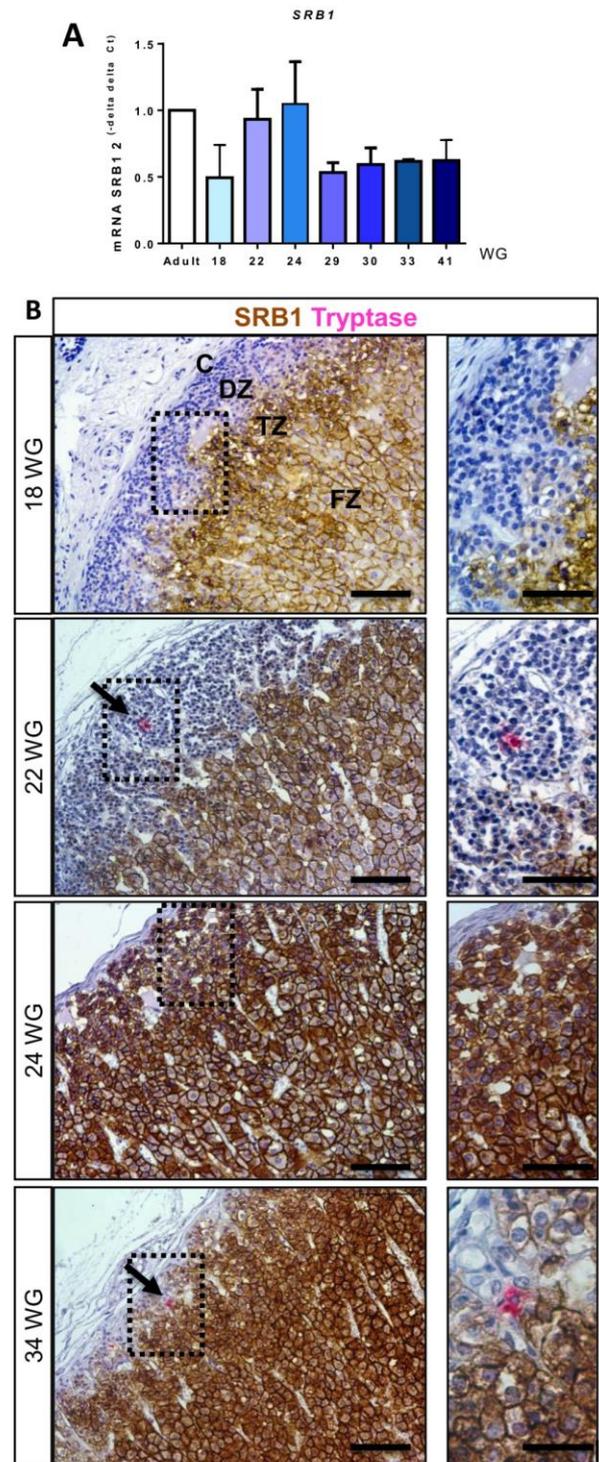


Fig. 2. Distribution of SRB1 and tryptase in the human fetal adrenal gland. (A) Quantification of *SRB1* mRNA levels in human fetal adrenal (HFA) at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 weeks of gestation (WG) compared to adult transcript levels. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) SRB1 (brown) and tryptase (pink; black arrows) immunoreactivity in human fetal adrenal gland at 18, 22, 24 and 34 WG. SRB1-positive cells are initially localized in both the TZ and FZ, and extend from 24 WG to the DZ. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone, FZ: Fetal Zone. The scale bar represents 100 μ m on the left column and 50 μ m on the right column.

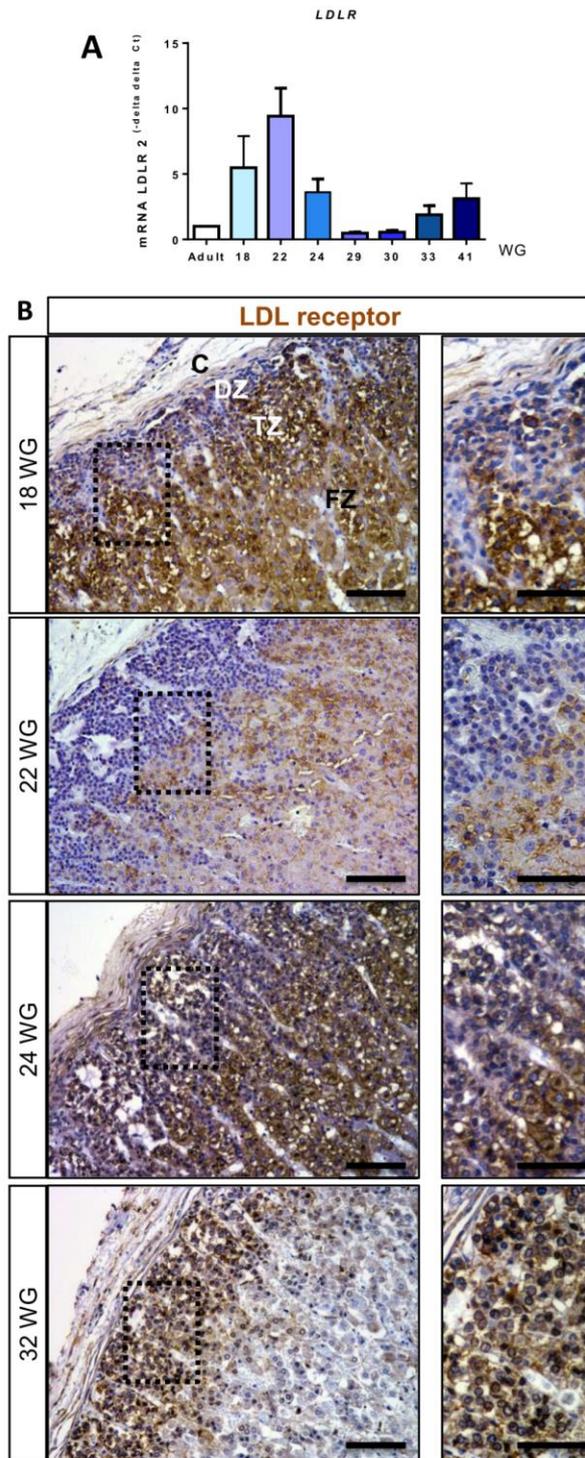


Fig. 3. Distribution of LDL receptor in the human fetal adrenal gland. (A) Quantification of *LDLR* mRNA levels in human fetal adrenal (HFA) at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 weeks of gestation (WG) compared to adult transcript levels. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) LDL receptor immunoreactivity in human adrenal fetal gland at 18, 22, 24 and 32 WG. LDL receptor-positive cells are initially localized in the FZ, and extend gradually from 24 WG to the DZ. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone, FZ: Fetal Zone. The scale bar represents 100 μ m on the left column and 50 μ m on the right column.

the late fetal period, when expression of the protein appeared limited to the TZ (Fig. 5B). Little or no signal was detected in the DZ in all the fetal stages studied (Fig. 5B & Fig. 9B).

3.3.4. Aldosterone synthase expression

In comparison with *CYP11B1* mRNAs, *CYP11B2* transcripts were detectable at much lower levels before 33 WG. *CYP11B2* expression stayed at constant low level from 18 to 30 WG (0.03 ± 0.001 and 0.05 ± 0.02 , respectively), then increased to similar level than those observed in the adult adrenal tissues at 41 WG (1.12 ± 0.10) (Fig. 6A). Occurrence of aldosterone synthase in the fetal tissues was confirmed by immunohistochemistry using a specific antibody (Nishimoto et al., 2010). Aldosterone synthase immunoreactivity became detectable from 24–25 WG. Labeling was initially restricted to few cell clusters in the DZ and then extended from 28 WG to the whole subcapsular layer with a gradual increasing intensity throughout the adrenal development. These data were confirmed by the semi-quantitative analysis showing a low H-score between 24 and 28 WG, increasing up to 87.6 ± 33.1 thereafter (Fig. 9B). Moreover, double immunostaining using tryptase and aldosterone synthase antibodies showed that, in the majority of cases, mast cells were localized close to mineralocorticoid-producing cells (Fig. 6B).

3.4. Distribution and density of mast cells during adrenal development

Before 24 WG, mast cells were too rarely observed to quantify their density. In later stages, evaluation of mast cell distribution revealed that 96.4% [83.7–100%] of the cells were located within the 3 β HSD-positive area (Fig. 4B). In the other hand, double immunostaining using antibody to tryptase and 17 α -OH revealed that 92.8% of tryptase immunopositive cells were located outside the 17 α -OH positive immunostaining zone, varying from 84 to 100% depending on the gestational age (Fig. 4B). Taken together, these results indicate that the vast majority of mast cells is located in the DZ. Globally, the mean density of mast cells in 3 β HSD-positive areas was estimated at 3.14/mm² [0–6.21] with no substantial variation from 24 to 40 WG (Fig. 7).

3.5. Expression pattern of serotonin pathway

3.5.1. 5-HT₄ receptor expression

HTR4 mRNA expression was detected from 18 WG at very low level (0.04 ± 0.003), then it became similar to that observed in the adult gland from 24 to 29 WG, (0.76 ± 0.31) and greatly increased from 30 WG until 41 WG (7.47 ± 1.24) (Fig. 8A). Immunohistochemistry revealed various 5-HT type 4 receptor localization depending on the fetal stage. Immunostaining was present within the TZ at 22 WG, then expanded to the FZ at 25 WG, and was restricted to the DZ from 28 WG (Fig. 8B).

3.5.2. Tryptophan hydroxylase 1 expression

To assess 5-HT synthesis, we analyzed expression of *tryptophan hydroxylase 1* (*TPH1*), encoding the rate-limiting enzyme that catalyzes 5-HT biosynthesis. *TPH1* mRNAs were found in fetal adrenal as soon as 18 WG (Fig. 8A). Expression levels gradually increased until 29 WG, then peaked at levels higher than in the adult gland at 30–33WG, (1.87 ± 0.44 and 1.59 ± 0.24 , respectively), and strongly decreased at 40 WG.

4. Discussion

Previous investigations have revealed that mast cells control the secretory activity of aldosterone-producing cells in the adult

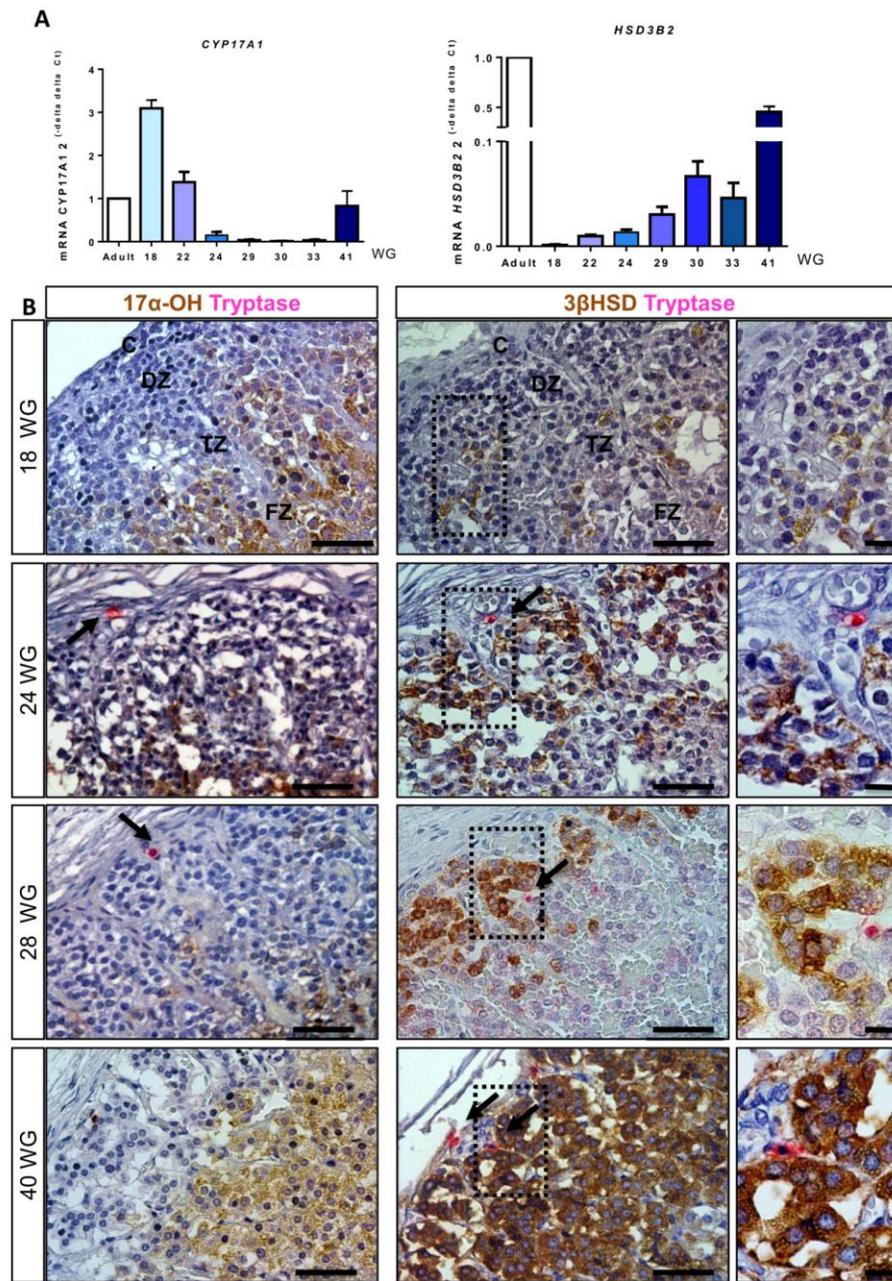


Fig. 4. 17 α -OH and 3 β HSD expression in the human fetal adrenal gland. (A) *CYP17A1* and *HSD3B2* mRNA analysis in human fetal adrenal gland (HFA) at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 WG compared to adult transcript levels. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) Profile of immunohistochemistry for 17 α -OH or 3 β HSD (in brown) and tryptase (in pink, black arrows) in the HFA. 17 α -OH immunoreactive cells were early detected in both the FZ and TZ, at a distance from mast cells (showed at 18 WG here) while 3 β HSD immunoreactive cells were detected from 18 WG in both the DZ and TZ, close to mast cells. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone, FZ: Fetal Zone. The scale bar represents 50 μ m on the left and center column and 10 μ m on the right column.

adrenal gland (Lefebvre et al., 2001). The present study demonstrates for the first time the presence of mast cells in the subcapsular region of the human fetal adrenal gland from 16–18 WG. In addition, our results show a spatiotemporal correlation with 3 β HSD and aldosterone synthase expression, suggesting that mast cells may play a significant role in the establishment of the

mineralocorticoid synthesizing pathway in the developing adrenal.

Mast cells were identified in the fetal adrenal tissues using two different antibodies directed against CD117, also named C-Kit receptor, and tryptase. CD117 is a non-specific marker of mast cells, as various myeloid cells express the c-kit receptor on their surface (Murdoch et al., 2008), while tryptase is a protease secreted by

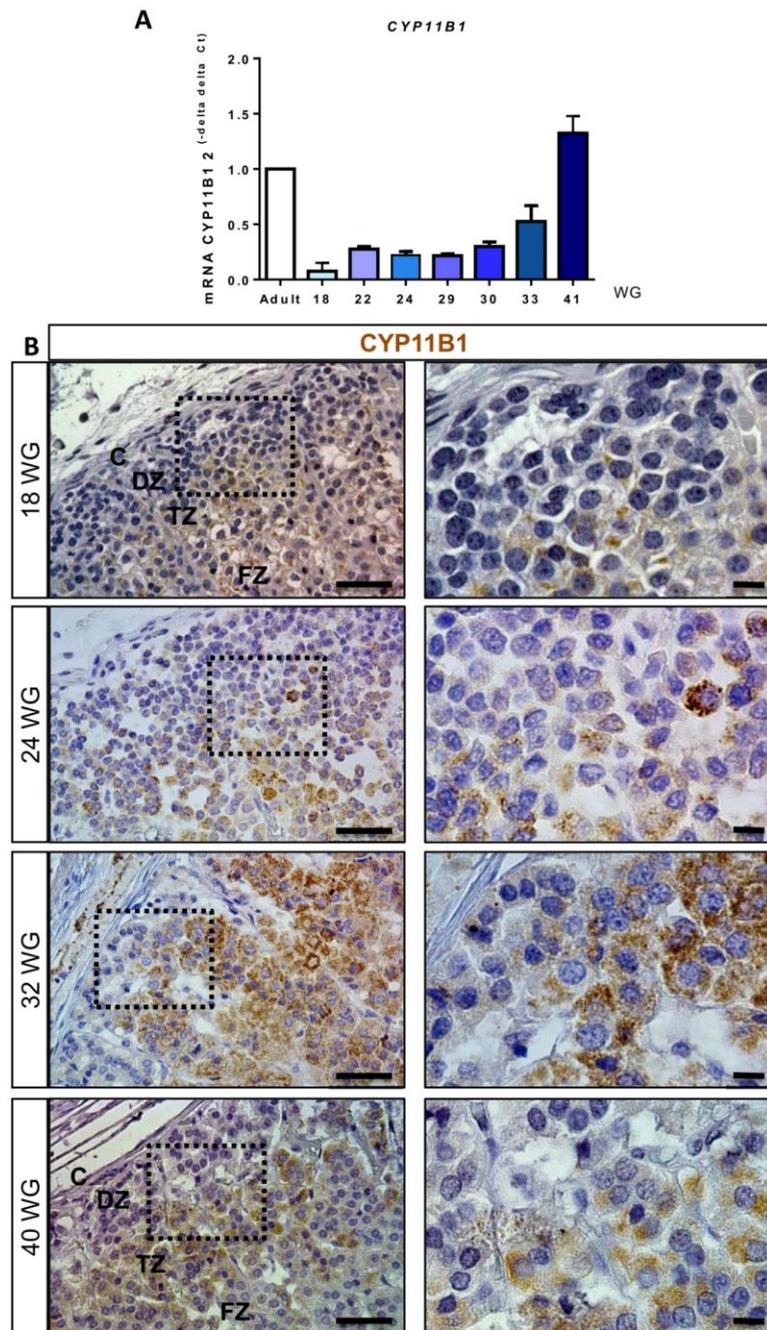


Fig. 5. 11 β -OH expression in the human fetal adrenal gland. (A) Quantification of *CYP11B1* transcript levels in human fetal adrenal gland at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 WG compared to adult expression. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) 11 β -OH immunohistochemistry (brown) in the human fetal adrenal gland. Immunopositive cells were detected from the first stages studied, initially in the TZ and FZ and exclusively in the TZ only at 40 WG. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone, FZ: Fetal Zone. The scale bar represents 50 μ m on the left column and 10 μ m on the right column.

mast cells only. In addition, tryptase expression is thought to witness mast cells maturation (de Souza et al., 2012). Herein, we observed CD117 immunostaining from 16 WG and tryptase immunoreactivity from 18 WG in the subcapsular zone of the cortex, suggesting that mast cell maturation occurs at 18 WG after a

two-week period in an immature stage. As expected, detection of CD117 is spatially and temporally correlated with SCF expression, SCF being a major chemoattractant agent for mast cells. As a result, mast cells and SCF immunoreactivity are observed in the same areas in the diverse organs (Theoharides et al., 2015). The

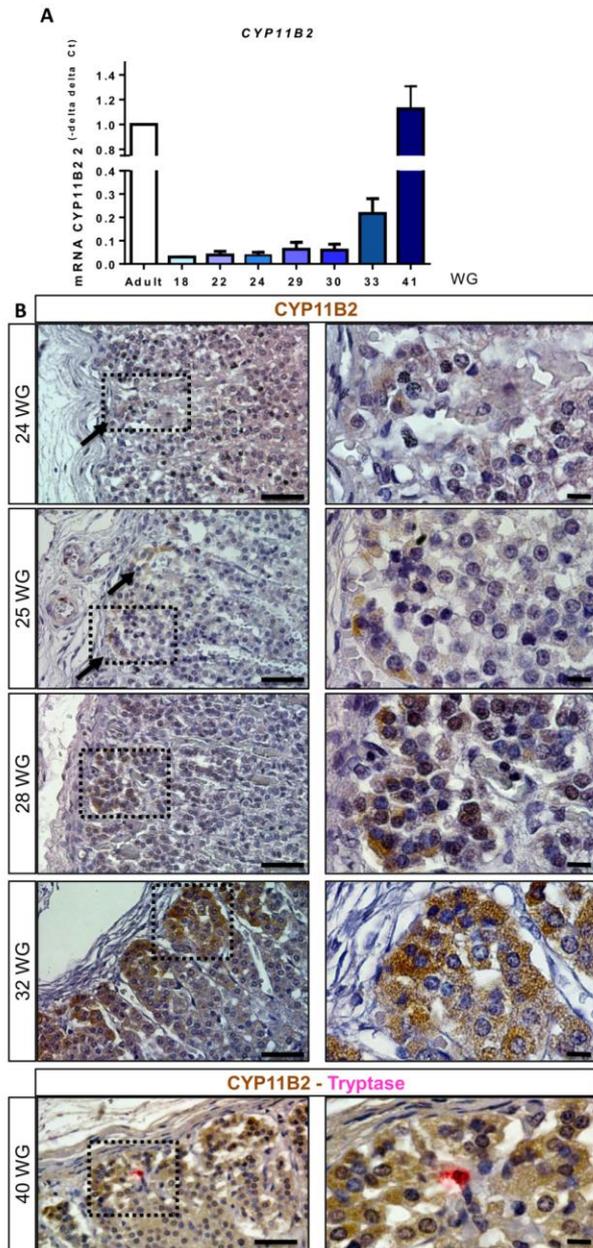


Fig. 6. Aldosterone synthase expression in the human fetal adrenal gland. (A) Quantification of *CYP11B2* transcript levels in human fetal adrenal gland at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 WG compared to adult transcript levels. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) Immunohistochemistry of aldosterone synthase (brown, black arrows) and tryptase (pink) in the human fetal adrenal gland. Aldosterone synthase immunopositive cells were detected from 24 WG in the subcapsular region of the cortex. The staining became more intense during development, appearing in close contact with tryptase immunopositive cells at 40 WG. The scale bar represents 50 μ m on the left column and 10 μ m on the right column.

observation that *SCF* mRNA levels are much higher in the fetal adrenal than in the adult gland suggests that localization and differentiation of mast cells in the developing cortex may represent

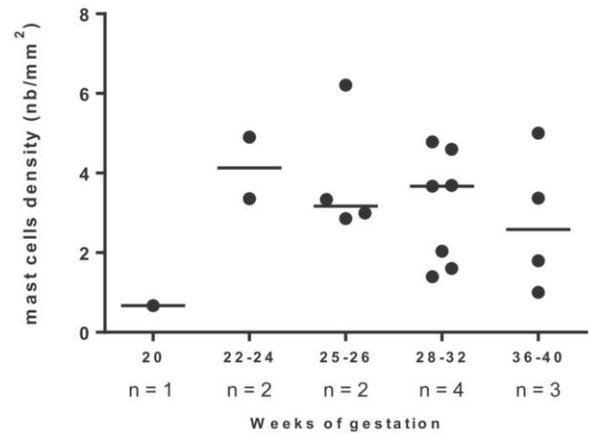


Fig. 7. Mast cell density in the human fetal adrenal gland. Tryptase immunoreactive cells density (nb/mm²) in the 3 β HSD-positive or the 17 α -OH immunonegative areas in human fetal adrenal gland at 20, 22–24, 25–26, 28–32, 36–40 WG. Each point represents a measure of density. For each gestational age, “n” designates the number of fetal tissues studied and the median value is indicated by the horizontal bar.

important processes for adrenal organogenesis.

Steroidogenesis requires cholesterol uptake from circulating lipoproteins via the HDL and LDL receptors. In the fetal human adrenal gland, the sole analysis of HDL receptor transcript has been published so far. In the present study, we showed that the HDL receptor (*i.e.* SRB1) is expressed in the fetal zone of the developing adrenal gland where steroidogenesis initiates. In addition, SRB1 expression extended to the definitive zone from 24 WG, a phenomenon which appears contemporary to the appearance of large lipid droplets in the cytoplasm of adrenocortical cells. We have also investigated for the first time the distribution of the LDL receptor and showed its expression in the DZ from the first stage studied, but in less intensity than in the FZ until 24 WG. Moreover, we observed a gradual increase in both HDL and LDL receptors expression in the DZ from 24 WG, suggesting that both receptors play a significant role in the adrenal cholesterol supply in the DZ during the development of the gland.

Our immunochemical studies indicate that 3 β HSD is expressed in the DZ of the developing adrenal gland from 18 WG, data intermediate between those reported by Folligan et al. and Narasaka et al. who detected 3 β HSD expression from 16 and 22 WG, respectively (Folligan et al., 2005; Narasaka et al., 2001). These discrepancies may result from various factors including uncertainty about the estimations of the fetal terms, potential involvement of fetal diseases not mentioned in those studies, and/or different sensitivities of the immunohistochemical methods used to detect 3 β HSD. In our study, the fetal age was assessed using precise biometric parameters obtained at the time of autopsy.

We describe for the first time the distinct CYP11B1 and CYP11B2 expression patterns during human adrenal development, through the use of 2 specific antibodies recently developed (Gomez-Sanchez et al., 2014; Nishimoto et al., 2010). Early expression of 11 β -hydroxylase was observed from the first fetal stage studied (*i.e.* 16 WG) in both the FZ and TZ, similarly to 17 α -OH expression. The presence of aldosterone synthase was detected after 24 WG in the DZ, and thus preceded by 3 β HSD expression. It is interesting to notice that *CYP11B2* mRNA could be detected at earlier stages, *i.e.* 18 WG in our study and even 15–19 WG according to the previous report by Pezzi et al. (Pezzi et al., 2003), suggesting that the *CYP11B2* transcript may not be translated into protein during its first weeks of expression. Conversely, as previously reported by

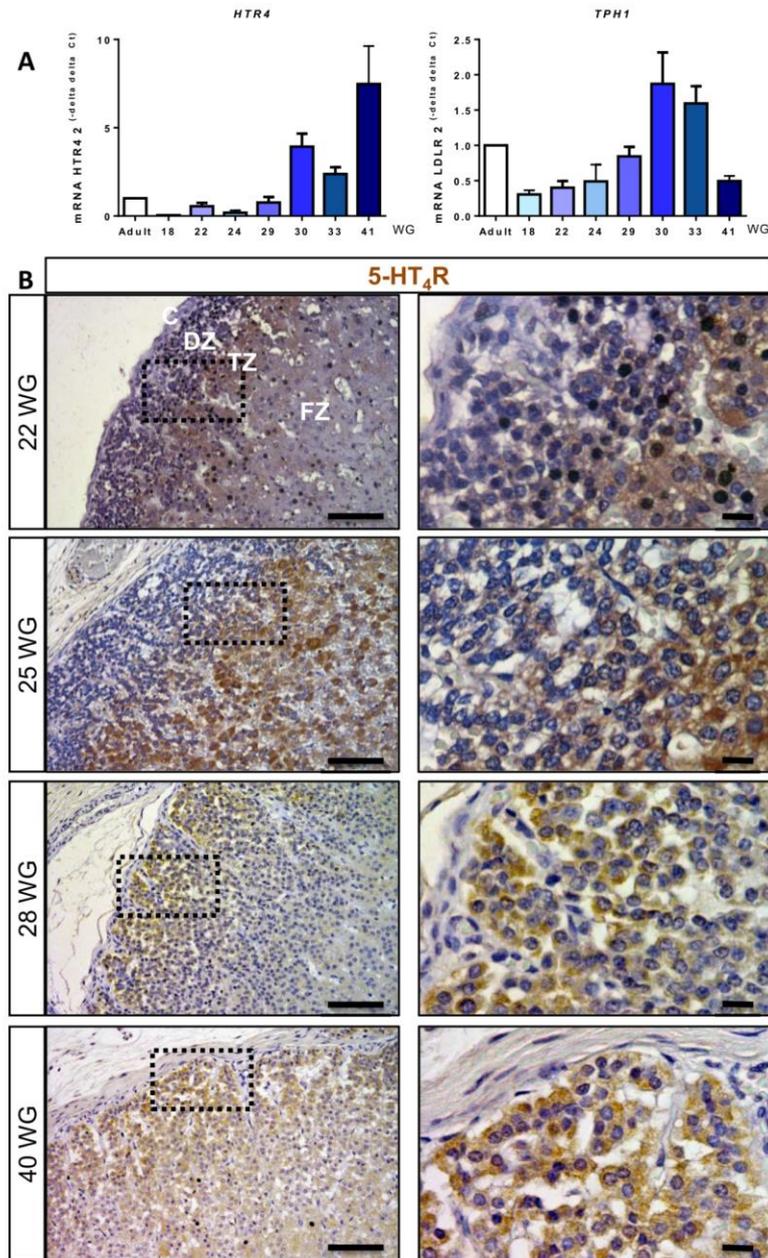


Fig. 8. Serotonin pathway expression in the human fetal adrenal gland. (A) Quantification of *HTR4* and *TPH1* transcript levels in human fetal adrenal gland at 18, 22, 24, 29, 30, 33 and 41 WG compared to adult transcript levels. Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in one sample at each stage of development. (B) 5-HT₄R immunohistochemistry (brown) in the human fetal adrenal gland. Immunopositive cells were detected in the TZ at 22 WG, extending to the FZ from 25 WG, and were then localized in the DZ at 28 and 40 WG. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone, FZ: Fetal Zone. The scale bar represents 50 μ m on the left column and 10 μ m on the right column.

Rehman et al. (Rehman et al., 2003), quantification of other steroidogenic enzyme (17α -OH and 3β HSD) mRNAs revealed very low transcript levels in comparison with adult adrenals, contrasting with the high intensity of the immunohistochemical signals. All these data could indicate that, in the developing adrenal, the regulation of protein synthesis is, at least in part, independent of mRNA levels. However, these data need to be confirmed in a larger

series of fetal tissues.

Based on the localization of steroidogenic enzymes described in the present study, together with the known detection pattern of 21 -OH in the 3 fetal zones, it could be hypothesized that fetal cortisol production, which requires 17α -OH, 3β HSD, 21 -OH and CYP11B1, occurs in the transitional zone corresponding thus to the adult zona fasciculata. Similarly, aldosterone production, necessitating 3β HSD,

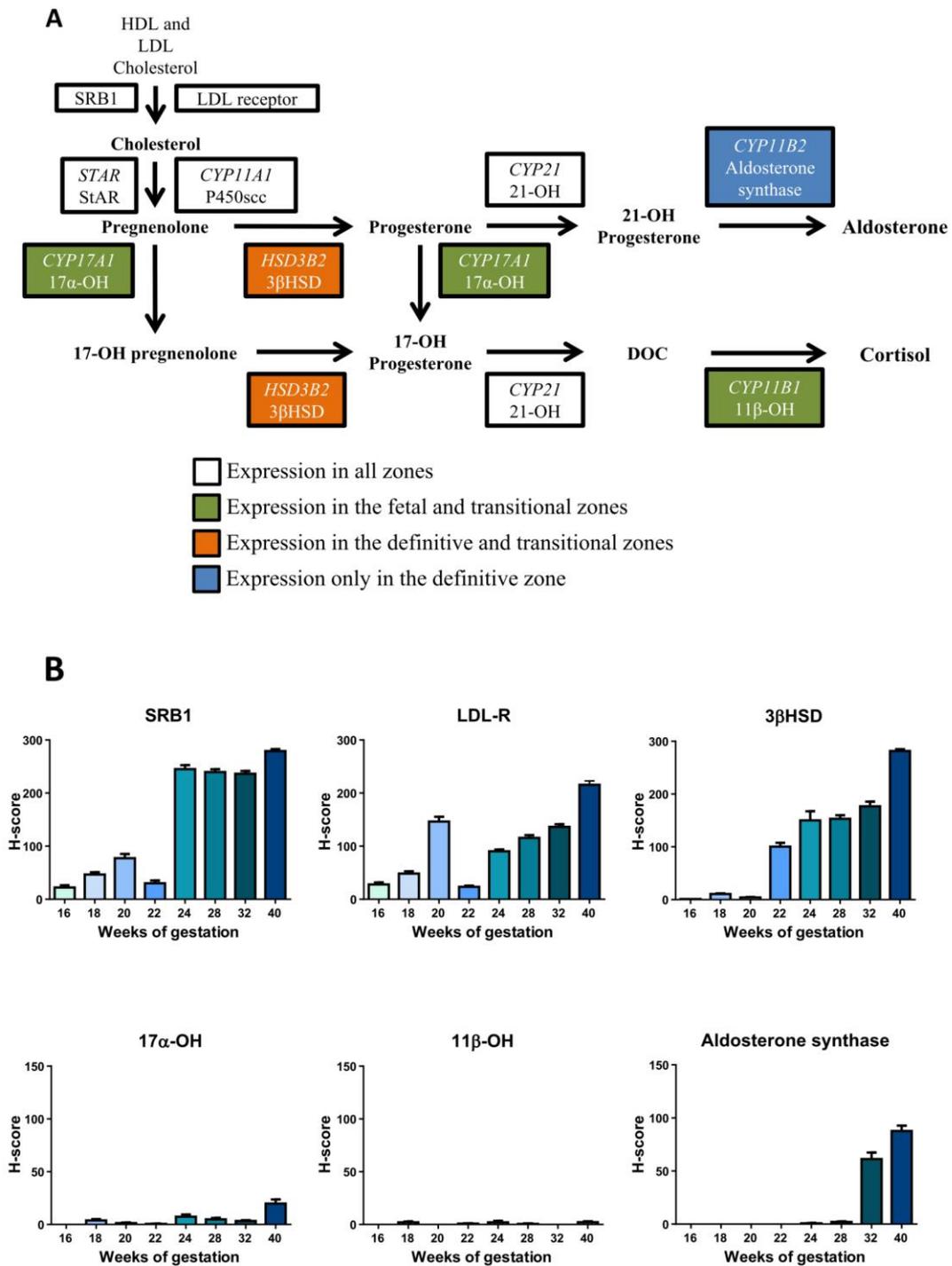


Fig. 9. Steroidogenesis pathway in the human fetal adrenal. (A) Schematic representation of the genes encoding the diverse steroidogenic enzymes involved in the aldosterone and cortisol synthesis pathways and their localization in the human fetal adrenal gland. STAR and CYP11A1 encode the Steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450 11A1, respectively. (B) H-scores of tryptase, SRB1, LDL receptor, 3βHSD, 17α-OH, 11β-OH and aldosterone synthase in the definitive zone of the human fetal adrenal from 16 to 40 WG. Data represent the mean ± SEM.

21-OH and CYP11B2, could occur in the DZ which is the counterpart of the zona glomerulosa of the adult adrenal cortex (Fig. 9A). In addition, the restriction of CYP11B1 expression to the TZ around

birth may indicate that the adult zona fasciculata is the continuation of this fetal zone. We observed no cell co-expression of 11β-OH and aldosterone synthase, demonstrating that the occurrences of

these enzymes are mutually exclusive, as reported in the human adult adrenal (Gomez-Sanchez et al., 2014). Interestingly, aldosterone synthase was expressed in the whole subcapsular layer in the fetal gland around birth while, in the adult gland, aldosterone synthase is only detected in cell clusters, named aldosterone-producing cell clusters (APCC), disseminated within the zona glomerulosa (Nakamura et al., 2014). This observation is in accordance with the higher aldosterone secretion levels previously reported in newborns in comparison with their mothers (Martinierie et al., 2009a).

Timing of fetal cortisol and aldosterone production still remains a matter of debate. On the basis of the results obtained in the present study, it could be suggested that cortisol and aldosterone secretions respectively arise from 18–20 WG and 22–24 WG. This interpretation is supported by Bagnoli et al. who detected cortisol in cord plasma of preterm children from 21 WG (Bagnoli et al., 2013) and Martinierie et al., who reported measurable aldosterone levels in cord blood of preterm infants born between 26 and 32 WG (Martinierie et al., 2015). The comprehension of the mechanisms involved in the establishment of mineralocorticoid synthesis is extremely important for the management of the salt wasting disorders frequently observed in extreme preterm neonates (Barrington, 2014). These conditions appear to result from an impaired capacity to regulate water and sodium homeostasis, mimicking partial aldosterone resistance (Martinierie et al., 2009a). Previous studies proposed that the reduced kidney responsiveness to aldosterone could be related to low mineralocorticoid receptor (MR) expression during human development, as demonstrated by the lack of detectable MR immunoreactivity in the renal cortical collecting duct during the late gestational age and neonatal periods, contrasting to the high aldosterone levels (Bourchier, 2004; Martinierie et al., 2009b). Our results indicate that neonate salt wasting syndrome could also be the consequence of a primary defect in aldosterone secretion in preterm infants, as suggested by low level of adrenal CYP11B2 expression before 28 WG. This hypothesis is in accordance with the recent report by Martinierie et al. showing unrecognized defective aldosterone secretion but conserved renal aldosterone sensitivity in the neonatal period of extreme preterm infants (Martinierie et al., 2015).

Analysis of both mast cells and steroid enzymes could suggest a temporo-spatial correlation between the tryptase signal detected in the subcapsular layer from 18 WG onwards and expression of both β HSD and CYP11B2. These observations could support a role of mast cells in the setting and/or regulation of aldosterone biosynthesis, as formerly described in the adult adrenal and aldosterone-producing adenomas (Duparc et al., 2015; Lefebvre et al., 2001). They thus also provide an additional example of the similarities of the mechanisms involved respectively in tumor formation and normal human fetal development (Duparc et al., 2015; Lalli and Figueiredo, 2015). The mechanisms by which mast cells may regulate aldosterone secretion during fetal development need to be now determined. Hinson et al. have reported that histamine, which is one of the main mediators released by mast cells, is able to activate steroid secretion in rat by acting directly on adrenocortical cells and indirectly by increasing adrenal blood flow (Hinson et al., 1991). However, previous studies had shown that histamine has no influence on aldosterone and cortisol secretion by human adult adrenal gland (Orsó et al., 1995; Pagotto et al., 2014). Conversely, involvement of 5-HT in the paracrine control of fetal adrenal cells by mast cells appears more probable. Indeed, we have previously demonstrated that 5-HT, synthesized and released by subcapsular mast cells, stimulates corticosteroid production in adult human adrenal gland via 5-HT₄ receptors positively coupled to the cAMP/PKA pathway (Lefebvre et al., 1992, 2001, 2015). In the present study, we demonstrated the occurrence of two key actors of the

serotonin pathway, i.e. the 5-HT₄ receptor and the 5-HT synthesizing enzyme tryptophan hydroxylase type 1 (TPH1), in the fetal adrenal gland. As expected, the kinetics of tryptase, reflecting mast cell activation, and TPH1 mRNA expression were superimposed with a substantial elevation from 30 WG which was associated with a rise of 5-HT₄ receptor mRNA expression. The activation of mast cell/5-HT pathway is followed by a robust increase in CYP11B2 expression, suggesting that this paracrine mechanism may play a role in the fetal mineralocorticoid synthesis, as previously observed in the adult adrenal. However, the confirmation of the involvement of mast cells and 5-HT in adrenal development will require more investigations. Because of the scarcity of human fetal tissues, animal models, especially mast cell-deficient mice, will certainly help determining the impact of mast cells on the setting of mineralocorticoid synthesizing pathway as well as the mediators involved in this putative cell-to-cell communication process.

In conclusion, mast cells and the 5-HT signaling pathway are present in the developing human adrenal gland and seem to exhibit a spatiotemporal correlation with expression of the steroidogenic enzymes required for aldosterone biosynthesis. This observation, which is similar to the previous observations conducted in the adult adrenal, might suggest the involvement of mast cells in the establishment of fetal aldosterone production. However, further studies are now required to characterize the mechanisms by which mast cells may influence aldosterone production in fetal adrenal glands as well as the molecular signals involved in this putative paracrine interaction. Better understanding of the setting and regulation of aldosterone biosynthesis would indeed improve the management of sodium and water balance in premature infants.

Disclosures

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements

We thank SFEDP (Société Française d'Endocrinologie et de Diabétologie Pédiatrique) and the SANDOZ Laboratories (141520A10) for their support to this research.

We also thank Drs F Faggianelli, B Depont, G Labadie and C Aguilera-Devau for their collaboration. We are indebted to E Colasse and H Lemonnier for skillful technical assistance. We thank Drs V Luu The and G Pelletier for their generous gifts of 17 α -OH antibody.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.06.015>.

References

- Bagnoli, F., Mori, A., Fommei, C., Coriolani, G., Badii, S., Tomasini, B., 2013. ACTH and cortisol cord plasma concentrations in preterm and term infants. *J. Perinatol.* 33, 520–524.
- Barrington, K.J., 2014. Management during the first 72 h of age of the periviable infant: an evidence-based review. *Semin. Perinatol.* 38, 17–24.
- Bochem, A.E., Holleboom, A.G., Romijn, J.A., Hoekstra, M., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., Hovingh, G.K., Kuivenhoven, J.A., Stroes, E.S.G., 2013. High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. *J. Lipid Res.* 54, 1698–1704.
- Bourchier, D., 2004. Plasma aldosterone levels in the 1st week of life in infants of less than 30 weeks gestation. *Eur. J. Pediatr.* 164, 141–145.
- Carr, B.R., Ohashi, M., Simpson, E.R., 1982. Low density lipoprotein binding and de novo synthesis of cholesterol in the neocortex and fetal zones of the human fetal adrenal gland. *Endocrinology* 110, 1994–1998.
- Carr, B.R., Parker, C.R., MacDonald, P.C., Simpson, E.R., 1980. Metabolism of high

- density lipoprotein by human fetal adrenal tissue. *Endocrinology* 107, 1849–1854.
- Chen, X.-Y., Jia, X.-M., Jia, Y.-S., Chen, X.-R., Wang, H.-Z., Qi, W.-Q., 2004. Development and distribution of mast cells and neuropeptides in human fetus duodenum. *World J. Gastroenterol.* 10, 3349–3352.
- Coulter, C.L., Jaffe, R.B., 1998. Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* 139, 5144–5150.
- DeFalco, T., Bhattacharya, I., Williams, A.V., Sams, D.M., Capel, B., 2014. Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, E2384–E2393.
- de Souza, D.A., Toso, V.D., Campos, M.R., de, C., Lara, V.S., Oliver, C., Jamur, M.C., 2012. Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor progression. *PLoS ONE* 7, e40790.
- Duparc, C., Moreau, L., Felipe Golib Dzib, J., Boyer, H.-G., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Boulkroun, S., Mukai, K., Benecke, A.G., Amar, L., Gobet, F., Meatchi, T., Plouin, P.-F., Zennaro, M.-C., Louiset, E., Lefebvre, H., 2015. Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E550–E560.
- Durdu, S., Iskar, M., Revenu, C., Schieber, N., Kunze, A., Bork, P., Schwab, Y., Gilmour, D., 2014. Luminal signalling links cell communication to tissue architecture during organogenesis. *Nature* 515, 120–124.
- Folligan, K., Bouvier, R., Targe, F., Morel, Y., Trouillas, J., 2005. Histological and molecular study of fetal human adrenal cortex (12–36 wk). *Ann. Endocrinol. Paris.* 66, 519–526.
- Gomez-Sanchez, C.E., Qi, X., Velarde-Miranda, C., Plonczynski, M.W., Parker, C.R., Rainey, W., Satoh, F., Maekawa, T., Nakamura, Y., Sasano, H., Gomez-Sanchez, E.P., 2014. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol. Cell. Endocrinol.* 383, 111–117.
- Goto, M., 2006. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J. Clin. Investig.* 116, 953–960.
- Goto, M., Brickwood, S., Wilson, D.L., Wood, P.J., Mason, J.L., Hanley, N.A., 2002. Steroidogenic enzyme expression within the adrenal cortex during early human gestation. *Endocr. Res.* 28, 641–645.
- Hinson, J.P., Vinson, G.P., Kapas, S., Teja, R., 1991. The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 381–389.
- Ishimoto, H., Jaffe, R.B., 2010. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocr. Rev.* 32, 317–355.
- Kanczkowski, W., Sue, M., Zacharowski, K., Reincke, M., Bornstein, S.R., 2015. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 241–248.
- Lalli, E., Figueiredo, B.C., 2015. Pediatric adrenocortical tumors: what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. *Front. Endocrinol. Lausanne* 6, 23. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2015.00023>.
- Lefebvre, H., Compagnon, P., Contesse, V., Delarue, C., Thuillez, C., Vaudry, H., Kuhn, J.-M., 2001. Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5001–5007.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilloley, M., Hery, F., Grise, P., Raynaud, G., Verhofstad, A.A.J., Wolf, L.M., Vaudry, H., 1992. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. *Neuroscience* 47, 999–1007.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Prévost, G., Zennaro, M.C., Bertherat, J., Louiset, E., 2015. Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 198–204. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.11.013>.
- Liu, J., Heikkilä, P., Meng, Q.H., Kahri, A.I., Tikkanen, M.J., Voutilainen, R., 2000. Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. *Eur. J. Endocrinol.* 142, 677–682.
- Liu, J., Voutilainen, R., Heikkilä, P., Kahri, A.I., 1997. Ribonucleic acid expression of the CLA-1 gene, a human homolog to mouse high density lipoprotein receptor SR-BI, in human adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 2522–2527.
- Martinerie, L., Pussard, E., Foix-L'Hélias, L., Petit, F., Cosson, C., Boileau, P., Lombès, M., 2009a. Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatr. Res.* 66, 323–328.
- Martinerie, L., Pussard, E., Yousef, N., Cosson, C., Lema, I., Husseini, K., Mur, S., Lombès, M., Boileau, P., 2015. Aldosterone signaling defect exacerbates sodium wasting in very preterm neonates: the prealdo study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 4074–4081.
- Martinerie, L., Viengchareun, S., Delezoide, A.-L., Jaubert, F., Sinico, M., Prevot, S., Boileau, P., Meduri, G., Lombès, M., 2009b. Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* 150, 4414–4424.
- McCarty, K.S., Miller, L.S., Cox, E.B., Konrath, J., McCarty, K.S., 1985. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109, 716–721.
- Mesiano, S., Jaffe, R.B., 1997. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr. Rev.* 18, 378–403.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., Lewis, C.E., 2008. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.
- Nakamura, Y., Maekawa, T., Felizola, S.J.A., Satoh, F., Qi, X., Velarde-Miranda, C., Plonczynski, M.W., Ise, K., Kikuchi, K., Rainey, W.E., Gomez-Sanchez, E.P., Gomez-Sanchez, C.E., Sasano, H., 2014. Adrenal CYP11B1/2 expression in primary aldosteronism: immunohistochemical analysis using novel monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Endocrinol.* 392, 73–79.
- Narasaka, T., Suzuki, T., Moriya, T., Sasano, H., 2001. Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174, 111–120.
- Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Shibata, H., Itoh, H., Mitani, F., Yamazaki, T., Ogishima, T., Suematsu, M., Mukai, K., 2010. Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 95, 2296–2305.
- Noack, F., Krüger, S., Thorns, C., Finas, D., Stöcker, W., Diedrich, K., Horny, H.-P., 2005. Application of novel tissue microarrays to investigate expression of tryptase, chymase and KIT protein in placental mast cells. *Arch. Gynecol. Obstet.* 272, 223–228.
- Orsó, E., Szalay, K.S., Tóth, I.E., Szabó, D., Stark, E., Fehér, T., Perner, F., Hidvégi, M., 1995. Effect of histamine on corticosteroid secretion of isolated human and rat adrenocortical cells. *Inflamm. Res.* 44 (Suppl. 1), S48–S49.
- Pagotto, R.M., Pereyra, E.N., Monzón, C., Mondillo, C., Pignataro, O.P., 2014. Histamine inhibits adrenocortical cell proliferation but does not affect steroidogenesis. *J. Endocrinol.* 221, 15–28. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-13-0433>.
- Pezzi, V., Mathis, J., Rainey, W.E., Carr, B.R., 2003. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 87, 181–189.
- Raica, M., Cimpean, A.M., Nico, B., Guidolin, D., Ribatti, D., 2010. A comparative study of the spatial distribution of mast cells and microvessels in the foetal, adult human thymus and thymoma. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 17–23.
- Rehman, K.S., Carr, B.R., Rainey, W.E., 2003. Profiling the steroidogenic pathway in human fetal and adult adrenals. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 10, 372–380.
- Schmetzer, O., Valentin, P., Church, M.K., Maurer, M., Siebenhaar, F., 2016. Murine and human mast cell progenitors. *Eur. J. Pharmacol.* 778, 2–10.
- Speiser, P.W., White, P.C., 2003. Congenital adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 349, 776–788.
- Theoharides, T.C., Valent, P., Akin, C., 2015. Mast Cells, mastocytosis, and related disorders. *N. Engl. J. Med.* 373, 163–172.
- Vergeer, M., Korpelaar, S.J.A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G.K., Hoekstra, M., Sierts, J.A., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., Holleboom, A.G., Van Berkel, T.J.C., Kastelein, J.J.P., Van Eck, M., Kuivenhoven, J.A., 2011. Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.* 364, 136–145.
- Zhang, M., Zhou, H., Zheng, C., Xiao, J., Zuo, E., Liu, W., Xie, D., Shi, Y., Wu, C., Wang, H., Li, D., Li, J., 2014. The roles of testicular c-kit positive cells in de novo morphogenesis of testis. *Sci. Rep.* 4, 5936.

Article 2 :

Synthèse des minéralocorticoïdes, mastocytes surrenaliens et adaptation à la vie extra-utérine

*Alexandre Naccache, *Alyson Deprez, Estelle Louiset, Céline Duparc, Sophie Patrier, Sylvie Renouf, Annie Laquerrière, Elise Machevin, Alain Diguët, Fabien Guimiot, Hervé Lefebvre, Mireille Castanet

* Ces 2 auteurs ont contribué également à ce travail

Article en préparation

Résumé

La glande surrénale humaine joue un rôle clé pendant la grossesse et les premiers jours de la vie. Dans la surrénale humaine adulte, il a été montré que la synthèse des minéralocorticoïdes est régulée par un mécanisme sérotoninergique de type paracrine. La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est produite à partir du tryptophane sous l'action de la tryptophane hydroxylase de type 1 (TPH1) dans les mastocytes intra-surréaliens. Une fois libérée, la 5-HT vient stimuler la sécrétion d'aldostérone via l'activation de récepteurs de type 5-HT₄ positivement couplés à la voie AMPc/PKA et à un influx cytosolique de calcium. Nous avons précédemment montré que la voie de signalisation sérotoninergique était présente dans la glande surrénale humaine en développement. Histologiquement et fonctionnellement, la surrénale fœtale humaine est divisée en trois zones, de la périphérie vers le centre : la zone définitive, sous la capsule, qui exprime l'aldostérone synthase et la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (3βHSD2), la zone de transition qui apparaît au deuxième trimestre de la gestation et la zone fœtale interne. Les mastocytes deviennent visibles dans la zone définitive au cours du deuxième trimestre, juste avant l'expression des enzymes nécessaires à la biosynthèse de l'aldostérone. Ces résultats suggèrent l'implication des mastocytes dans l'établissement de la production d'aldostérone fœtale, par le biais d'un mécanisme paracrine analogue à celui décrit dans la surrénale adulte.

L'adaptation à la vie extra-utérine nécessitant une stimulation de la production d'aldostérone indispensable au maintien de l'homéostasie hydro-sodée, nous avons postulé que les mastocytes surrénaliens pourraient également intervenir dans ce processus via la libération locale de 5-HT. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons évalué la densité mastocytaire et étudié l'expression de l'aldostérone synthase et de protéines de la voie de signalisation sérotoninergique dans des surrénales issues de fœtus et de nouveau-nés.

Les mastocytes ont été visualisés dans la région sous-capsulaire au sein de la zone positive pour 3 β HSD2 à la fois dans la surrénale fœtale et la surrénale néonatale. Globalement, la densité des mastocytes était significativement plus élevée dans la surrénale néonatale que dans la surrénale fœtale (5.09 par mm² versus 0.71 par mm²; p = 0.004). Cependant, la densité des mastocytes était variable tout au long de la gestation. En effet, dans la surrénale néonatale, la densité maximale de mastocytes était atteinte entre 28 et 32 semaines d'aménorrhée et diminuait considérablement à terme. Pour la surrénale fœtale, aucune variation significative de la densité des mastocytes en fonction de l'âge gestationnel n'était observée. Pour fournir une analyse comparative de l'immunoréactivité de type aldostérone synthase, un H-score reflétant l'intensité et l'étendue du marquage a été établi en multipliant le pourcentage de cellules positives par un nombre allant de 0 à 3 (non présent [0], faible [1+], distinct [2+] et très fort [3+]). L'expression de l'aldostérone synthase était significativement augmentée dans la surrénale néonatale par rapport à la surrénale fœtale (92.1 versus 15.2; p = 0.02). Ainsi, ces résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de l'aldostérone synthase au cours de la transition entre la vie intra- et extra-utérine.

Pour déterminer si les mastocytes surrénaliens fœtaux sont capables de produire de la 5-HT, une immunohistochimie TPH1 a été réalisée. De manière surprenante, l'immunoréactivité de TPH1 n'était pas limitée aux mastocytes mais était également détectée dans les cellules stéroïdogènes de la zone définitive dans la surrénale fœtale. Un profil similaire a été observé dans la surrénale néonatale. L'expression du récepteur 5-HT₄ était retrouvée dans l'ensemble des zones de la surrénale fœtale humaine avec une prédominance dans la zone définitive, aussi bien dans la surrénale fœtale que dans la surrénale néonatale. Au total, nos résultats suggèrent un rôle des mastocytes dans l'adaptation à la vie extra-utérine via un contrôle paracrine de la sécrétion d'aldostérone, notamment en cas de grande prématurité, période

où le rein est particulièrement sensible à l'aldostérone. Le rôle des acteurs de la voie sérotoninergique, surexprimés dans la surrénale fœtale, reste en revanche à préciser.

Expression of the serotonin signaling pathway and aldosterone synthase in the human adrenal gland during the fetal-to-neonatal transition

*Alexandre Naccache^{a,b}, *Alyson Deprez^a, Estelle Louiset^a, Céline Duparc^a, Sophie Patrier^c, Sylvie Renouf^a, Annie Laquerrière^c, Elise Machevin^d, Alain Diguët^e, Fabien Guimiot^f, Hervé Lefebvre^{a,g}, Mireille Castanet^{a,b}

^aNormandie University, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France

^bRouen University Hospital, Unit of Pediatric Endocrinology, Department of Pediatrics, Rouen, France

^cRouen University Hospital, Department of Pathology, Rouen, France

^dEvreux Hospital, Department of Gynecology and Obstetrics, Rouen, France

^eRouen University Hospital, Department of Gynecology and Obstetrics, Rouen, France

^fDepartment of Developmental Biology, APHP Robert-Debré hospital, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^gRouen University Hospital, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Rouen, France

* Both authors contributed equally to this work.

ARTICLE INFO

Keywords:

human fetal adrenal
mast cells
serotonin
steroidogenesis
aldosterone
adaptation to extra-uterine
life

ABSTRACT

In newborns, plasma levels of aldosterone are high, independently of plasma maternal concentrations, suggesting an activation of mineralocorticoid production in the neonatal adrenal gland. Mast cells, which are present in the adrenal since 20 weeks of gestation could be involved in this process, like in the adult adrenal where they stimulate aldosterone secretion through local release of serotonin (5-HT) and activation of the serotonin receptor type 4 (5-HT₄).

Mast cells were observed in the subcapsular region of the cortex in both fetal and neonatal adrenals but their density was higher in neonatal versus fetal glands. Similarly, aldosterone synthase expression was increased in neonatal in comparison with fetal tissues. Surprisingly, expression of tryptophan hydroxylase type 1, a key enzyme for 5-HT synthesis, was not restricted to mast cells, but was also visualized in adrenocortical cells of the three layers of the cortex, in both neonatal and fetal glands without any significant difference between the two types of tissues. A similar expression profile was observed for the 5-HT₄ receptor.

These results suggested that aldosterone synthesis is positively controlled by intraadrenal mast cells during the intrauterine to extrauterine life transition. However, the role of the serotonergic signaling pathway remains to be elucidated.

1. Introduction

Histologically and functionally, the human fetal adrenal is divided in three areas, from the center to the outside: the inner fetal zone (FZ), the transitional zone (TZ) which appears at the second trimester of gestation, and the definitive zone (DZ), under the capsule. The DZ expresses

aldosterone synthase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (3 β HSD2), 2 enzymes required for aldosterone synthesis (Folligan et al., 2005; Naccache et al., 2016). Aldosterone production by the fetal adrenal appears a late event, after the second trimester (Johnston et al., 2018), but a share of amniotic fluid aldosterone originates from the mother after

crossing the placenta (Bayard et al., 1970). The role of mineralocorticoids during gestation is not completely understood as fetal water balance is mainly ensured by the placenta (Lindower, 2017). However, mineralocorticoids could be involved in pregnancy physiological development through supporting angiogenesis and placental growth (Eisele et al., 2016).

The human adrenal gland plays a key role during the transition from pregnancy to the first days of life. Indeed, adaptation to extra-uterine life involves maintenance of homeostasis of the inner environment, a process dependent on adrenal steroid secretions (Ishimoto and Jaffe, 2010). In very preterm (28-32 weeks of gestation, WG) neonates, adrenal glands are immature, leading to low aldosterone values which predispose to severe dehydration in comparison to newborns at term (Bourchier, 2004; Martinerie et al., 2015). The resulting loss of sodium and water requires administration of intravenous fluid to preserve extracellular hydration, but this type of treatment can represent a real challenge in very preterm neonates (O'Brien and Walker, 2014).

Intriguingly, aldosterone values in term newborns remain high compared to maternal values (Martinerie et al., 2009, 2011). This observation has been shown to be associated with partial resistance of the distal nephron to aldosterone (Martinerie et al., 2009). It is thus considered that the increase in aldosterone concentration in newborns results from activation of the renin-angiotensin system (RAS) in response to urinary sodium loss consecutive to the decreased renal action of mineralocorticoids. However, it has been shown in mammalian animal models that the fetal adrenal gland is not fully sensitive to angiotensin II. For instance, in the fetal lamb, the aldosterone response to angiotensin II is lower compared to that of adult sheep (Robillard et al., 1982; Giry et al., 1985). This result suggests that another regulatory pathway than the RAS may activate aldosterone production during the transition to extra-uterine life.

In the human adult adrenal, it has been shown that mineralocorticoid synthesis is influenced by various regulatory signals locally

produced acting as paracrine factors. Especially, serotonin (5-Hydroxytryptamine; 5-HT), released by subcapsular mast cells, stimulates aldosterone secretion through activation of serotonin receptor type 4 (5-HT₄R) positively coupled to the cAMP/PKA pathway and calcium influx (Lefebvre et al., 2015, 2013). Recently, we have shown that the mast cell/5-HT paracrine regulatory system is present in the developing human adrenal gland. Especially, we found that mast cells and aldosterone synthase, the key enzyme for aldosterone synthesis, were exclusively present in the definitive zone of the cortex (Naccache et al., 2016). Moreover, the presence of mast cell was detected a few weeks before the appearance of aldosterone synthase expression, suggesting the involvement of mast cells and 5-HT in the establishment of the mineralocorticoid synthesis pathway in the fetal adrenal (Naccache et al., 2016). It appears thus conceivable that this local regulatory process may also be activated in the neonatal period to stimulate aldosterone production in order to counteract mineralocorticoid resistance. To test this hypothesis, we have compared the density of mast cells and expression of both proteins of the 5-HT signaling pathway and aldosterone synthase in adrenal glands from fetuses *versus* newborns.

2. Materials and Methods

2.1 Material

The tissue collection procedure was approved by the French National Agency for Biomedicine (Agence de Biomédecine). Adrenal glands were obtained from fetuses at 23-41 weeks of gestation (WG), including 17 fetuses (5 females, 12 males) dead before delivery, or 5 newborns (2 females, 3 males) dead during the first days of life, between 2004 and 2016. The gestational age at birth of the newborns were: 2 prior to 28 WG, 1 between 28 and 31 WG and 2 after 32 WG. Fetal adrenals were removed at the time of autopsy either after medical terminations of pregnancies or spontaneous death *in utero*. Medical termination of pregnancies had been approved by the local ethics committee of Prenatal

Diagnosis Multidisciplinary Centre. Autopsies were performed in the Departments of Pathology of the Rouen and Paris (Robert Debré) University Hospitals. For all cases, written consent for research use were obtained from parents. Only adrenal tissue derived from fetuses and newborns free from all major malformations, adrenal and kidney diseases have been studied. In addition, the adrenal tissues showing histological alterations were excluded for the study.

Different types of tissues have been used as controls for immunohistochemical experiments. Normal adult adrenals from patients undergoing expanded nephrectomy for kidney cancer or brain-dead organ donors were used as positive controls for 3β HSD2, aldosterone synthase, 5-HT₄ and 5-HT immunohistochemistry. Adult duodenum from surgical specimen was used as positive control for TPH1 stain. The sections stained without the primary antibody served as negative controls.

2.2. Methods

2.2.1 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, cut into 5 μ m sections. Samples were deparaffinized in cyclohexane, rehydrated in serial dilution of ethanol, phosphate-buffer-saline (PBS) or triphosphate-buffer-saline (TBS) and distilled water. Antigen retrieval was done in 0,01 M Na citrate buffer solution (pH=6) for 20 minutes in water-bath at 95°C or in 10Mm Tris, 1mM EDTA buffer solution (pH=9) for 10 minutes in the microwave (for aldosterone synthase immunostaining only). After blocking endogenous enzymes (alkaline phosphatase and peroxidase, Dako, Agilent) for 5 minutes, sections were treated with normal goat serum (NGS, diluted at 10% in TBS or PBS) for 30 minutes. Primary antibodies (3β HSD2, diluted at 1:100, Proteintech; aldosterone synthase, diluted at 1:500, P^r K. Mukai; Tryptase, diluted at 1:1000, AbD Serotec; 5-HT₄R, diluted at 1:300, Interchim; TPH1, diluted at 1:100, Sigma-Aldrich; serotonin, diluted at 1:40, Serotec) were diluted in Antibody Diluent

Reagent Solution (Invitrogen) and incubated for 1 hour at room temperature or overnight at 4° (TPH1). Tissues were washed in PBS or TBS and then incubated with secondary antibody (goat anti-rabbit or goat anti-mouse, Dako, Agilent) for 30 minutes at room temperature. Finally, immunoreactivities were revealed using either EnVision+ System-HRP kit or Envision TM G/2 doublestain kit (Dako) then tissues were counterstained with hematoxylin.

2.2.2 Immunohistochemistry data analysis

Mast cell density was measured by use of the Mercator software (ExploraNova, La Rochelle, France), on the cell imaging platform of Normandy (PRIMACEN, University of Rouen). Mast cells were identified as immunopositive cells for the mast cell specific protease tryptase (Duparc et al., 2015). Briefly, the 3β HSD-positive cell areas were defined at low magnification to establish the section maps and quantify surface areas. Tryptase-immunopositive cells were then counted in 3β HSD2 positive area. Thereby, mast cells density was expressed as the number of tryptase-immunopositive cells per mm² of 3β -HSD2 positive area.

Nis Elements BR version 4.00 software (Nikon corporation, Tokyo, Japan) was used to measure the histological H-score (McCarty et al., 1985). For each slice, digital images of twenty separate square-shaped areas (total area: 0,3 mm²) were analyzed within the definitive zone. Immunoreactivity was assessed semi-quantitatively according to the McCarty H-Score, in which the percentage of stained cells is multiplied by a number from 0 to 3 (not present (0), low (1+), distinct (2+) and very strong (3+)), reflecting the intensity of the signal. Single-blind analysis was conducted in duplicate by 2 independent operators. H-scores were determined as the average of all the values obtained for each section map analysis.

2.2.3 Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism version 6.00 software for Windows (GraphPad software Inc., San Diego,

USA). Comparisons were performed with Mann-Whitney test. Statistical significance between two groups was considered significant for a p-value < 0,05.

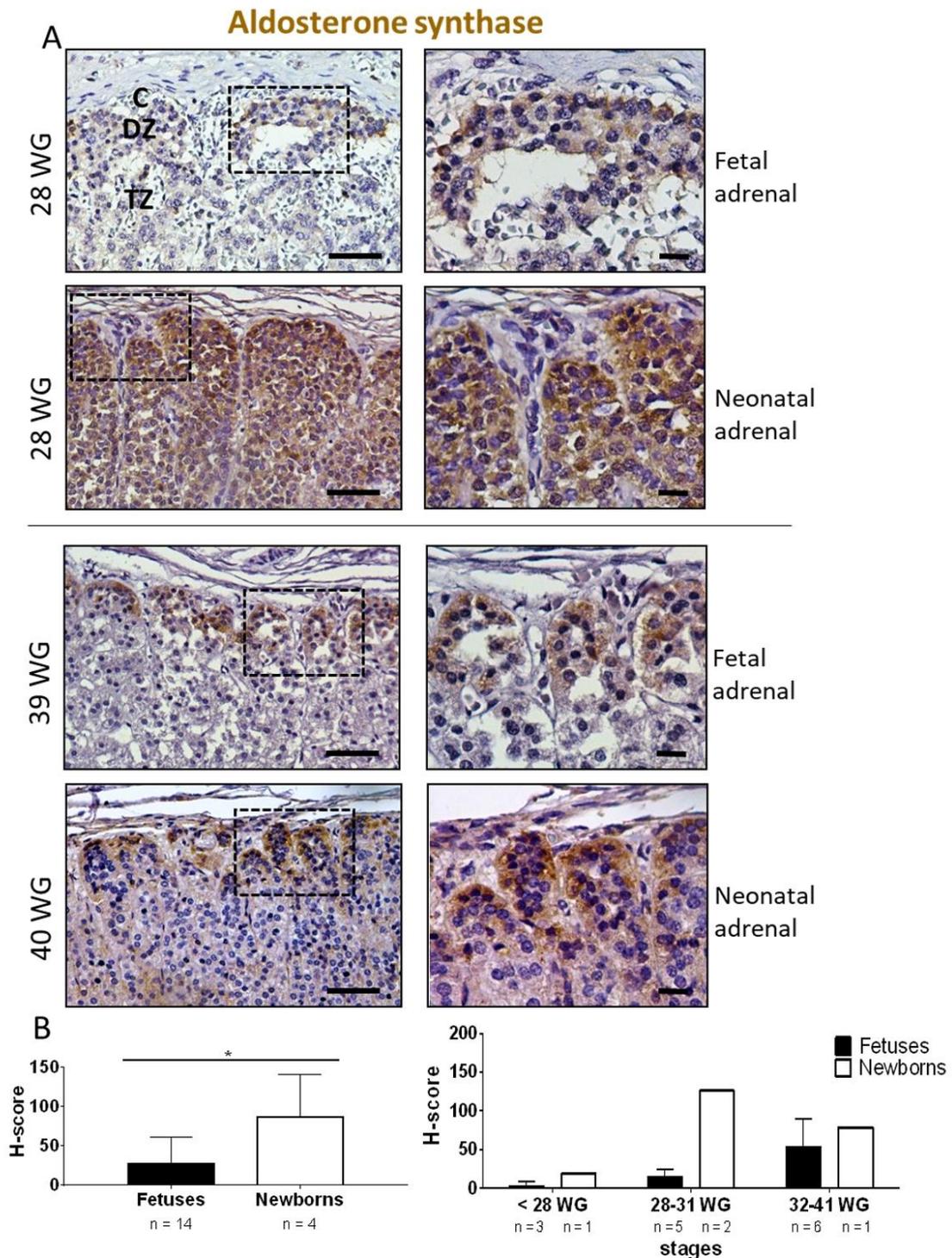


Fig. 1. Aldosterone synthase expression in the human fetal and neonatal adrenal gland.

A) Aldosterone synthase immunoreactivity compared between fetal and neonatal adrenal glands at 28 and 39-40 WG. B) H-score of CYP11B2 labeling compared between fetal and neonatal adrenal glands, at all stages on the left, and divided between prior 28 WG, between 28-31 WG and between 32-41 WG on the right. The scale bar represents 50 μm on the left column and 10 μm on the right column. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone. For each gestational age, "n" designates the number of tissues studied.

3. Results

3.1 Mineralocorticoid biosynthesis in adaptation to extra-uterine life

At stages prior 28 WG, only sparse aldosterone synthase-immunopositive cells were detected in the definitive zone, in both FA and NA (data not shown). During the 28-31 WG period, the whole subcapsular layer in the definitive zone was positive for aldosterone synthase in NA whereas the staining was restricted to cell islets in FA (Fig. 1A). After 31 WG, a similar continuous distribution pattern of aldosterone synthase was observed in both NA and FA. We have used the H-score to provide a comparative analysis of aldosterone synthase immuno-reactivity. H-score was found to be

significantly higher in NA compared to FA (median 92.13, n=4, versus 15.25, n=19, p-value 0.0210). This difference seemed especially apparent between 28 and 31 WG (Fig. 1B). Aldosterone H-score appeared to be similar in both FA and NA in later stages of development. In FA, aldosterone synthase labelling gradually increased during development. (Fig.1B).

3.2 Mast cells in the fetal and neonatal adrenal glands

Mast cells visualized as tryptase-immunopositive cells were detected in the subcapsular layer of adrenal cortex within the 3βHSD2-positive area in both fetal (FA) and neonatal (NA) adrenal glands (Fig. 2A).

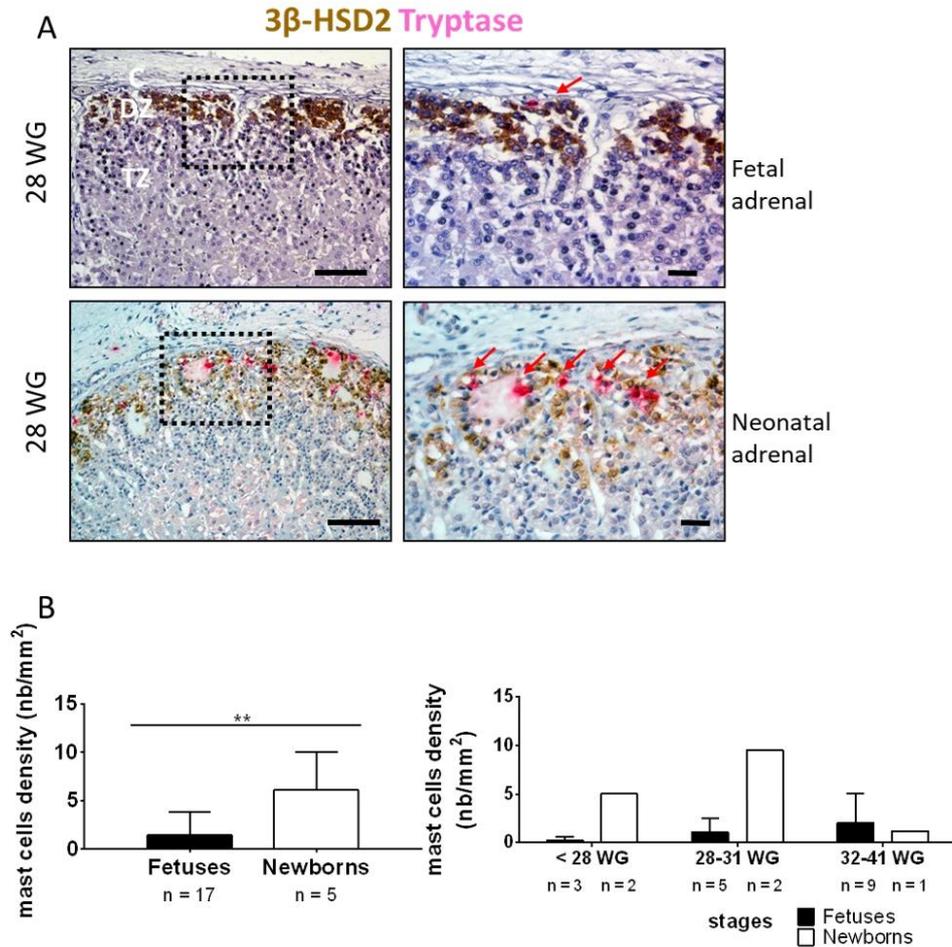


Fig. 2. Distribution of mast cells in the human fetal and neonatal adrenal gland.

A) Detection of mast cells using tryptase antibody in the human fetal and neonatal adrenal gland at 28 WG. The number of tryptase-positive cells (pink arrows) is greater in the neonatal gland *versus* the fetal gland at similar term. B) Mast cells density (nb/mm²) in the 3βHSD-positive area in human fetal and neonatal adrenal glands.

The scale bar represents 50 μm on the left column and 10 μm on the right column. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone. For each gestational age, "n" designates the number of tissues studied.

Overall, mast cells density was significantly higher in NA compared to FA (median 5.09 per mm², n=5, versus 0.71 per mm², n=17, p-value 0.0041) (Fig. 2B). As previously reported, no significant variation of mast cell density was observed in fetal adrenals during development.

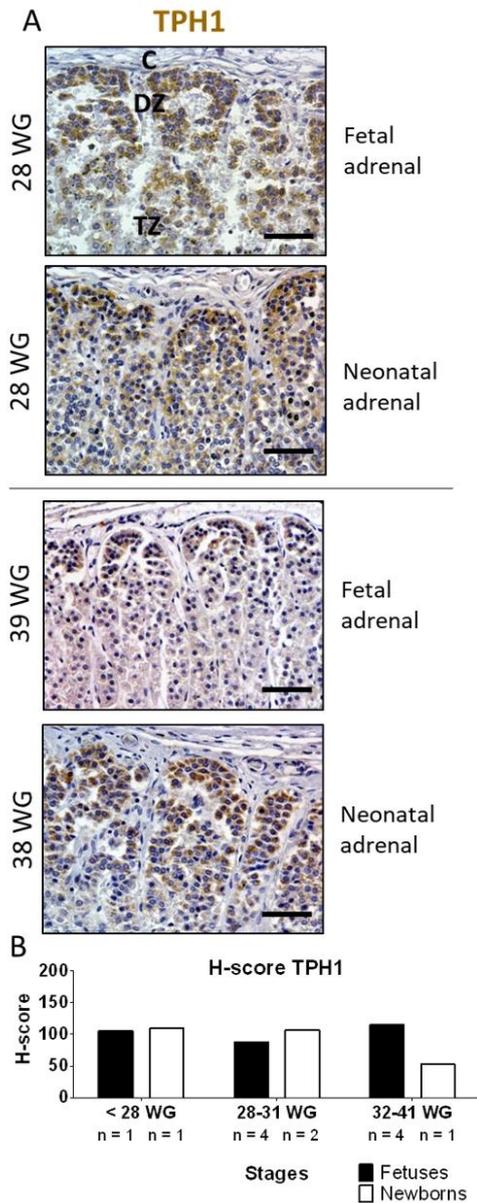


Fig. 3. TPH1 expression in the human fetal and neonatal adrenal gland.

A) TPH1 immunoreactivity compared between fetal and neonatal adrenal glands at 28 and 38-39 WG. B) H-score of TPH1 labeling compared between fetal and neonatal adrenal glands between 3 groups : prior to 28 WG, between 28-31 WG, and between 32-41 WG. The scale bar represents 50 μ m. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone. "n" designates the number of tissues studied

3.3 Serotonin pathway expression in the fetal and neonatal adrenal gland

Mast cells are known to be able to produce 5-HT. To assess 5-HT synthesis, we analyzed expression of tryptophan hydroxylase 1 (TPH1), encoding the rate-limiting enzyme that catalyzes 5-HT biosynthesis. Surprisingly, TPH1 labelling was not restrictive to mast cells as in adult adrenals (Lefebvre et al., 2015), but immunoreactivity was also detected in steroidogenic cells in the DZ (Fig.3A). At early stages, TPH1-immunopositive cells were localized in all layers of the fetal adrenal cortex, and tend to be restricted to the definitive zone at stages next to the term (Fig.3A). No apparent

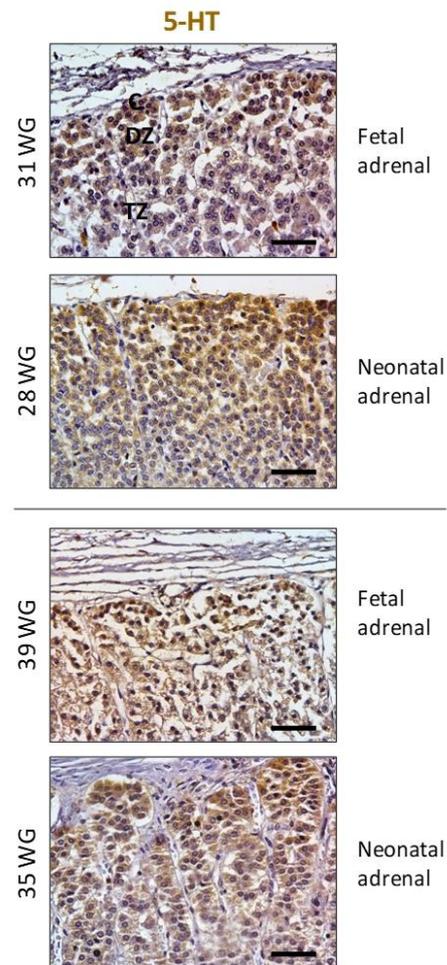


Fig. 4. 5-HT expression in the human fetal and neonatal adrenal gland.

5-HT immunoreactivity compared between fetal and neonatal adrenal glands at 28-31 WG and 35-39 WG. The scale bar represents 50 μ m. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone.

variation of TPH1 H-score was found during development, either in FA or NA, without any significant difference between the two types of tissues (Fig. 3B). We then investigated the presence of 5-HT in the tissues and found a distribution pattern of the amine globally similar to that of TPH1. Especially, 5-HT immunoreactivity was also detected in steroidogenic cells (Fig. 4). Moreover, 5-HT distribution was not restricted to aldosterone synthase-immunopositive cells. In addition, 5-HT₄ receptor immunostaining was also studied. Its presence was assessed in the NA and FA at all studied stages. The 5-HT₄ receptor was

localized in the whole cortex of the HFA with no apparent difference between FA and NA (Fig.5).

4. Discussion

The production of aldosterone plays a pivotal role in the intra-uterine to extra-uterine transition. In the present study, we have observed an increased expression of aldosterone synthase in neonatal *versus* fetal adrenals at similar terms. This difference was significant after 28 WG and is likely the result of an adaptation of mineralocorticoid synthesis to extra-uterine life. CYP11B2 expression appeared low in both NA and FA before 28 WG but this result needs to be confirmed in a larger series of tissues. Some hypotheses can be proposed to explain the increased CYP11B2 expression in neonates. Measurements of umbilical blood aldosterone levels performed at birth by Travers *et al.* have revealed a gradual increase in mineralocorticoid secretion in relation with the gestational age (from prior to 33 WG to 33-36 WG and term neonates) (Travers *et al.*, 2018). Interestingly, plasma aldosterone levels were similar in the 3 groups of neonates on day 3, suggesting rapid reversal of the initial defect in aldosterone production. Renin angiotensin system (RAS) actors are present during fetal life as early as 5 WG (Corvol *et al.*, 1998). Martinerie *et al.*, by studying the RAS at birth, observed higher levels of plasma renin at birth in very preterm compared to 33-36 WG and term neonates (Martinerie *et al.*, 2015). Furthermore, plasma soluble (pro)renin levels in cord blood was found higher in preterm 32 weeks compared to full term neonates, confirming an activation of RAS in premature newborns (Terada *et al.*, 2017). Others mechanisms involving paracrine factors could be involved in the regulation of aldosterone secretion during the fetal-to-neonatal transition. Indeed, the data obtained in the human and murine adult adrenal glands indicate that resident adrenal mast cells act as local amplifiers of the RAS action to stimulate aldosterone production in response to sodium depletion. In particular, low sodium diet activates adrenal mast cells in mice and rat mast

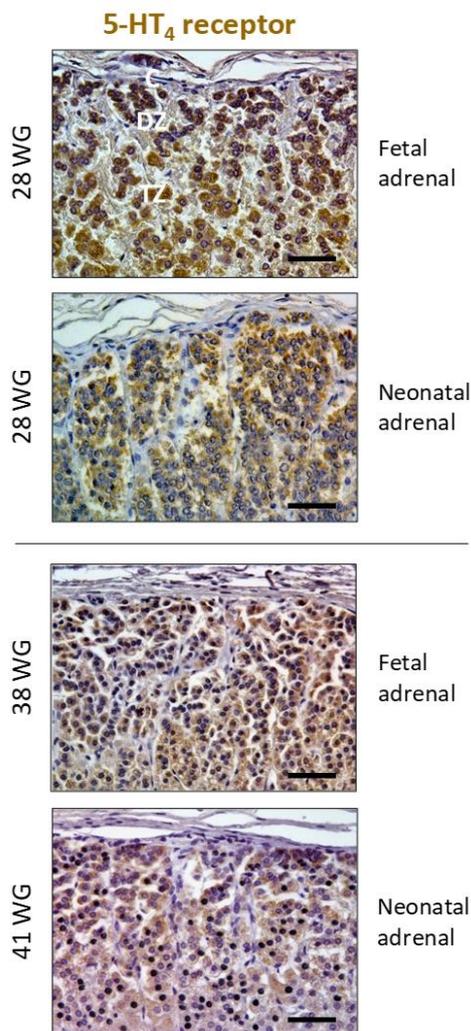


Fig. 5. 5-HT₄ receptor expression in the human fetal and neonatal adrenal gland. 5-HT₄ immunoreactivity compared between fetal and neonatal adrenal glands at 28 and 38-41 WG. The scale bar represents 50 μm. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ: Transitional Zone.

cells have been shown to express the angiotensin type 2 receptor. In addition, human adrenal mast cells release 5-HT which enhances aldosterone secretion through the 5-HT₄ receptor expressed by zona glomerulosa cells. Interestingly, the stimulatory actions of 5-HT₄ receptor agonists and angiotensin II on aldosterone synthesis are additive (Lefebvre et al., 2002). On the other hand, adrenal mast cells are in close contact with autonomic nerve fibers (Duparc et al., 2015), suggesting that stress may also be able to trigger 5-HT release. Taken together, these observations suggest that mast cells may participate in the activation of mineralocorticoid synthesis during the fetal-to-neonatal transition which represents a particularly stressful event. We had previously noticed that mast cells are present in the HFA as early as 18 WG (Naccache et al., 2016). In the present study, mast cells density was found higher in adrenals derived from newborns compared with fetuses at the same terms. This observation is consistent with a role of adrenal mast cells in the fetal-to-neonatal transition. It is conceivable that the paracrine mechanism responsible for the action of mast cell on aldosterone production during this process may principally involve 5-HT like in the adult adrenal (Lefebvre et al., 2019). Surprisingly, contrary to what is found in adult adrenocortical tissues, the occurrence of 5-HT was not confined to mast cells, but was also present in steroidogenic cells in the fetal adrenal. This unusual localization of 5-HT can also be found in adrenal tumors, like aldosterone-producing adenomas (APA), where locally produced 5-HT is likely to play a role in the pathophysiology of aldosterone hypersecretion (Lefebvre et al., 2015). In light of our present findings, it can be suggested that synthesis of the amine in APA steroidogenic cells may represent a reminiscence of a fetal stage of differentiation.

On the other hand, it has been shown that 5-HT synthesis in adrenocortical cells is induced by the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway which can be activated by mutations affecting the *PRKARIA* gene or ACTH excess (Bram et al., 2016; Le Mestre et al., 2019). It appears thus conceivable that, during adrenal development, ACTH, which is produced by the

fetal pituitary gland from 8 WG, could favor upregulation of the 5-HT signaling pathway through binding to the melanocortin receptor type 2 and mobilization of the cAMP/PKA pathway. The role of 5-HT produced by adrenocortical cells remains unclear. In human cancers, 5-HT is now known to favor cell growth and to stimulate angiogenesis. We can therefore hypothesize that the local serotonergic tone could produce a similar stimulatory effect on development of the fetal adrenal, as previously shown in other organs (Goldberg et al., 2017; Sarrouilhe and Mesnil, 2019). Nevertheless, both ACTH and the 5-HT signaling pathway do not seem to be involved in the aldosterone response to the fetal-to-neonatal transition. In fact, no significant difference in ACTH levels has been observed between term fetuses and neonates (Winters et al., 1974). Similarly, in our study, both TPH1 and the 5-HT₄ receptor were largely distributed in the cortex in both fetal and newborns adrenals. However, we cannot exclude that expression of other receptor types, like the 5-HT₆ and 5-HT₇ receptors, may be enhanced during this period.

In conclusion, our data indicate that the adaptation of aldosterone production to the fetal-to-neonatal transition may involve other actors than the systemic RAS, like the intraadrenal mast cells. Moreover, at variance with the observations performed in the adult adrenal gland, we found that the serotonergic pathway was expressed in steroidogenic cells during fetal life. However, its role in tissue development and establishment of the mineralocorticoid synthesizing pathway remains unclear and will necessitate further exploration. Because of the scarcity of human fetal tissues, animal models, including mast cell-deficient mice, will probably help determining the impact of mast cells on the response of mineralocorticoid synthesis to the intra- to extra-uterine transition.

Disclosures

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements

We thank SFE (Société Française d'Endocrinologie) for their support to this research.

We also thank Drs F Faggianelli, B Depont, G Labadie and C Aguilera-Devaud for their collaboration. We are indebted to E Colasse and H Lemonnier for skillful technical assistance.

References

- Bayard, F., G. Ances, I., J. Tapper, A., V. Weldon, V., Kowarski, A., J. Migeon, C., 1970. Transplacental Passage and Fetal Secretion of Aldosterone. *J Clin Invest* 49, 1389–1393.
- Bourchier, D., 2004. Plasma aldosterone levels in the 1st week of life in infants of less than 30 weeks gestation. *Eur J Pediatr* 164, 141–145.
- Bram, Z., Louiset, E., Ragazzon, B., Renouf, S., Wils, J., Duparc, C., Boutelet, I., Rizk-Rabin, M., Libé, R., Young, J., Carson, D., Vantyghem, M.-C., Szarek, E., Martinez, A., Stratakis, C.A., Bertherat, J., Lefebvre, H., 2016. PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight* 1, e87958.
- Corvol, P., Schütz, S., Gasc, J.M., 1998. Early expression of all components of the renin-angiotensin system in human development. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 28, 195–212.
- Duparc, C., Moreau, L., Felipe Golib Dzib, J., Boyer, H.-G., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Boulkroun, S., Mukai, K., Benecke, A.G., Amar, L., Gobet, F., Meatchi, T., Plouin, P.-F., Zennaro, M.-C., Louiset, E., Lefebvre, H., 2015. Mast Cell Hyperplasia is Associated with Aldosterone Hypersecretion in a subset of Aldosterone-Producing Adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, E550-560.
- Eisele, N., Albrecht, C., Mistry, H.D., Dick, B., Baumann, M., Surbek, D., Currie, G., Delles, C., Mohaupt, M.G., Escher, G., Gennari-Moser, C., 2016. Placental expression of the angiogenic placental growth factor is stimulated by both aldosterone and simulated starvation. *Placenta* 40, 18–24.
- Folligan, K., Bouvier, R., Targe, F., Morel, Y., Trouillas, J., 2005. Histological and molecular study of fetal human adrenal cortex (12-36 wk). *Ann Endocrinol Paris* 66, 519–526.
- Giry, J., Safwate, A., Barlet, J.P., 1985. Control of aldosterone secretion in domestic mammals during the perinatal period. *Reprod. Nutr. Dev.* 25, 993–1005.
- Goldberg, E., Grau, J.B., Fortier, J.H., Salvati, E., Levy, R.J., Ferrari, G., 2017. Serotonin and catecholamines in the development and progression of heart valve diseases. *Cardiovasc. Res.* 113, 849–857.
- Ishimoto, H., Jaffe, R.B., 2010. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr. Rev.* 32, 317–355.
- Johnston, Z.C., Bellingham, M., Filis, P., Soffientini, U., Hough, D., Bhattacharya, S., Simard, M., Hammond, G.L., King, P., O'Shaughnessy, P.J., Fowler, P.A., 2018. The human fetal adrenal produces cortisol but no detectable aldosterone throughout the second trimester. *BMC Med.* 16, 23.
- Le Mestre, J., Duparc, C., Reznik, Y., Bonnet-Serrano, F., Touraine, P., Chabre, O., Young, J., Suzuki, M., Sibony, M., Gobet, F., Stratakis, C.A., Raverot, G., Bertherat, J., Lefebvre, H., Louiset, E., 2019. Illicit upregulation of serotonin signaling pathway in adrenals of patients with high plasma or intraadrenal ACTH levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- Lefebvre, H., Cartier, D., Duparc, C., Lihmann, I., Contesse, V., Delarue, C., Godin, M., Fischmeister, R., Vaudry, H., Kuhn, J.-M., 2002. Characterization of serotonin₄ receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1211–1216.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Naccache, A., Lopez, A.-G., Castanet, M., Louiset, E., 2019. Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Vitam. Horm.* 109, 303–339.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Prévost, G., Zennaro, M.C., Bertherat, J., Louiset, E., 2015. Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 198–204.
- Lefebvre, H., Prévost, G., Louiset, E., 2013. Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur. J. Endocrinol.* 169, R115-138.
- Lindower, J.B., 2017. Water balance in the fetus and neonate. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* 22, 71–75.
- Martinerie, L., Pussard, E., Foix-L'Hélias, L., Petit, F., Cosson, C., Boileau, P., Lombès, M., 2009. Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatr. Res.* 66, 323–328.

- Martinerie, L., Pussard, E., Yousef, N., Cosson, C., Lema, I., Hussein, K., Mur, S., Lombès, M., Boileau, P., 2015. Aldosterone signaling defect exacerbates sodium wasting in very preterm neonates: The Premaldo Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 4074–4081.
- Martinerie, L., Viengchareun, S., Meduri, G., Kim, H.-S., Luther, J.M., Lombes, M., 2011. Aldosterone Postnatally, but not at Birth, Is Required for Optimal Induction of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression and Sodium Reabsorption. *Endocrinology* 152, 2483–2491.
- McCarty, K.S., Miller, L.S., Cox, E.B., Konrath, J., McCarty, K.S., 1985. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109, 716–721.
- Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., Gomez-Sanchez, C.E., Mukai, K., Lefebvre, H., Castanet, M., 2016. Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 69–80.
- O'Brien, F., Walker, I.A., 2014. Fluid homeostasis in the neonate. *Pediatr. Anesth.* 24, 49–59.
- Robillard, J.E., Gomez, R.A., VanOrden, D., Smith, F.G., 1982. Comparison of the adrenal and renal responses to angiotensin II fetal lambs and adult sheep. *Circ. Res.* 50, 140–147. 0
- Sarrouilhe, D., Mesnil, M., 2019. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie, 70 years of Serotonin* 161, 46–50.
- Terada, T., Urushihara, M., Saijo, T., Nakagawa, R., Kagami, S., 2017. (Pro)renin and (pro)renin receptor expression during kidney development in neonates. *Eur. J. Pediatr.* 176, 183–189.
- Travers, S., Martinerie, L., Boileau, P., Lombès, M., Pussard, E., 2018. Alterations of adrenal steroidomic profiles in preterm infants at birth. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* 103, F143–F151.
- Winters, A.J., Oliver, C., Colston, C., Macdonald, P.C., Porter, J.C., 1974. Plasma ACTH Levels in the Human Fetus and Neonate as Related to Age and Parturition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39, 269–273.

Article 3 :

Activation des voies de signalisation Sonic Hedgehog et β -caténine au cours du développement de la surrénale fœtale humaine

Alexandre Naccache^{a,b}, Mireille Castanet^{a,b}, Céline Duparc^a, Michaël Thomas^a, Sophie Patrier^c, Annie Laquerrière^c, Hervé Lefebvre^{a,d}, Estelle Louiset^a

^aNormandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000 Rouen, France

^bCHU de Rouen, Service de Pédiatrie Médicale, Rouen, France

^cCHU de Rouen, Service d'Anatomopathologie, Rouen, France

^dCHU de Rouen, Service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques, Rouen, France

Auteurs :

Alexandre Naccache : alexandre.naccache@chu-rouen.fr

Mireille Castanet : mireille.castanet@chu-rouen.fr

Céline Duparc : celine.duparc@univ-rouen.fr

Michaël Thomas : michael.thomas@univ-rouen.fr

Sophie Patrier : sophie.patrier@chu-rouen.fr

Annie Laquerrière : annie.laquerriere@chu-rouen.fr

Hervé Lefebvre : herve.lefebvre@chu-rouen.fr

Estelle Louiset : estelle.louiset@univ-rouen.fr

Article en préparation

Activation des voies de signalisation Sonic Hedgehog et β -caténine au cours du développement de la surrénale fœtale humaine

Alexandre Naccache^{a,b}, Mireille Castanet^{a,b}, Céline Duparc^a, Michaël Thomas^a, Sophie Patrier^c, Annie Laquerrière^c, Hervé Lefebvre^{a,d}, Estelle Louiset^a

^aNormandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Laboratoire Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale de Normandie, 76000 Rouen, France

^bCHU de Rouen, Service de Pédiatrie Médicale, Rouen, France

^cCHU de Rouen, Service d'Anatomopathologie, Rouen, France

^dCHU de Rouen, Service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques, Rouen, France

Résumé

Les voies Shh et Wnt/ β -caténine sont impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire surrénalienne lors du développement embryonnaire murin. Un rôle équivalent chez l'homme semble envisageable. La présence des acteurs des voies Shh et Wnt/ β -caténine a été évaluée en parallèle de la prolifération et la différenciation cellulaire au cours du développement de la surrénale fœtale humaine.

Les acteurs de la voie Shh sont détectés à tous les stades sans lien avec la diminution de l'index de prolifération Ki67 survenant entre 18 et 22 semaines d'aménorrhée (SA). En revanche, une corrélation positive entre les niveaux d'expression de *SHH* et *HSD3B2*, codant la 3 β HSD, enzyme de la stéroïdogénèse, a été mise en évidence faisant le lien entre activation de la voie Shh et la différenciation du phénotype stéroïdogène. L'analyse de co-marquages a révélé que la voie Shh est active dès le premier stade examiné dans des cellules stéroïdogènes de la zone définitive complètement différenciées, exprimant SF1, 3 β HSD et CYP21. Une distribution nucléaire et cytoplasmique de la β -caténine, indiquant l'activation de la voie, est retrouvée dès 18 SA, soit avant l'expression de l'aldostérone synthase qui est détectée à partir de 24 SA. Cette donnée suggère que l'activité de la voie β -caténine n'est pas suffisante pour la mise en place de la fonction minéralocorticoïde.

En conclusion, les voies Shh et β -caténine sont actives dès les stades précoces du développement de la surrénale fœtale humaine durant la période de prolifération cellulaire puis au cours de la phase de différenciation des cellules productrices d'aldostérone.

Abstract

Sonic Hedgehog (Shh) and Wnt/ β -catenin pathways are known to be involved in adrenal proliferation and cell differentiation in mouse fetal development. Similar role in human adrenal can be hypothesized. The occurrence of the proteins of the Shh and Wnt/ β -catenin signaling pathways was investigated in parallel to cell proliferation and differentiation processes during the human fetal adrenal development.

Shh actors were detected in all studied stages, unrelated with the reduction of the Ki67 proliferating index that occurs between 18 and 22 weeks of gestation (WG). However, a positive correlation between *SHH* and *HSD3B2* (encoding the 3 β HSD) mRNA levels was noticed, making the connection between the activation of Shh pathway and the acquisition of the steroidogenic phenotype. Co-labelling analysis revealed that the Shh pathway is activated from the first stage studied in mature steroidogenic cells of the definitive zone. A nuclear and cytoplasmic accumulation of β -catenin, indicating activation of the signaling pathway, was detected from 18 WG, before the expression of CYP11B2, noticed from 24 WG. This result suggests that the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is not sufficient to promote the establishment of the mineralocorticoid function.

In conclusion, Shh and Wnt/ β -catenin signaling pathways are active from early stages of human fetal adrenal development during cell proliferation and also during the later differentiation phase of the aldosterone-producing cells.

1. Introduction

L'organogenèse est contrôlée par de nombreux facteurs de transcription et de croissance, ainsi que par l'activation de voies de signalisation intracellulaire, comme les voies Sonic Hedgehog (Shh) et Wnt/ β -caténine. L'activation de la voie Shh est initiée lorsque le ligand Shh (codé par *SHH*) se fixe sur son récepteur membranaire Patched 1 (codé par *PTCH1*), entraînant la levée de l'inhibition d'un autre récepteur transmembranaire, Smoothed (codé par *SMO*), puis la libération des facteurs de transcription de la famille Gli (*glioma-associated oncogene* ; codés par les gènes *GLI1*, *GLI2*, *GLI3*) (Watson et al., 2010). Ces derniers sont alors transloqués dans le noyau où ils induisent la transcription de gènes cibles. Le facteur Gli1 est considéré comme un facteur de transcription activateur, tandis que Gli3 exerce une activité inhibitrice et Gli2 une activité mixte en fonction des gènes cibles (Briscoe and Théron, 2013). La voie Wnt/ β -caténine met également en jeu différents acteurs. En l'absence du ligand Wnt, la β -caténine est en majorité associée aux cadhérines de la membrane plasmique qui interviennent dans les interactions cellule-cellule. Sa présence au niveau cytoplasmique est faible du fait de son interaction avec un complexe protéique qui entraîne sa dégradation dans le protéasome (Clevers and Nusse, 2012). La liaison de Wnt au récepteur Frizzled et au co-récepteur LRP5/6 (*Low-Density Lipoprotein receptor-related protein 5/6*) induit la séquestration du complexe à la membrane plasmique. La β -caténine, n'interagissant plus avec le complexe protéique, s'accumule dans le cytoplasme. Celle-ci peut alors entrer dans le noyau et s'associer aux facteurs de transcription de la famille LEF/TCF (*lymphoïde enhancer factor/T cell factor*) pour permettre l'activation des gènes cibles (MacDonald et al., 2009).

Au début du développement (8 semaines d'aménorrhée [SA]), le cortex surrénalien humain est composé de 2 zones : au centre, la

zone fœtale (ZFo), composée de larges cellules éosinophiles responsables de la synthèse des androgènes, et en périphérie, la zone définitive (ZD), composée de petites cellules basophiles condensées ayant une faible activité stéroïdogène (Ishimoto and Jaffe, 2010). La zone de transition (ZT) apparaît entre les 2 autres couches au cours du 2^{ème} trimestre de grossesse et comporte des cellules aux caractéristiques intermédiaires. Entre 14 et 24 SA, les cellules progénitrices de la zone sous-capsulaire exprimant le facteur de transcription SF1 (*steroidogenic factor 1*) se différencient progressivement pour acquérir la capacité de synthétiser des glucocorticoïdes (Narasaka et al., 2001). L'acquisition de la fonction minéralocorticoïde par les cellules stéroïdogènes est plus tardive puisqu'elle intervient au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse (Naccache et al., 2016; Johnston et al., 2018). La surrénale en développement est également le siège d'une prolifération cellulaire qui se déroule en grande majorité à la périphérie de la glande. En effet, les cellules de la ZD possèdent des caractéristiques cytologiques d'un état prolifératif, et la plupart d'entre elles expriment des marqueurs d'activité mitotique, comme le *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Spencer et al., 1999; Ishimoto and Jaffe, 2010). Les données actuelles sont en faveur de l'hypothèse d'une migration centripète des cellules de la ZD vers la ZFo qui s'accompagnerait d'un changement phénotypique.

L'utilisation de modèles murins a démontré que les voies Shh et Wnt/ β -caténine sont impliquées dans le contrôle de la différenciation des cellules stéroïdogènes. En particulier, il a été montré par des expériences de lignage cellulaire que les cellules souches et progénitrices localisées dans les régions intra- et sous-capsulaires expriment les acteurs de la voie Shh. Précisément, Shh est produit dans des groupes de cellules incomplètement différenciées, positives pour SF1, mais qui ne synthétisent pas les enzymes des étapes finales

de la stéroïdogénèse telles que Cyp11b2 ou Cyp11b1 (King et al., 2009). La répression de la voie Shh est associée à l'apparition du phénotype stéroïdogène et s'accompagne d'une migration centripète des cellules différenciées vers le cortex profond (King et al., 2009). En ce qui concerne la voie Wnt/ β -caténine, des travaux ont mis en évidence la présence de β -caténine dans les cellules de la région sous-capsulaire dès les premiers stades de développement. L'inactivation du gène *Ctnnb1* codant la β -caténine dans les cellules corticales est à l'origine d'une aplasie surrénalienne (Kim et al., 2008). Ces résultats indiquent que la voie de signalisation β -caténine régule l'activité mitotique. Par ailleurs, la β -caténine semble également impliquée dans la différenciation des cellules de la zone glomérulée puisque l'activation constitutive de la voie entraîne non seulement une accumulation de cellules indifférenciées dans la région capsulaire, mais également une expansion de la zone glomérulée associée à une augmentation de la sécrétion d'aldostérone chez la souris adulte (Berthon et al., 2010, 2012). Ces données soulignent donc l'importance des voies Shh et Wnt/ β -caténine dans le développement surrénalien murin.

L'observation d'agénésies ou de dysgénésies surrénaliennes chez des patients porteurs de mutations inactivatrices de *GLI3* et *WNT4* sont en faveur du rôle de ces voies dans le développement de la surrénale humaine (Mandel et al., 2008; Hall, 2016). Cependant, à ce jour, l'expression des différents acteurs de ces voies n'a été que peu étudiée puisque seuls les travaux de Gomes *et al.* ont rapporté la présence des facteurs de transcription Gli dans le cortex de la surrénale fœtale (Gomes et al., 2014). Le but de cette étude a été d'examiner le profil d'expression des acteurs des voies Shh et Wnt/ β -caténine en parallèle de la prolifération cellulaire et de la différenciation surrénalienne humaine au cours du développement.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Matériel

Les glandes surrénales fœtales humaines étudiées sont issues de produit d'interruption volontaire de grossesse et/ou de mort fœtale *in-utero* conservées dans la collection biologique du service d'anatomopathologie du CHU de Rouen. L'âge gestationnel des fœtus a été estimé en SA, soit par la date des dernières règles, soit par les données de l'échographie du 1^{er} trimestre de grossesse. Seuls les fœtus indemnes de toute pathologie surrénalienne ont été étudiés. Trente surrénales fœtales issues de fœtus âgés de 16 à 41 SA ont été incluses. Les interruptions médicales de grossesse ont été approuvées par le comité d'éthique local du centre pluridisciplinaire de diagnostic prénatal. Le Centre de Ressource Biologique du CHU de Rouen est accrédité pour la constitution de collections biologiques et l'utilisation des échantillons de surrénales humaines a été validée par l'agence de Biomédecine. Les échantillons utilisés pour les études d'immunohistochimie (n=30) ont été fixés dans du formalin, inclus en paraffine, puis coupés en sections de 5 μ m. Des fragments de surrénales fœtales (n=10, 1 échantillon pour les stades 20, 22, 24, 25, 29, 30, 33, 41 SA, et 2 échantillons pour le stade 18 SA) ont également été congelés à -80°C en vue d'extraire les acides nucléiques. Des surrénales adultes issues de patients ayant bénéficié d'une néphrectomie élargie suite à un cancer du rein ont été utilisées comme tissus contrôles pour les expériences protéiques.

2.2. Méthodes

2.2.1. RT-PCR

Les ARNs des surrénales fœtales ont été extraits des tissus congelés à l'aide de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) puis purifiés sur des mini-colonnes Nucleospin RNAII (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARNs ont été transcrits en ADNc (ADN complémentaire) en utilisant le système de transcription inverse

ImProm-II (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ARNm polyA de surrénale adulte (Clontech, Ozyme, Montigny-le Bretonneux), ont été utilisés comme contrôles positifs. L'amplification par PCR a été réalisée en duplicate en utilisant le tampon de mélange Master SYBR Green I (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) avec un système de PCR en temps réel QuantStudio 3 (ThermoFisher,

Illkirch-Graffenstaden, France) avec des amorces spécifiques (Tableau 1). La quantification des ARNs dans chaque échantillon a été normalisée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ en utilisant d'une part l'ADNc de *PBGD* (*human porphobilinogen deaminase*) et *TBP* (*TATA box binding protein*) comme gènes de référence, et, d'autre part les surrénales adultes.

Nom du gène	Numéro d'accèsion sur GenBank	Amorce	Séquence	Longueur de l'amplicon (bp)
<i>PBGD</i> (<i>human porphobilinogen deaminase</i>)	NM_000190.3	Sens	5'-CTGCAACGGCGGAAGAA-3'	67
		Antisens	5'-AGCTGGCTCTGCGGGTAC-3'	
<i>TBP</i> (<i>TATA box binding protein</i>)	NM_003194	Sens	5'-AGGAAAAAATTGAATAGTGAGACGAGTTCCA-3'	161
		Antisens	5'-TGGACTAAAGATAGGGATTCCGGGAGT-3'	
<i>HSD3B2</i>	NM_000198.3	Sens	5'-TTGGACAAGGCCTTCAGACA-3'	150
		Antisens	5'-ACAGGCGGTGTGGATGAC-3'	
<i>SHH</i>	NM_000193	Sens	5'-CTGTGGTGGCCTTCTACATCCC-3'	62
		Antisens	5'-GTGGCCATCTTCGTCCA-3'	
<i>PTCH1</i>	NM_000264	Sens	5'-TGTTCCGCATGATGGGC-3'	65
		Antisens	5'-AGCGATCAGGATGACCACG-3'	
<i>SMO</i>	NM_005631	Sens	5'-CAGTTTCAGCGGTGCCAAC-3'	74
		Antisens	5'-GGTGAGTGTGTGCAGCAGCT-3'	

Table 1. Amorces utilisées en RT-PCR quantitative.

2.2.2. Immunohistochimie et immunohistofluorescence

Les coupes de tissus ont été déparaffinées par du cyclohexane puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentrations décroissantes. Les lames ont ensuite été immergées dans du PBS (pH 7,4) avec 0,2% de triton et 1% BSA, pour l'immunohistofluorescence ou du TBS (Tris-buffered saline, pH 7,4) pour l'immunohistochimie. Un démasquage antigénique à la chaleur (95°C) a été réalisé pendant 20 minutes dans un tampon citrate (pH 6) ou Tris-EDTA (pH 9), suivant les anticorps primaires (Tableau 2).

Pour les études d'immunohistochimie conventionnelle, les coupes réhydratées ont été traitées par une solution de blocage des peroxydases endogènes (Dako Corporation, Les Ulis, France) pendant 5 minutes. Les lames ont été incubées avec les anticorps primaires dilués dans l'*Antibody Diluent Reagent Solution* (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) (Tableau 2). Après lavage et incubation avec un anticorps

secondaire couplé à l'HRP (horseradish peroxidase), la révélation a été réalisée avec le kit En Vision+ System-HRP (Dako, Glostrup, Danemark). Enfin, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline, déshydratées par des bains d'éthanol, puis ont été montées entre lames et lamelles grâce à une solution d'inclusion Eukitt. Les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope Nikon DXC950 sur la plateforme d'imagerie PRIMACEN (Université de Rouen).

Pour l'immunohistofluorescence, un immunobloquage des sites non-spécifiques a été réalisé par incubation avec du sérum non-immun (*Normal Donkey Serum*) pendant 30 minutes. Les lames ont ensuite été incubées une nuit à +4°C avec un anticorps primaire (Tableau 2) dilué dans le tampon. Après rinçage, un anticorps secondaire conjugué à différents fluorochromes (Alexa 488 nm, Alexa 594 nm) a été appliqué pendant 90 minutes à température ambiante. Les noyaux des cellules ont été colorés au DAPI pendant 5 minutes. Les lamelles ont ensuite été montées avec du *Dako Fluorescent Mounting*

Medium. Les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope confocal Leica de type TCS SP8 MP (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) sur la plateforme d'imagerie PRIMA-CEN.

Protéine détectée	Fournisseur	Dilution
SF1	R&D systems	1/100
3 β HSD	Proteintech.	1/100
17-OH	Drs V Luu The et G Pelletier	1/2000
21-OH	Santa Cruz Biotechnology	1/150
CYP11B2	Pr K Mukai	1/750
Shh	Abcam	1/100
Patched 1	Abcam	1/100
Smoothened	Abcam	1/100
Gli1	Abcam	1/300
β -caténine	Roche Diagnostics	Prêt à l'emploi
Ki67	Dako	1/150

Table 2. Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie immunohistofluorescence.

2.2.3. Analyse des données

La prolifération cellulaire a été quantifiée pour chaque tissu marqué au Ki67 sur une série de 10 images provenant de la même coupe photographiée à l'objectif x10. L'index Ki67 a été estimé à l'aide d'un comptage automatisé sous ImageJ (Schneider et al., 2012) associé au plugin ITCN (*Image-based Tool for Counting Nuclei*). La zone d'intérêt de l'étude a été délimitée sous ImageJ à partir des caractéristiques morphologiques spécifiques de la ZD. L'ensemble des noyaux cellulaires ont été détectés en utilisant les paramètres suivants : Largeur : 9, Distance minimale : 4.5, Seuil : 2.2-2.4. Pour la détection des noyaux immunopositifs pour le marquage Ki67, seul le seuil était modifié à 5. Le ratio a ensuite été

calculé par le rapport du nombre de noyaux marqués sur 1000 noyaux présents dans la zone d'intérêt.

L'intensité relative de l'immunomarquage 3 β HSD a été déterminée à l'aide du H-score décrit par McCarty, dans lequel le pourcentage de cellules marquées est multiplié par un facteur allant de 0 à 3, en fonction de l'intensité du signal (McCarty et al., 1985). L'immuno-réactivité est ainsi caractérisée comme non présente (0), faible (1), modérée (2), ou très forte (3). A partir des images acquises au microscope, 20 régions de 0.3 mm² de surface ont été délimitées dans la zone définitive puis analysées pour évaluer le H-score. Cette quantification a été réalisée par 2 opérateurs indépendants en aveugle.

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad software Inc., San Diego, USA). Une étude de corrélation a été effectuée en déterminant le coefficient de corrélation de Spearman non paramétrique avec une significativité retenue pour une valeur de $p < 0.05$.

3. Résultats

3.1. Prolifération et différenciation stéroïdogène

La prolifération des cellules a été évaluée par un marquage immunohistologique au Ki67 sur des coupes de surrénales de fœtus âgés de 18 à 36 SA. De très nombreux noyaux immuno-positifs ont été détectés essentiellement dans la ZD, zone composée de cellules au cytoplasme compact (Fig. 1A). Quelques cellules immuno-réactives sont également présentes dans la ZFo durant les stades précoces de développement (18-22 SA). La différenciation des cellules a été étudiée durant la même période de développement par un marquage de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β HSD), enzyme impliquée dans la synthèse des gluco- et minéralocorticoïdes. Seules quelques cellules faiblement positives pour la 3 β HSD sont visualisées dans la ZD à 18 SA, alors qu'une grande majorité des cellules sont intensément marquées à partir de 22

SA dans toute la région sous-capsulaire (Fig. 1B). Au contraire, toutes les cellules de la ZFo

restent négatives quelque soit le stade de développement. La quantification du marquage

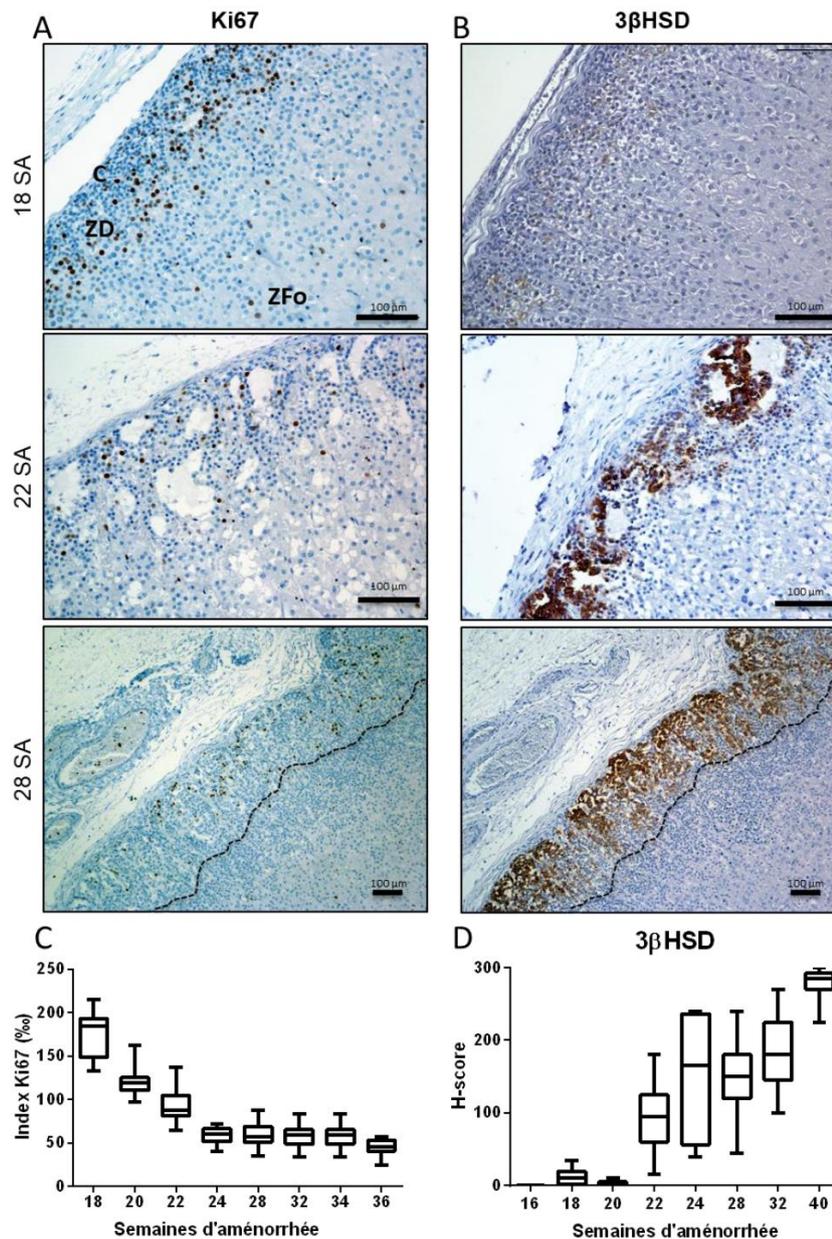


Fig. 1. Prolifération et différenciation cellulaire dans la surrénale fœtale humaine.

A, B) Prolifération visualisée par le marquage Ki67 (A), et différenciation évaluée par l'immunomarquage de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3βHSD) (B) aux stades de 18, 22 et 28 SA. C, D) Evolution de l'index Ki67 (C) et du H-score de l'immunomarquage 3βHSD (D) dans la zone définitive au cours du développement surrénalien.

C : capsule, ZD : Zone définitive, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée. La ligne pointillée représente la délimitation du marquage 3βHSD

Ki67 dans la ZD indique que l'index de prolifération décroît de 184 à 61% entre 18 et 24 SA, puis se stabilise à environ 50% jusqu'à 36 SA (Fig. 1C). La mesure semi-quantitative de l'immunoréactivité de la 3βHSD révèle que la médiane du H-score augmente progressivement de 5 à 285 entre 20 et 40 SA (Fig. 1D).

3.2. Expression de la voie Shh

L'expression des acteurs de la voie Shh dans les surrénales fœtales a été étudiée à la fois par RT-PCR quantitative et par immunohistochimie. Le niveau d'expression du transcrite du gène *SHH* est faible à 18 SA, puisqu'il ne représente que la moitié de celui mesuré dans le tissu surrénalien adulte (Fig. 2A). La quantité d'ARNm de *SHH* baisse entre 18 et 24 SA, puis le niveau d'expression augmente progressivement jusqu'aux stades proches du terme, pour atteindre environ 2/3 des niveaux adultes. En revanche, l'expression des gènes codant Patched 1 (*PATCH1*) et Smoothened (*SMO*) demeure stable entre 18 et 41 SA, et équivalent à celui mesuré dans la surrénale adulte (Fig. 2A).

Afin d'évaluer l'implication de la voie Shh dans la différenciation des cellules surrénales, l'expression du gène *HSD3B2*, codant la 3βHSD, a été analysée en parallèle. Les ARNm du gène *HSD3B2* sont faiblement détectés de 18 à 24 SA, puis leur niveau augmente régulièrement par la suite, restant toutefois inférieur à celui de la surrénale adulte. Les transcrits des gènes *SHH* et *HSD3B2* sont corrélés positivement ($r : 0.88, p = 0.033$; Fig. 2B).

L'étude immunohistochimique des acteurs de la voie Shh a révélé la présence de Shh, ainsi que des récepteurs Patched 1 et Smoothened dans la surrénale fœtale humaine dès le premier stade étudié (16 SA) (Fig. 3). Dans la capsule, Shh est peu observé alors que les protéines Patched 1 et Smoothened sont fréquemment détectées.

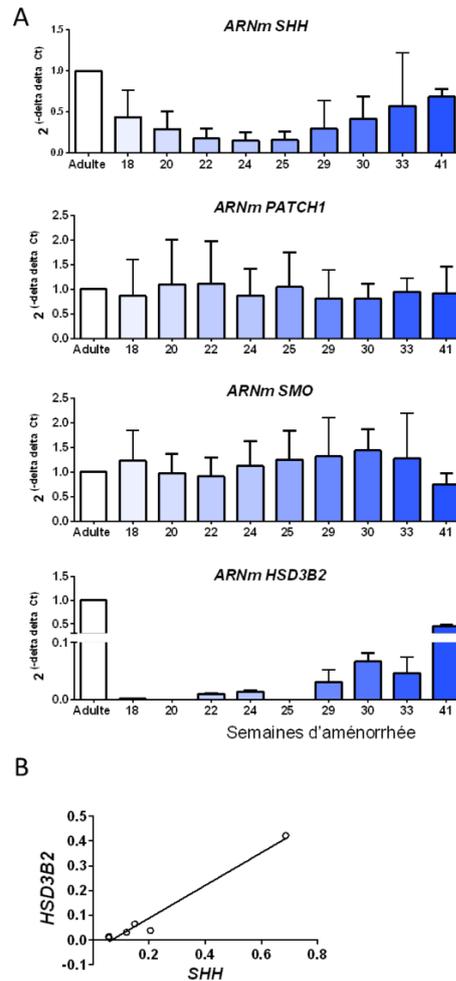


Fig. 2. Expression des gènes codant les acteurs de la voie Sonic Hedgehog dans la surrénale fœtale humaine. A) Niveaux d'expression des ARNm des gènes *SHH*, *PATCH1* et *SMO* et *HSD3B2* entre 18 et 41 SA, normalisés selon leur taux d'expression dans des surrénales adultes et aux gènes de ménage. B) Corrélation entre les taux d'expression des ARNm des gènes *HSD3B2* et *SHH* dans les surrénales fœtales. $r : 0,88, p = 0,033$.

Dans la ZD, les immunomarquages pour l'ensemble des acteurs de la voie sont faibles à 16 SA. Par la suite, une forte immuno-réactivité est détectée dans la région sous-capsulaire à partir de 18 SA pour Patched 1 et Smoothened, et à 24 SA pour Shh. Dans la ZFo, ces protéines sont fortement exprimées à tous les stades étudiés.

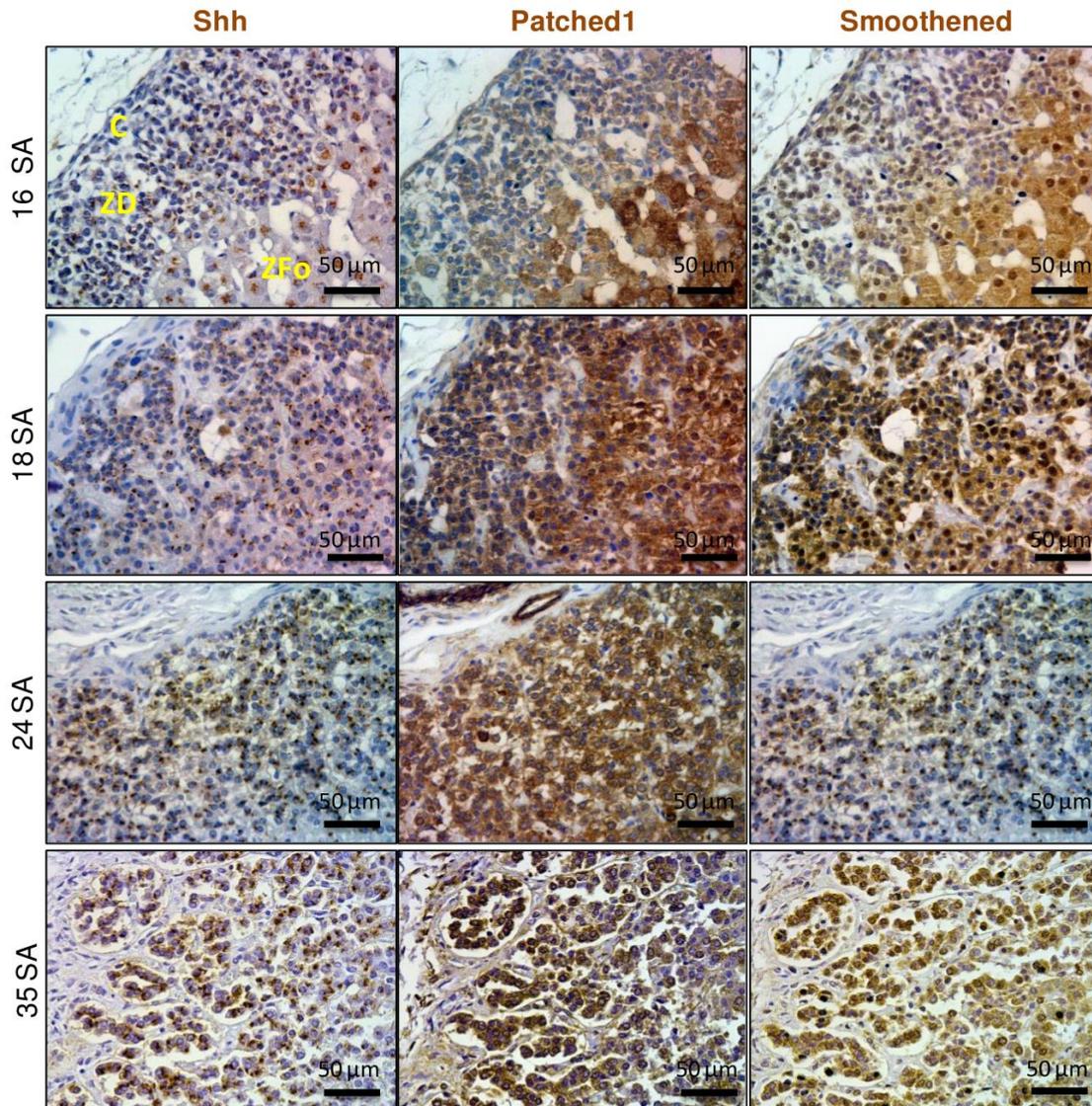


Fig. 3 Distribution de Sonic Hedgehog (Shh), Patched 1 et Smoothed dans la surrénale fœtale humaine.

Immunomarquages Shh, Patched 1 et Smoothed à 16, 18, 24 et 35 SA.

C : capsule, ZD : Zone définitive, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée

Afin d'évaluer la fonctionnalité de la voie Shh, nous avons examiné la distribution de Gli1, marqueur d'activation de la voie. Une forte immunoréactivité à Gli1 est observée à la fois dans la capsule, la ZD et la ZFo, quelque soit le stade de développement. L'étude de la distribution subcellulaire de Gli1 révèle que la protéine est fortement exprimée dans le cytoplasme des cellules à tous les stades étudiés. De plus, un immunomarquage est localisé au

niveau nucléaire dans la capsule. En revanche, peu de noyaux sont positifs pour Gli1 dans la ZD à 16-18 SA. Aux stades plus avancés, de nombreux noyaux sont immuno-marqués pour Gli1 dans la région sous-capsulaire, ce qui indique le renforcement de l'activation de la voie Shh dans la ZD (Fig. 4).

3.3. Voie Shh et différenciation stéroïdogène

Afin de relier l'expression des acteurs de la voie Shh à l'acquisition du phénotype stéroïdogène des cellules surréaliennes, les immunomarquages Gli1 et du facteur de différenciation

stéroïdogène SF1 ont été comparés dans la ZD. A 16-18 SA, période durant laquelle les cellules n'expriment que faiblement la β HSD (Fig. 1), une immunoréactivité pour Gli1 est visualisée dans des cellules également positives pour SF1 (Fig 4). En comparant les immunomarquages

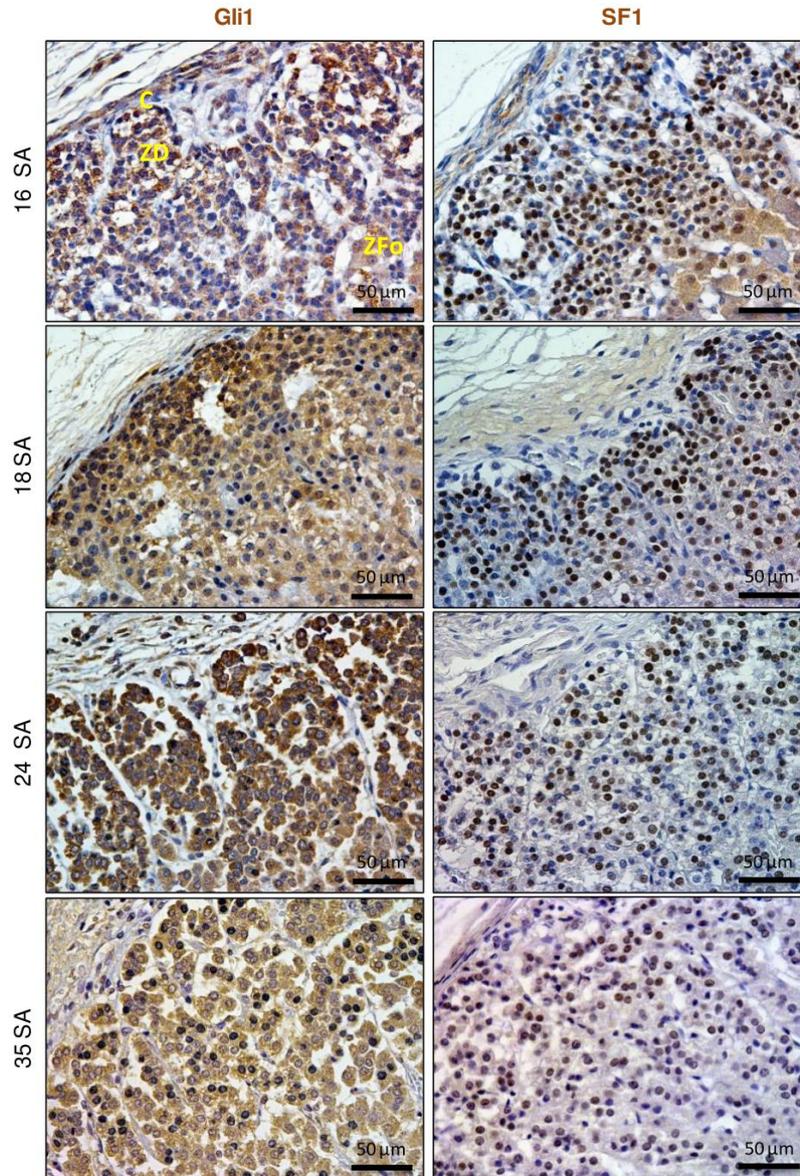


Fig. 4. Distribution de Gli1 et SF1 dans la surrénale fœtale humaine.

Immunomarquages Gli1, marqueur d'activation de la voie Shh, et le facteur stéroïdogénique (SF1), à 16, 18, 24 et 35 SA. C : capsule, ZD : Zone définitive, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée

réalisés sur coupes consécutives à des stades plus tardifs (24 et 35 SA), la présence de Shh a été détectée dans des cellules positives pour la 3 β HSD dans la ZD (Fig. 5A). La 17-hydroxylase (17-OH), enzyme impliquée dans la synthèse des androgènes, est retrouvée en majorité dans la ZFo, où quelques cellules sont également positives pour Shh à 20 SA (Fig. 5B). Par ailleurs, des expériences de co-marquage en

immunofluorescence ont révélé la production de Shh par des cellules exprimant la 21-hydroxylase (21-OH), enzyme de la voie de synthèse des gluco- et minéralo-corticoïdes, dans l'ensemble des couches du cortex surrénalien fœtal (Fig. 6). Toutefois, le co-marquage prédomine dans la région la plus externe du cortex à 34 SA.

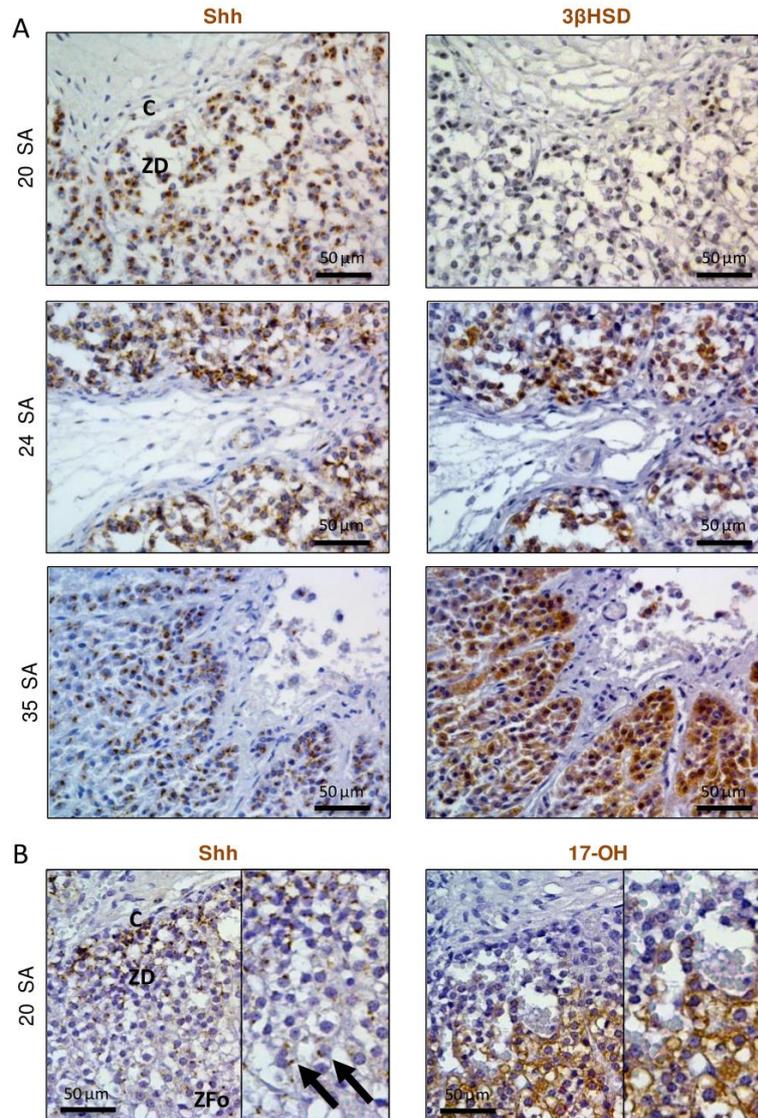


Fig. 5. Comparaison de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse 3 β HSD (A) et 17-hydroxylase (17-OH) (B) à celle de Shh sur des coupes consécutives de surrénale fœtale.

Les flèches indiquent des cellules immunopositives pour Shh à 20 SA dans la ZFo. C : capsule, ZD : Zone définitive, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée

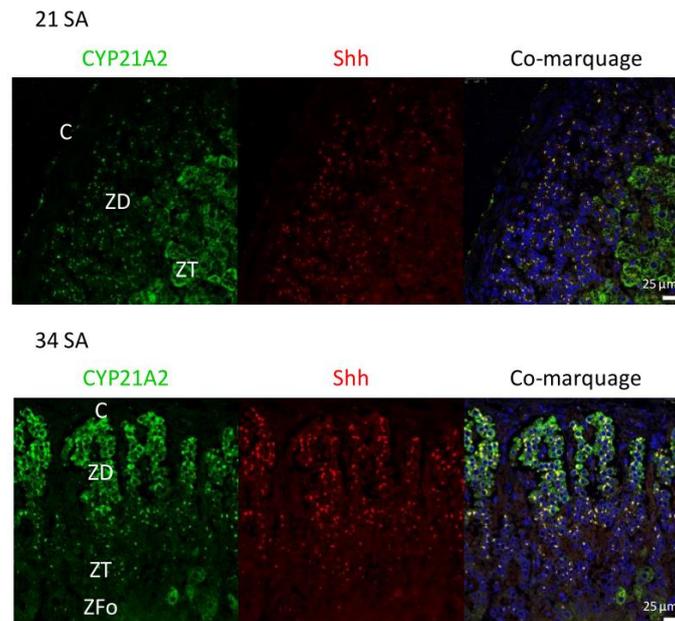


Fig. 6. Co-marquage de la 21-hydroxylase (CYP21A2) et de Shh dans la surrénale fœtale humaine.

Double marquage par immunofluorescence de CYP21A2 (vert) et Shh (rouge) à 21 et 34 SA. Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI.

C : Capsule, ZD : Zone définitive, ZT : Zone de transition, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée

3.4. Voie β -caténine et expression d'aldostérone synthase

La présence de la β -caténine a été recherchée par immunohistochimie entre 18 et 35 SA. La protéine est retrouvée majoritairement dans la ZD, où elle est localisée à la fois au niveau membranaire mais également dans le cytoplasme et les noyaux de nombreuses cellules (Fig. 7). En revanche, dans le cortex plus profond (ZT et ZFo), la β -caténine est détectée essentiellement à la membrane. La distribution subcellulaire du marquage indique que la voie de signalisation β -caténine est active uniquement dans la ZD à tous les stades de développement. Par comparaison, l'immuno-réactivité pour l'aldostérone synthase n'apparaît qu'à partir de 24 SA, et uniquement dans la ZD (Fig. 7).

4. Discussion

Notre étude montre que les acteurs des voies de signalisation Shh (Shh, Patched 1, Smoothed, Gli1) et β -caténine sont présents

dans la surrénale fœtale humaine dans des phases de développement durant lesquelles on observe une prolifération et/ou une différenciation des cellules surrénaliennes.

Du fait de la rareté des tissus, la prolifération cellulaire au sein de la surrénale fœtale humaine a été peu étudiée et les résultats de la littérature sont contrastés. En effet, Terada T. a révélé que l'index de prolifération Ki67 décroît au cours du développement de la surrénale, mais reste élevé à 200‰ durant les stades tardifs (Terada, 2015). En revanche, Folligan *et al.* ont rapporté une diminution régulière des index de prolifération Ki67 et PCNA dans la ZD à partir de 14 SA, conduisant à une prolifération quasiment nulle (< 10‰) après 25 SA (Folligan *et al.*, 2005). Dans notre étude, une décroissance de l'activité mitotique dans la ZD a également été constatée au décours du développement. Cependant, l'index de prolifération se situe à des niveaux intermédiaires entre ceux rapportés par Terada T. et Folligan *et al.* Plus précisément, l'activité mi-

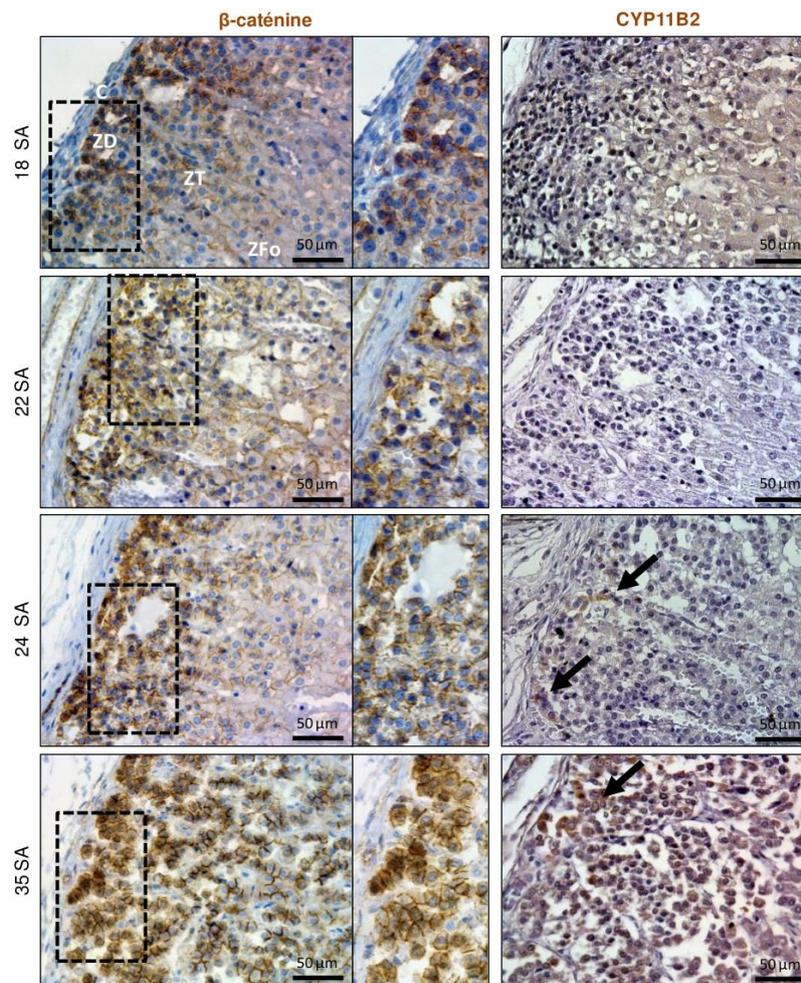


Fig. 7. Distribution de la β -caténine et de l'aldostérone synthase (CYP11B2) dans la surrénale fœtale humaine.

Immunomarquages β -caténine et CYP11B2 à 18, 22, 24 et 35 SA.

Le panneau central représente l'agrandissement de la zone encadrée en pointillé dans le panneau de gauche. C : capsule, ZD : Zone définitive, ZT : Zone de transition, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée. Les flèches indiquent des cellules immunoréactives pour CYP11B2.

-totique se stabilise au voisinage de 50% à partir de 24 SA. Cette valeur est assez proche de celles mesurées dans des surrénales d'enfants âgés de 0 à 3 ans (Hui et al., 2009), mais supérieure à celle retrouvée dans la surrénale adulte (proche de 2%) (Terzolo et al., 2001). De façon intéressante, la décroissance de l'index Ki67 que nous observons dans la ZD entre 18 et 24 SA est associée à une augmentation de l'expression de la 3β HSD, suggérant une diminution de la prolifération au profit de la différenciation des cellules à ces stades. L'hypothèse d'un rôle de la

voie Shh dans la prolifération surrénalienne à des stades très précoces de développement a été envisagée devant la mise en évidence d'une agénésie surrénalienne chez des patients porteurs de mutations inactivatrices de *SHH* (Hall, 2016). Cette hypothèse est également étayée par l'observation d'une hypoplasie surrénalienne consécutive à l'inactivation de *Shh* dans les précurseurs des cellules stéroïdiennes de modèles murins (Ching and Vilain, 2009; Huang et al., 2010). En accord avec ces données, il a été rapporté que les cellules cibles de Shh exprimant

Patched 1 et Gli1, marqueurs d'activation de la voie Shh dans la capsule des surrénales de souris constituent un réservoir de cellules souches (Drelon et al., 2015). La prolifération des cellules souches serait contrôlée par le facteur Shh produit par les précurseurs des cellules stéroïdogènes situées dans la région sous-capsulaire. Nos travaux mettent en évidence l'expression des acteurs de la voie Shh, à la fois au niveau de l'ARNm et des protéines, dans la surrénale fœtale humaine. Durant toute la période de développement étudiée, l'existence concomitante dans la capsule de cellules immunoréactives pour le récepteur Patched 1 et de noyaux positifs pour Gli1, témoigne de l'activité de la voie Shh dans des cellules qui pourraient constituer un contingent de cellules souches, à l'image de ce qui a été rapporté chez la souris. À l'inverse, la voie Shh semble peu active dans la ZD à 16 SA, puisque Patched 1 est rarement présent et que l'on retrouve un nombre restreint de noyaux positifs pour Gli1. La faible activité de la voie Shh à 16 SA coïncidant avec une forte prolifération cellulaire n'est pas en faveur du rôle de cette voie de signalisation dans le contrôle de la croissance des cellules progénitrices de la ZD à ce stade. Cette hypothèse est corroborée par l'augmentation ultérieure de l'immuno-marquage Patched 1 et l'apparition de noyaux positifs pour Gli1 dans la ZD, reflétant la fonctionnalité de la voie, alors que l'index de prolifération décroît fortement dans le même temps.

En revanche, la voie de signalisation β -caténine pourrait être associée à la prolifération cellulaire. Notre étude révèle que la β -caténine est présente dans la ZD dès le premier stade de développement examiné. La localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire de la protéine est en faveur de l'activation de cette voie à 18 SA lorsque la prolifération cellulaire est marquée. Il a par ailleurs été montré que la voie β -caténine est impliquée dans la prolifération de tumeurs surrénales puisque son inhibition induit une réduction de la prolifération (Doghman et al., 2008; Kim et al., 2008). Son activation au sein de la surrénale fœtale pourrait avoir un rôle similaire par l'induction de l'expression de

différents gènes impliqués dans la mitose (McCubrey et al., 2016), d'autant plus que l'expression du gène *CTNNB1* codant la β -caténine est presque quatre fois plus élevée dans la surrénale fœtale que dans la surrénale adulte (Rainey et al., 2001).

La découverte d'une corrélation positive entre les taux d'expression de *SHH* et de *HSD3B2*, codant la 3 β HSD, permet d'envisager un rôle de la voie Shh dans l'initiation de la différenciation stéroïdienne. Les études relatives à la voie Shh menées chez la souris ont révélé que les cellules souches (Patched1⁺ et Gli1⁺) intra-capsulaires n'expriment pas le facteur de transcription SF1 spécifique de la différenciation stéroïdogène, alors que les cellules précurseurs Shh⁺ présentes dans la zone sous-capsulaire produisent SF1 (Finco et al., 2015). Dans le cortex profond, des cellules stéroïdogènes plus différenciées exprimant des enzymes responsables de la synthèse des minéralo- ou glucocorticoïdes ne possèdent ni Shh ni Gli1. Ces données indiquent que chez la souris la différenciation stéroïdogène s'accompagne d'une extinction de la voie de signalisation Shh. Notre étude menée sur les surrénales fœtales humaines montre que, contrairement à ce qui est décrit chez la souris, des cellules de la région sous-capsulaire sont à la fois immunoréactives pour Gli1 et SF1 avant l'apparition de la 3 β HSD, ce qui témoigne de l'activité de la voie Shh dans des cellules partiellement différenciées avant 24 SA. L'observation à des stades ultérieurs de la production de Shh dans des cellules différenciées exprimant la 3 β HSD et la 21-OH démontre que cette voie de signalisation n'est pas restreinte aux cellules progénitrices mais reste active tout au long du processus d'acquisition du phénotype stéroïdogène. De plus, des expériences menées dans notre équipe montrent que la voie Shh est également active dans le cortex surrénalien adulte, ce qui suggère que la voie pourrait contribuer au maintien du phénotype stéroïdogène tout au long la vie (Thomas M. *et al.*, données non publiées). L'observation de la fonctionnalité de la voie Shh à des stades précoces, bien avant l'apparition de cellules

produisant l'aldostérone synthase, indique que l'activation de cette voie de signalisation n'est pas suffisante pour l'acquisition de la fonction minéralocorticoïde.

Des données récentes indiquent que la production d'aldostérone est dépendante de la voie β -caténine. En effet, il a été montré que l'activation constitutive de la β -caténine entraîne une surexpression de Cyp11b2 associée à une augmentation de production d'aldostérone chez la souris adulte (Berthon et al., 2010). De même, l'activation de la voie β -caténine, objectivée par la localisation nucléaire du marquage β -caténine, a été rapportée dans une majorité d'adénomes surrenaliens responsables d'un hyperaldostéronisme (Boulkroun et al., 2011). Cependant, les mécanismes impliqués dans cette activation sont incomplètement connus, puisque les mutations activatrices du gène *CTNNB1* codant la β -caténine ont été décrites dans une minorité des adénomes de patients atteints d'hyperaldostéronisme primaire (Åkerström et al., 2016). L'activation de la voie β -caténine dans la ZD pourrait jouer un rôle dans la différenciation de la zone, puisqu'elle paraît être un marqueur de la zone glomérulée chez l'adulte, en contrôlant notamment l'expression du récepteur de l'angiotensine (Drelon et al., 2015) et en réprimant des marqueurs de zone fasciculée (Walczak et al., 2014). Nous avons donc envisagé le rôle de la voie β -caténine dans la mise en place de la fonction minéralocorticoïde et la répression de la synthèse des glucocorticoïdes dans la ZD au cours du développement chez l'homme. Notre étude révèle que la voie β -caténine est active dès 18 SA, un stade antérieur à l'apparition de l'aldostérone synthase qui débute vers 24 SA. L'activation de la voie semble donc nécessaire mais non suffisante pour permettre la mise en place de CYP11B2 au cours du développement, suggérant le rôle d'autres systèmes de régulation, comme la voie paracrine mastocytes/sérotinine (Naccache et al., 2016). Le fait que la voie β -caténine soit activée dans la ZD, région n'exprimant ni la 17-OH ni la 11 β -hydroxylase (Naccache et al., 2016), indique que cette voie de signalisation s'opposerait à la

synthèse de glucocorticoïdes dans cette zone. En revanche, ces deux enzymes, qui confèrent la capacité de synthèse des glucocorticoïdes, sont présentes dans la ZT où la voie β -caténine n'est pas active.

Il est bien établi qu'après la naissance, l'expression de CYP11B2 et la production d'aldostérone sont régulées par l'angiotensine II via l'activation des récepteurs AT1R. Des travaux ont rapporté que les gènes *ANG2* et *AT1R*, codant respectivement l'angiotensine II et son récepteur, sont fortement exprimés dans les surrénales fœtales dès 14 SA (Ishimoto et al., 2008; Xing et al., 2009). L'angiotensine II ne paraît donc pas limitante pour une mise en place précoce de la fonction minéralocorticoïde. Chez l'enfant et l'adulte, la synthèse d'aldostérone est aussi contrôlée dans une moindre mesure par l'ACTH hypophysaire en activant son récepteur, le MC2R. Des travaux réalisés chez le fœtus humain ont révélé que les niveaux d'ACTH plasmatique sont très faibles avant 29 SA et augmentent au cours de la grossesse (Bagnoli et al., 2013). On peut donc envisager que l'accroissement progressive des taux circulants d'ACTH après 29 SA associée à une forte expression du gène codant le MC2R dans la surrénale fœtale (Xing et al., 2009; Bagnoli et al., 2013) favorise non seulement la production de glucocorticoïdes mais également l'expression de CYP11B2.

En conclusion, les voies Shh et β -caténine sont actives dès les stades précoces du développement de la surrénale fœtale humaine, avec des différences notables en terme de distribution par rapport aux données murines. La voie Shh, active dans des cellules stéroïdogènes, semble associée à la différenciation stéroïdogène. La voie β -caténine est active précocement dans la ZD, en amont de la mise en place de la fonction minéralocorticoïde. Des études de culture cellulaire menée à partir de surrénales fœtales humaines permettraient de tester l'effet d'inhibiteurs de ces voies sur la prolifération et différenciation surrenalienne pour évaluer leurs rôles respectifs dans ces processus physiologiques.

Références

- Åkerström, T., Maharjan, R., Sven Willenberg, H., Cupisti, K., Ip, J., Moser, A., Ståhlberg, P., Robinson, B., Alexander Iwen, K., Dralle, H., Walz, M.K., Lehnert, H., Sidhu, S., Gomez-Sanchez, C., Hellman, P., Björklund, P., 2016. Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep* 6, 19546.
- Bagnoli, F., Mori, A., Fommei, C., Coriolani, G., Badii, S., Tomasini, B., 2013. ACTH and cortisol cord plasma concentrations in preterm and term infants. *J. Perinatol.* 33, 520–524.
- Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J., Val, P., 2012. Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 351, 87–95.
- Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Jossineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrançois-Martinez, A.M., Martinez, A., Val, P., 2010. Constitutive β -catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Human Molecular Genetics* 19, 1561–1576.
- Boulkroun, S., Samson-Couterie, B., Golib-Dzib, J.-F., Amar, L., Plouin, P.-F., Sibony, M., Lefebvre, H., Louiset, E., Jeunemaitre, X., Meatchi, T., Benecke, A., Lalli, E., Zennaro, M.-C., 2011. Aldosterone-Producing Adenoma Formation in the Adrenal Cortex Involves Expression of Stem/Progenitor Cell Markers. *Endocrinology* 152, 4753–4763.
- Briscoe, J., Théron, P.P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 416–429.
- Ching, S., Vilain, E., 2009. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis* 47, 628–637.
- Clevers, H., Nusse, R., 2012. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149, 1192–1205.
- Doghman, M., Cazareth, J., Lalli, E., 2008. The T cell factor/ β -catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3222–3225.
- Drelon, C., Berthon, A., Mathieu, M., Martinez, A., Val, P., 2015. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* 408, 156–164.
- Finco, I., LaPensee, C.R., Krill, K.T., Hammer, G.D., 2015. Hedgehog signaling and steroidogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* 77, 105–129.
- Folligan, K., Bouvier, R., Targe, F., Morel, Y., Trouillas, J., 2005. Histological and molecular study of fetal human adrenal cortex (12–36 wk). *Ann. Endocrinol.* (Paris). 66, 519–526.
- Gomes, D.C., Leal, L.F., Mermejo, L.M., Scrideli, C.A., Martinelli, C.E., Fragoso, M.C.B.V., Latronico, A.C., Tone, L.G., Tucci, S., Yunes, J.A., Cardinalli, I.A., Mastellaro, M.J., Brandalise, S.R., Ramalho, F., Moreira, A.C., Ramalho, L.N., de Castro, M., Antonini, S.R.R., 2014. Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1209–1216.
- Hall, J.G., 2016. The early history of Pallister-Hall syndrome-Buried treasure of a sort. *Gene* 589, 100–103.
- Huang, C.-C.J., Miyagawa, S., Matsumaru, D., Parker, K.L., Yao, H.H.-C., 2010. Progenitor Cell Expansion and Organ Size of Mouse Adrenal Is Regulated by Sonic Hedgehog. *Endocrinology* 151, 1119–1128.
- Hui, X.-G., Akahira, J. -i., Suzuki, T., Nio, M., Nakamura, Y., Suzuki, H., Rainey, W.E., Sasano, H., 2009. Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence. *Journal of Endocrinology* 203, 241–252.
- Ishimoto, H., Jaffe, R.B., 2010. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr. Rev.* 32, 317–355.
- Ishimoto, H., Minegishi, K., Higuchi, T., Furuya, M., Asai, S., Kim, S.H., Tanaka, M., Yoshimura, Y., Jaffe, R.B., 2008. The Periphery of the Human Fetal Adrenal Gland Is a Site of Angiogenesis: Zonal Differential Expression and Regulation of Angiogenic Factors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93, 2402–2408.
- Johnston, Z.C., Bellingham, M., Filis, P., Soffientini, U., Hough, D., Bhattacharya, S., Simard, M., Hammond, G.L., King, P., O’Shaughnessy, P.J., Fowler, P.A., 2018. The human fetal adrenal produces cortisol but no detectable aldosterone throughout the second trimester. *BMC Med* 16, 23.
- Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., Hammer, G.D., 2008. Targeted disruption of β -catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* 135, 2593–2602.
- King, P., Paul, A., Laufer, E., 2009. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 21185–21190.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z.U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M., Sprecher, E., 2008.

- SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 39–47.
- McCarty, K.S., Miller, L.S., Cox, E.B., Konrath, J., McCarty, K.S., 1985. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 109, 716–721.
- McCubrey, J.A., Rakus, D., Gizak, A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Lertpiriyapong, K., Fitzgerald, T.L., Yang, L.V., Montalto, G., Cervello, M., Libra, M., Nicoletti, F., Scalisi, A., Torino, F., Fenga, C., Neri, L.M., Marmiroli, S., Cocco, L., Martelli, A.M., 2016. Effects of mutations in Wnt/ β -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity-Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1863, 2942–2976.
- Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., Gomez-Sanchez, C.E., Mukai, K., Lefebvre, H., Castanet, M., 2016. Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 434, 69–80.
- Narasaka, T., Suzuki, T., Moriya, T., Sasano, H., 2001. Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* 174, 111–120.
- Rainey, W.E., Carr, B.R., Wang, Z.N., Parker, C.R., 2001. Gene profiling of human fetal and adult adrenals. *J. Endocrinol.* 171, 209–215.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Spencer, S.J., Mesiano, S., Lee, J.Y., Jaffe, R.B., 1999. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84, 1110–1115.
- Terada, T., 2015. Stem cells in the development and differentiation of the human adrenal glands. *Microsc. Res. Tech.* 78, 59–64.
- Terzolo, M., Boccuzzi, A., Bovio, S., Cappia, S., De Giuli, P., Ali, A., Paccotti, P., Porpiglia, F., Fontana, D., Angeli, A., 2001. Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology* 57, 176–182.
- Walczak, E.M., Kuick, R., Finco, I., Bohin, N., Hrycaj, S.M., Wellik, D.M., Hammer, G.D., 2014. Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 28, 1471–1486. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1060>
- Watson, S., Serrate, C., Vignot, S., 2010. [Sonic Hedgehog signaling pathway: from embryology to molecular targeted therapies]. *Bull Cancer* 97, 1477–1483.
- Xing, Y., Nakamura, Y., Rainey, W.E., 2009. G protein-coupled receptor expression in the adult and fetal adrenal glands. *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 43–50.

DISCUSSION

L'aldostérone est une hormone vitale dans la période post-natale, puisqu'elle intervient dans la régulation hydrosodée. Les nouveau-nés prématurés sont fortement sujets à développer un syndrome de perte de sel (Barrington, 2014), suggérant un défaut de synthèse des minéralocorticoïdes ou une anomalie d'action de ces derniers chez les prématurés. Dans ce travail, j'ai étudié la cinétique de mise en place de la voie minéralocorticoïde durant le développement, les mécanismes impliqués dans l'acquisition du phénotype des cellules productrices d'aldostérone, et les systèmes de régulation sous-jacents à la production d'aldostérone en périodes anté et post-natale. En particulier, plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la différenciation et la régulation des cellules corticosurréaliennes ont été étudiées, telles que les voies β -caténine et Shh, les mastocytes et le système de régulation sérotoninergique.

1 Développement de la surrénale

Du fait de la rareté des tissus, peu de travaux ont été consacrés à la prolifération cellulaire au sein de la surrénale fœtale humaine. Une étude avait montré que les index de prolifération restent élevés à des stades tardifs (Terada, 2015), alors qu'une autre rapportait des index très faibles après 25 SA (Folligan et al., 2005). Dans notre travail, nous avons constaté une décroissance de l'index Ki67 dans la ZD entre 18 et 24 SA, puis une stabilisation à partir de 24 SA avec des valeurs intermédiaires entre celles rapportées par les précédentes études. L'activité mitotique dans la ZD décroît entre 18 et 24 SA, et se stabilise ensuite avec des index Ki67 autour de 50%. De plus, nous avons observé une relation inverse entre la diminution de l'index Ki67 et l'augmentation de la 3β HSD nécessaire à la synthèse d'aldostérone entre 18 et 24 SA, suggérant que la diminution de la prolifération cellulaire est associée à une maturation des cellules stéroïdogènes de la ZD.

Le rôle de la voie Shh dans la croissance surrénalienne est majoritairement soutenu par les données rapportées chez la souris. Ainsi, une hypoplasie surrénalienne est constatée après l'inactivation de *Shh* dans les précurseurs des cellules stéroïdiennes de modèles murins (Ching and Vilain, 2009; Huang et al., 2010). De façon similaire, une agénésie surrénalienne a été rapportée chez des patients porteurs de mutations inactivatrices de *SHH* (Hall, 2016). Chez la

souris, la protéine Shh, produite par les cellules de la ZG, entraîne l'activation de cellules localisées dans la capsule surrénalienne exprimant le récepteur Patched 1 et le facteur de transcription Gli1, marqueur d'activation de la voie Shh. Les études de lignage cellulaire ont montré que les cellules capsulaires constitueraient un réservoir de cellules souches alors que celles exprimant Shh formeraient un contingent de cellules progénitrices, exprimant Sf1 mais pas les enzymes terminales de la stéroïdogénèse. Dans le cortex profond, des cellules stéroïdogènes plus différenciées exprimant des enzymes responsables de la synthèse des minéralo- ou gluco-corticoïdes ne possèdent ni Shh ni Gli1 (Laufer et al., 2012; Finco et al., 2015). Notre étude a mis en évidence l'expression des acteurs de la voie Shh dans la surrénale fœtale humaine de 18 à 40 SA. Durant toute la période étudiée, la détection dans la capsule de cellules immunoréactives pour le récepteur Patched 1 et également pour Gli1 fait supposer la présence d'un réservoir de cellules souches à l'image de ce qui a été rapporté chez la souris. Cependant, la voie Shh ne semble pas impliquée dans la prolifération cellulaire puisqu'une faible activité de la voie Shh à 16 SA coïncide avec une forte prolifération cellulaire dans la ZD.

La voie Wnt/ β -caténine joue un rôle clef dans la croissance et la différenciation surrénaliennes. Ainsi, chez les souris, le ligand Wnt4 activateur de la voie β -caténine est exprimé à partir de E11.5 dans la couche la plus externe de la surrénale, et une atrophie de la zone glomérulée a été rapportée chez les souris déficientes pour ce facteur (Heikkila, 2002). Il a par ailleurs été montré que la voie β -caténine est impliquée dans la croissance de tumeurs surrénaliennes puisque son inhibition induit une réduction de la prolifération cellulaire (Doghman et al., 2008; Kim et al., 2008). De plus, il a été montré que cette voie de signalisation induit l'expression de gènes impliqués dans la mitose (McCubrey et al., 2016). Notre étude révèle que la β -caténine est présente dans la ZD dès le premier stade de développement examiné. La localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire de la protéine est en faveur de l'activation de cette voie à 18 SA lorsque la prolifération cellulaire est marquée. L'activation de la voie dans la surrénale fœtale pourrait donc favoriser la croissance cellulaire, d'autant plus que l'expression du gène *CTNNB1* codant la β -caténine est presque quatre fois plus élevée dans la surrénale fœtale que dans la surrénale adulte (Rainey et al., 2001).

Les travaux de l'équipe ont rapporté que, chez l'adulte, les adénomes producteurs d'aldostérone (APA) présentant une abondante infiltration mastocytaire dans le tissu périadénomateux correspondaient à des tumeurs volumineuses, suggérant l'implication des

mastocytes dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Duparc et al., 2015). Ainsi, la question du rôle des mastocytes dans la croissance surrénalienne anténatale se pose. Cependant, au cours du développement de la glande surrénale humaine, nous avons noté une diminution du marqueur de prolifération Ki67 concomitante à l'apparition de la tryptase, marqueur d'activation mastocytaire, ce qui est plutôt en défaveur de l'implication des mastocytes dans la croissance surrénalienne. Par ailleurs, notre équipe a constaté que les surrénales de souris déficientes en mastocytes sont de taille et de structure équivalentes à celles des souris sauvages (Boyer HG, communication personnelle). De même, les patients atteints d'un piébalisme, pathologie rare due à une mutation hétérozygote du gène codant le facteur KIT (récepteur du SCF, facteur de croissance mastocytaire) responsable d'un déficit en mastocytes et d'un défaut de pigmentation, ne présentent pas d'anomalies cliniques évocatrices d'une pathologie surrénalienne (Oiso et al., 2013). Globalement, ces données indiquent que les mastocytes ne jouent pas un rôle crucial dans la croissance et le développement des glandes surrénales.

2 Différenciation fonctionnelle de la zone définitive

2.1 Mise en place des acteurs impliqués dans la stéroïdogénèse

2.1.1 Transport du cholestérol

Le cholestérol est le précurseur commun à tous les stéroïdes. Dans la surrénale adulte, l'apport de cholestérol à la cellule stéroïdogène provient soit de lipoprotéines circulantes, qui entrent dans la cellule par l'intermédiaire des récepteurs au LDL et HDL (=SRB1) cholestérol, soit d'une synthèse *de novo* dans le réticulum endoplasmique (Miller and Bose, 2011). Jusqu'à présent, des études *in vitro* avaient rapporté que la source principale de cholestérol dans la surrénale fœtale humaine provenait de la captation de cholestérol LDL circulant via son récepteur (Carr et al., 1980, 1982), mais la démonstration de hauts niveaux de transcrits du gène *SRB1* dans la surrénale fœtale humaine suggérait l'implication de ce récepteur dans l'apport de cholestérol (Liu et al., 1997). La cinétique d'expression de ces récepteurs au cours

	16 SA	18 SA	20 SA	22 SA	24 SA	28 SA	30-32 SA	40 SA
Ki67	++	++	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
β -caténine	+	+	+	+	+	+	+	+
Tryptase	-	+/-	+/-	+	+	+	++	+
TPH1	+	+	+	+	+	++	++	+
Shh	+	+	+	+	++	++	++	++
Patched 1	+	++	++	++	++	++	++	++
Smoothened	+	++	++	++	++	++	++	++
Gli1	-/+	+	+	+	+	+	+	+
SRB1	-	-	-	-	+	+	+	+
LDL-R	-	-	-	+/-	+	+	+	+
3 β HSD	-	+/-	+/-	+	+	+	+	++
CYP11B2	-	-	-	-	-/+	+	++	++
5-HT ₄ R	-	-	-	-	-	+	+	+
17-OH	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP11B1	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 15 : Frise chronologique d'apparition de différentes protéines dans la ZD de la surrénale fœtale humaine.

Cinétique et intensité d'expression du marqueur de prolifération Ki67, de la β -caténine, des acteurs de la voie Shh (Shh, Patched 1, Smoothened, Gli1), des mastocytes (tryptase), des protéines impliquées dans la voie sérotoninergique (TPH1, 5-HT₄R), des récepteurs au cholestérol et des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse (LDL-R, SRB1, 3 β HSD, 17-OH, CYP11B1, CYP11B2) dans la zone définitive au cours du développement de la surrénale fœtale humaine.

La couleur des rectangles désigne l'intensité d'expression, allant du blanc indiquant l'absence de détection, jusqu'au bleu foncé correspondant à une forte expression. SA = Semaines d'aménorrhée

du développement n'avait cependant jamais été analysée. Notre étude a montré que ces 2 récepteurs sont présents dans la ZT et la ZFo dès le stade étudié de 18 SA, mais qu'ils ne sont exprimés dans la ZD qu'à partir de 24 SA, suggérant une activité stéroïdogénique réduite aux stades antérieurs à 24 SA dans la ZD. La co-expression des deux récepteurs suggère d'ailleurs qu'ils sont conjointement impliqués dans l'apport de cholestérol à la cellule stéroïdogène au cours du développement.

La protéine StAR facilite le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne des mitochondries et permet sa transformation en prégnénolone constituant par ce fait la première étape de la stéroïdogénèse. Cette protéine est présente précocement dès 14 SA dans la ZD (Narasaka et al., 2001) ; elle n'est donc pas limitante pour les étapes ultérieures de la stéroïdogénèse dans la ZD.

2.1.2 3 β HSD et CYP21

La 3 β HSD, transformant la prégnénolone en progestérone, constitue une des étapes de la stéroïdogénèse essentielle à la synthèse d'aldostérone. Nos données immunohistochimiques ont relevé la présence de la 3 β HSD dans la ZD dès 18 SA, à un stade intermédiaire par rapport à ceux rapporté par Folligan *et al.* et Nasaka *et al.*, qui détectaient la présence de la 3 β -HSD respectivement à partir de 16 et 22 SA (Narasaka et al., 2001; Folligan et al., 2005). Ces différences pourraient être liées à des imprécisions sur les termes des fœtus inclus et/ou à des sensibilités différentes des anticorps utilisés en immunohistochimie. Dans la suite du développement, nous avons mis en évidence une expression de la 3 β HSD dans la ZD progressivement croissante entre 22 et 40 SA. L'expression de la 21-hydroxylase (CYP21), enzyme permettant la transformation de la progestérone en DOC, n'a pas été examinée précisément dans cette étude, mais dans la littérature, il a été rapporté que CYP21 était présente dans la ZD à partir de 23 SA (Narasaka et al., 2001).

2.1.3 CYP11B2

Pour la première fois, nous avons étudié de façon précise au cours du développement de la surrénale fœtale humaine l'apparition de l'aldostérone synthase, enzyme déterminante pour la synthèse d'aldostérone qui catalyse les dernières étapes de transformation à partir de la DOC. Ainsi, le gène *CYP11B2* est exprimé très faiblement dès 18 SA, puis de façon stable

jusqu'à 30 SA, et enfin, les niveaux des transcrits augmentent entre 30 et 41 SA. En immunohistochimie, la protéine est détectée à partir de 24-25 SA ; initialement isolée dans des groupes cellulaires, puis rapidement, elle est distribuée à l'ensemble de la ZD (**Figure 15**). La distribution des cellules immunoréactives pour CYP11B2 à des stades anténataux tardifs, observée sous forme de bande continue dans l'ensemble de la couche sous-capsulaire, est comparable à celle retrouvée dans des surrénales de jeunes enfants (Nanba et al., 2017). Au cours du vieillissement, l'aldostérone synthase est restreinte à quelques groupes de cellules dans la zone glomérulée (Nakamura et al., 2014). La baisse d'expression pourrait être liée aux apports sodés.

2.1.4 17-OH et CYP11B1

Nos travaux, concordants avec ceux de la littérature (Narasaka et al., 2001), ont montré que la 17-OH, enzyme impliquée dans la synthèse de cortisol et des androgènes, n'était pas exprimée dans la ZD, quel que soit la phase de développement. En revanche, cette enzyme est présente dans la ZT et ZFo dès le premier stade étudié (18 SA). Par ailleurs, la distribution de CYP11B1, enzyme nécessaire à la synthèse de cortisol, n'avait jusqu'à présent pas été examinée au cours du développement. Dans notre étude, nous montrons qu'entre 18 et 40 SA, CYP11B1 n'est jamais exprimée dans les cellules de la ZD mais uniquement dans celles de la ZT et ZFo. De plus, aucune cellule co-exprimant CYP11B1 et CYP11B2 n'a été observée, confirmant le fait que ces 2 enzymes sont mutuellement exclusives comme rapporté dans la surrénale adulte (Gomez-Sanchez et al., 2014).

2.2 Production d'aldostérone au cours du développement

Nos données relatives à l'expression des différents acteurs impliqués dans la voie de synthèse des minéralocorticoïdes au cours du développement sont en accord avec les dosages d'aldostérone plasmatique par spectrométrie de masse qui révèlent que l'aldostérone n'est pas produite chez des fœtus âgés de 11 à 21 SA (Johnston et al., 2018). De plus, nos résultats d'expression de CYP11B2 sont également concordants avec ceux de Martinerie *et al.* qui montrent que les nouveau-nés âgés de 26 à 32 SA possèdent une capacité réduite à synthétiser l'aldostérone (Martinerie et al., 2015).

L'évolution de la production d'aldostérone au cours du développement foetal reste discutée. Des études anciennes menées par Doerr *et al.* ont montré que les niveaux plasmatiques d'aldostérone au sang de cordon de nouveau-nés âgés de 33 à 36 SA étaient supérieurs à ceux de nouveau-nés à terme (Doerr *et al.*, 1988), alors que Procianoy *et al.* ont détecté des niveaux inférieurs chez des nouveau-nés âgés de moins de 34 SA comparés à ceux nés à des stades ultérieurs (Procianoy and de Oliveira-Filho, 1996). Ces contradictions entre l'élévation dans un cas et la baisse rapportée dans la seconde étude sont probablement liées à des différences de sensibilité/spécificité des techniques de dosage employées. La mise en œuvre récente de la spectrométrie de masse en tandem pour le dosage des stéroïdes plasmatiques comparant les taux d'aldostérone au cordon chez des nouveau-nés âgés de moins de 33 SA, de 33 à 36 SA, et des nouveau-nés à terme a montré une élévation progressive des taux d'aldostérone au cours du développement (Travers *et al.*, 2018). La constatation dans notre étude d'une augmentation croissante de l'expression de CYP11B2 après 28 SA est en accord avec ces résultats.

La sécrétion foetale d'aldostérone est quantitativement importante en fin de gestation, puisque même si l'aldostérone passe la barrière placentaire (Bayard *et al.*, 1970), la concentration d'aldostérone chez les nouveau-nés à terme est supérieure à celle de leurs mères (Martinerie *et al.*, 2009b).

3 Mise en place des fonctions minéralo- et glucocorticoïde

3.1 Acteurs impliqués dans la voie de synthèse des minéralocorticoïdes

S'il est admis que l'acquisition des fonctions surrénaliennes au cours du développement soit régulée par de nombreux facteurs, ceux impliqués dans la mise en place de la production d'aldostérone ne sont pas bien identifiés.

3.1.1 Shh

Chez la souris, la différenciation stéroïdogène s'accompagne d'une extinction de la voie de signalisation Shh. En effet, dans le modèle murin, les cellules souches (Patched1⁺ et Gli1⁺) intra-capsulaires n'expriment pas le facteur de transcription SF1 spécifique de la différenciation stéroïdogène, alors que les cellules précurseurs Shh⁺ présentes dans la zone sous-capsulaire produisent SF1 (Finco et al., 2015). Nos résultats montrent que, contrairement à ce qui est décrit chez la souris, il existe chez l'homme des cellules sous-capsulaires à la fois immunoréactives pour Gli1 et SF1 avant l'apparition de la 3 β HSD, ce qui témoigne de l'activité de la voie Shh dans des cellules partiellement différenciées avant 24 SA. L'observation à des stades ultérieurs de la production de Shh dans des cellules différenciées exprimant la 3 β HSD et la 21-OH démontre que cette voie de signalisation n'est pas restreinte aux cellules progénitrices mais reste active tout au long du processus d'acquisition du phénotype stéroïdogène. De plus, l'engagement des cellules dans la différenciation stéroïdogène semble plutôt associée à l'activation de la voie Shh, puisqu'une corrélation positive a été mise en évidence entre les niveaux de transcrite des gènes *SHH* et *HSD3B2* au cours du développement. Des expériences menées *in vitro* sur des fragments de surrénales de fœtus âgés de 20 à 24 SA permettraient d'évaluer l'effet d'activateur de la voie Shh sur l'expression de *HSD3B2*. Enfin, des expériences menées dans notre équipe montrent que la voie Shh est également active dans le cortex surrénalien adulte, ce qui suggère que la voie pourrait contribuer au maintien du phénotype stéroïdogène tout au long la vie (Thomas M., communication personnelle). L'observation de la fonctionnalité de la voie Shh à des stades précoces, bien avant l'apparition de cellules produisant l'aldostérone synthase, indique que l'activation de cette voie de signalisation n'est pas suffisante pour l'acquisition de la fonction minéralocorticoïde.

3.1.2 β -caténine

Le lien entre l'activation intra-surrénalienne de la voie Wnt/ β -caténine et la production d'aldostérone a été décrit dans plusieurs travaux. Des études ont rapporté que la prévalence des mutations activatrices du gène *CTNNB1*, codant la β -caténine, est faible dans les APA (Boukroun et al., 2011; Scholl et al., 2015), mais que l'activation de la voie, détectée par la présence nucléaire de la β -caténine en immunohistochimie, est un phénomène fréquent retrouvé dans environ deux tiers des tumeurs (Boukroun et al., 2011). Des travaux menés sur

des souris transgéniques présentant une activation du gène *Ctnnb1* dans le cortex surrénalien ont montré une expression ectopique de *Cyp11b2* dans la zone fasciculée associée à un hyperaldostéronisme (Berthon et al., 2010). Ces données indiquent que cette voie de signalisation favorise la synthèse d'aldostérone. Cependant, l'activation de la voie β -caténine a également été rapportée dans des tumeurs non sécrétrices d'aldostérone, attestant que l'activation isolée de cette voie n'est pas suffisante pour activer la production d'aldostérone (Bonnet et al., 2011). Néanmoins, nous avons envisagé le rôle de la voie β -caténine dans la mise en place de la fonction minéralocorticoïde dans la ZD au cours du développement chez l'homme. Notre étude révèle que la voie est active dès 18 SA, un stade antérieur à l'apparition de l'aldostérone synthase qui débute vers 24 SA. L'activation de la voie semble donc nécessaire mais non suffisante pour permettre l'apparition de CYP11B2 au cours du développement.

3.1.3 DAB2

La protéine *Disabled-2 homologue* (DAB2) est impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaires comme TGF- β , Wnt, RAS/MAPK et joue un rôle dans des fonctions diverses comme la croissance et la différenciation cellulaire ou le transport intra-cellulaire (Finkielstein and Capelluto, 2016). Au niveau surrénalien, DAB2 est exprimée spécifiquement dans la zone glomérulée chez les rongeurs (Romero et al., 2007), et également chez l'homme (Boulkroun et al., 2010). Son implication dans la synthèse d'aldostérone a été évoquée puisque, dans des cultures de cellules surrénaliennes humaines H295R, la réponse de l'aldostérone à l'Ang II était majorée après transfection d'un plasmide porteur de DAB2. De plus, chez le rat, il a été montré que DAB2 était régulée par les sécrétagogues connus de l'aldostérone comme l'Ang II ou le régime hyposodé (Romero et al., 2007). L'action de DAB2 dans la zone glomérulée n'est pas complètement connue, mais pourrait être en partie liée au transport de cholestérol, notamment en facilitant l'endocytose du LDL récepteur (Tao et al., 2016). DAB2 a été proposée comme marqueur de la zone glomérulée, puisque chez l'homme, les cellules exprimant CYP11B1 sont immunonégatives pour DAB2 (Boulkroun et al., 2010). Dans une série de tumeurs surrénaliennes, DAB2 a été retrouvée fortement exprimée dans une majorité d'APA, mais une expression faible à modérée a également été mise en évidence dans les tumeurs produisant du cortisol ou des adénomes non sécrétants (Li et al., 2017). Cependant, son rôle dans la synthèse d'aldostérone est suggéré puisqu'une corrélation positive a été

retrouvée entre les ARNm des gènes codant DAB2 et CYP11B2 dans les APA. L'étude de DAB2 n'avait jamais été effectuée jusqu'à présent dans la surrénale fœtale humaine. De façon intéressante, ce marqueur de zone glomérulée a été retrouvé dès 18 SA dans la ZD, à un stade bien antérieur à l'apparition de l'expression de CYP11B2 (**Figure 16**). De plus, DAB2 est présente dans la ZD à tous les stades étudiés. Ce résultat fait émettre l'hypothèse que la « signature » des cellules synthétisant l'aldostérone est présente antérieurement à l'enzyme CYP11B2, qui apparaît vers 24-25 SA.

3.1.4 Récepteurs nucléaires orphelins NURR1 et NGFI-B

D'autres marqueurs de la zone glomérulée ont été identifiés chez l'adulte. Il a été ainsi mis en évidence il y a quelques années que les récepteurs nucléaires orphelins de la famille NGFI-B (*Nerve growth factor-induced clone B*) étaient impliqués dans la synthèse d'aldostérone. En particulier, NURR1 (*Nur-related factor 1*) et NGFI-B sont fortement exprimés dans la zone glomérulée chez l'adulte et faiblement dans la zone fasciculée (Bassett, 2004). L'implication de ces deux facteurs de transcription dans la zonation surrénalienne a été avancée puisque NURR1 augmente l'expression de *CYP11B2* mais n'a aucune action sur le gène codant *CYP11B1*, tandis que NGFI-B augmente l'expression de *HSD3B2* mais n'a pas d'action sur *CYP17* (Bassett, 2004). Ainsi, chez l'adulte, l'expression de ces facteurs dans la zone glomérulée oriente les cellules stéroïdogènes vers la voie de synthèse des minéralocorticoïdes (Bassett, 2004; Nogueira and Rainey, 2010). L'expression de ces deux récepteurs dans la surrénale fœtale a également été étudiée. Liu *et al.* ont ainsi rapporté une forte expression dans la ZD à des stades très précoces de 11 et 14 SA (Lu et al., 2004). A l'image de DAB2, ces deux marqueurs de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes sont présents bien antérieurement à l'apparition de CYP11B2 au cours du développement.

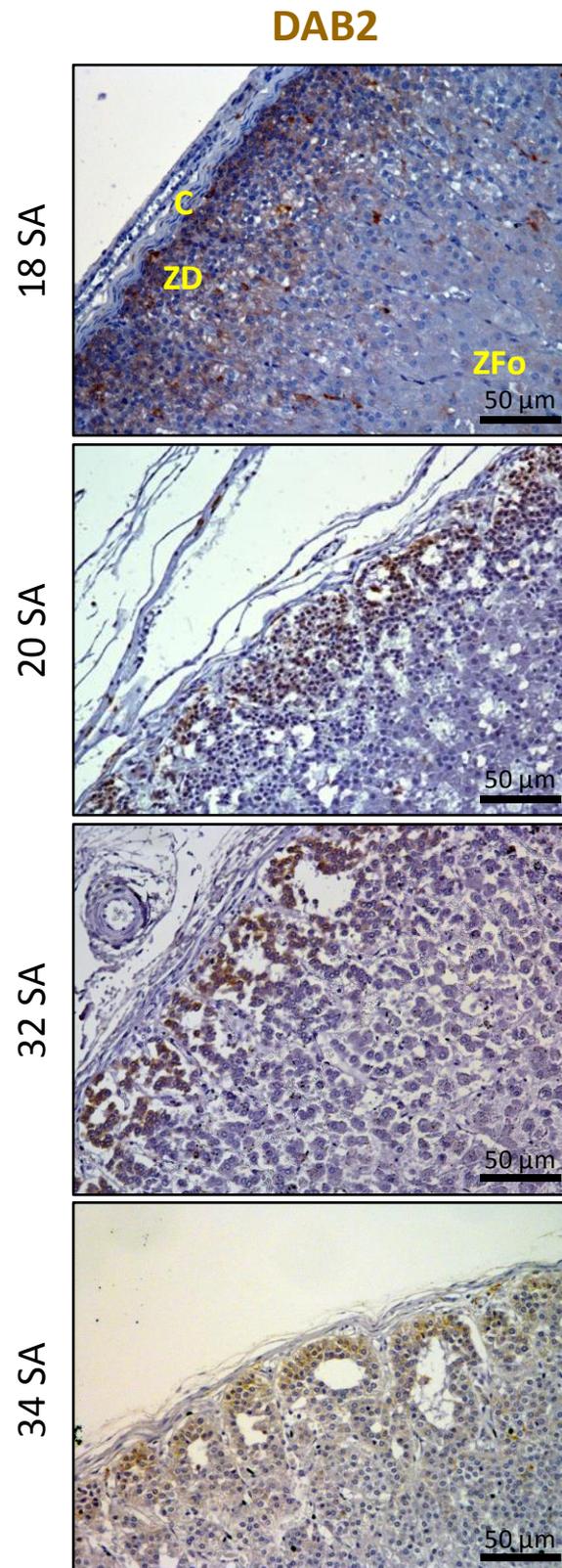


Figure 16 : Distribution de DAB2 dans la surrénale fœtale humaine.

Immunomarquages DAB2 à 18, 20, 32 et 34 SA.

C : capsule, ZD : Zone définitive, ZFo : Zone fœtale, SA : Semaines d'aménorrhée

3.1.5 Mastocytes

L'hypothèse du rôle des mastocytes intra-surréaliens dans la mise en place de la fonction minéralocorticoïde a été proposée sur la base des effets connus chez l'adulte et des résultats obtenus dans des modèles cellulaires et murins. En effet, des expériences menées *in vitro* sur des explants de surrénales humaines adultes ont révélé que la dégranulation des mastocytes par un agent pharmacologique stimule la production d'aldostérone (Lefebvre et al., 2001). Par ailleurs, le traitement de cellules corticosurréaliennes humaines H295R par des produits de sécrétion mastocytaire induit une augmentation d'expression du gène *CYP11B2*, ainsi que des gènes codant les récepteurs au LDL et HDL (SRB1) cholestérol entraînant une augmentation de la synthèse d'aldostérone (Duparc et al., 2015). De plus, dans des modèles murins, il a été montré une corrélation positive entre les niveaux d'expression de *Cyp11b2* et *Tpsb2*, gène codant la tryptase, dont le niveau d'expression est lié à l'activation mastocytaire (Boyer et al., 2017) confortant le rôle des mastocytes dans la synthèse d'aldostérone. Dans notre étude, nous avons décrit une corrélation temporo-spatiale entre l'apparition des mastocytes intra-surréaliens et l'expression des enzymes essentielles à la synthèse d'aldostérone. Ainsi, les mastocytes infiltrent la ZD vers 18-20 SA, stade similaire à l'apparition de la 3 β HSD dans cette zone. Par ailleurs, la densité mastocytaire augmente à partir de 22-24 SA, puis reste stable au cours du développement. Il est intéressant de noter que c'est à 24 SA que les cellules stéroïdogènes de la ZD commencent à exprimer les récepteurs pour le LDL et HDL cholestérol. De même, les premières cellules immunoréactives pour CYP11B2 sont détectées vers 24 SA dans la même localisation (**Figure 15**). Ainsi, ces observations posent l'hypothèse d'un rôle des mastocytes dans la mise en place de la fonction minéralocorticoïde, comme décrit dans la surrénale adulte où les mastocytes intra-surréaliens contrôlent la production d'aldostérone.

3.1.6 Sérotonine

Au laboratoire, il a été démontré que, dans la surrénale adulte, les mastocytes intra-surréaliens contrôlent la production d'aldostérone par la libération de 5-HT et l'activation des récepteurs 5-HT₄ couplés positivement à la voie AMPc/PKA. Mes travaux montrent que durant le développement anténatal, les gènes *TPH1* et *HTR4*, codant respectivement l'enzyme limitante de la synthèse de 5-HT et le récepteur 5-HT₄, sont exprimés dès 20 SA. Leurs niveaux d'expression augmentent fortement pour atteindre un pic à 30 SA, période durant laquelle

l'expression de *CYP11B2* se renforce. Par ailleurs, les études immunohistochimiques révèlent que le récepteur 5-HT de type 4 est localisé dans la ZD à partir de 28 SA, suggérant que la transmission sérotoninergique serait active dans la ZD uniquement à partir de ce stade. Ces résultats sont en faveur d'un rôle de la 5-HT produite par les mastocytes et relayée par les récepteurs 5-HT₄ dans le contrôle de la mise en place de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes au cours du développement surrénalien foetal (**Figure 15**).

3.2 Absence de la voie de synthèse des glucocorticoïdes

Les enzymes 17-OH et *CYP11B1* ne sont jamais exprimées dans la ZD au cours du développement, conférant une spécificité fonctionnelle de la ZD pour la synthèse des minéralocorticoïdes. La 17-OH et *CYP11B1* sont exprimées dans la ZT de façon comparable à la zone fasciculée au cours de la vie post-natale. Chez l'adulte, il a été montré que l'activation β -caténine dans la ZG réprimait l'expression des marqueurs de zone fasciculée (Walczak et al., 2014). La forte expression de la voie β -caténine dans la ZD à partir de stades précoces du développement pourrait jouer un rôle dans la répression des acteurs impliqués dans la synthèse de cortisol.

4 Régulation de la synthèse et la sécrétion de l'aldostérone

Chez l'adulte, la régulation de la production d'aldostérone est sous le contrôle de plusieurs facteurs : d'une part les facteurs circulants comme l'angiotensine II, le potassium et, dans une moindre mesure, l'ACTH d'origine hypophysaire et, des facteurs paracrines, comme la 5-HT libérée par les mastocytes intra-surrénaux (Lefebvre et al., 2019). En revanche, les systèmes de régulation contrôlant la sécrétion d'aldostérone chez le fœtus ne sont pas bien identifiés.

4.1 Régulation au cours du développement

Des études ont montré que les niveaux plasmatiques d'aldostérone mesurés au dernier mois de grossesse chez des fœtus de singe n'étaient pas stimulés par l'**angiotensine II** (Nelson et

al., 1990). De façon similaire, l'apport exogène d'angiotensine II ne stimule pas la sécrétion d'aldostérone *in vivo* chez des fœtus bovins en milieu de gestation (Wintour et al., 1998). Ces données indiquent que l'angiotensine II ne contrôlerait pas la synthèse d'aldostérone à ces stades de développement. Chez l'homme, il a été montré que les récepteurs à l'angiotensine II sont présents précocement au cours du développement (Breault et al., 1996). Les récepteur AT2 sont détectés dès 14 SA dans l'ensemble de la surrenale, et les récepteurs AT1 à partir de 16 SA dans la ZD (Chamoux et al., 2005). Toutefois, l'activation du récepteur AT2 ne serait pas impliquée dans le contrôle de la synthèse de minéralocorticoïdes, mais jouerait un rôle dans le développement surrenalien en régulant l'apoptose des cellules et l'angiogenèse au cours du 2^{ème} trimestre de grossesse (Chamoux et al., 1999; Ishimoto et al., 2008). En revanche, il semble que le SRA contrôle la production d'aldostérone au 3^{ème} trimestre de grossesse. En effet, les travaux de Martinerie *et al.* montrent que l'augmentation progressive d'aldostérone plasmatique s'accompagne à ces stades d'une baisse de la rénine, ce qui se traduit par une augmentation progressive du rapport aldostérone/rénine (Martinerie et al., 2015). Ce processus est associé dans le même temps à une modification de la sensibilité des récepteurs aux minéralocorticoïdes au niveau rénal.

En ce qui concerne la régulation par le **potassium**, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les niveaux d'aldostérone plasmatique et de kaliémie chez les fœtus âgés de moins de 30 SA, suggérant que le potassium n'est pas un sécrétagogue de l'aldostérone à ce stade de développement (Bourchier, 2004).

Des travaux réalisés chez le fœtus humain ont révélé que les niveaux d'**ACTH plasmatique** sont très faibles avant 29 SA et augmentent au cours de la grossesse (Bagnoli et al., 2013). A ce jour, il n'existe pas de données sur le rôle de l'ACTH dans la régulation de la production d'aldostérone en période anténatale. Cependant, la coïncidence entre l'élévation des taux circulants d'ACTH et la hausse de l'expression de CYP11B2 observée dans notre étude nous incite à penser que l'ACTH pourrait jouer un rôle dans le renforcement de la fonction minéralocorticoïde durant le 3^{ème} trimestre de grossesse. De plus, le récepteur de l'ACTH (MC2R) a été détecté par RT-QPCR et hybridation *in situ* dans la ZD au cours du 2^{ème} trimestre de grossesse dans la surrenale fœtale humaine (Mesiano et al., 1996; Ishimoto, 2006). Nous envisageons de réaliser une étude immunohistochimique pour examiner plus précisément la distribution du MC2R au cours du développement. Globalement, la concomitance d'une ACTH

circulante et de l'expression de son récepteur dans la ZD étaye le rôle de cette hormone dans la régulation de la sécrétion d'aldostérone en période fœtale.

Dans la littérature, une étude ancienne avait décrit la présence de cellules exprimant l'ACTH dans la surrénale fœtale humaine (Ito et al., 1981). Nous avons donc voulu analyser précisément cette production intra-surrénalienne d'ACTH par RT-QPCR et immunohistochimie. Ainsi, l'expression du gène codant la POMC, précurseur de l'ACTH, a été examinée au cours du développement fœtal. L'ARNm du gène *POMC* a été détecté de 18 à 41 SA dans la surrénale fœtale. En particulier, nous avons observé un pic d'expression entre 20 et 22 SA à des niveaux 2 à 3 fois supérieurs à celui de la surrénale adulte (**Figure 17**).

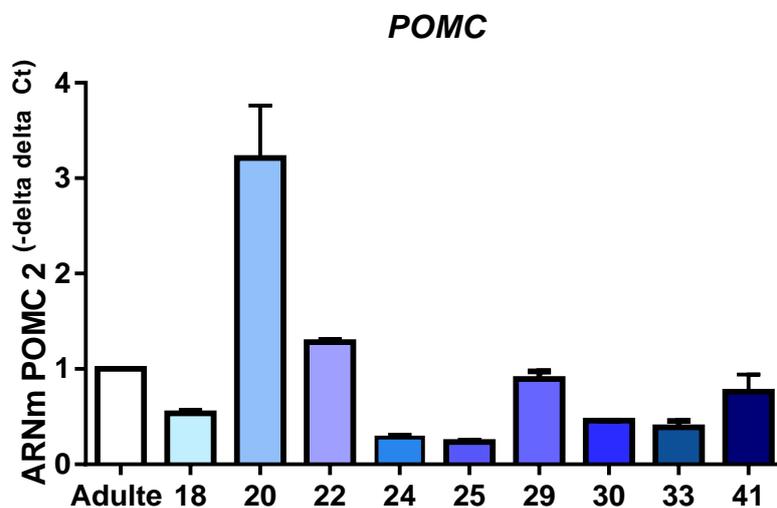


Figure 17 : Expression du gène *POMC* dans la surrénale fœtale humaine.

Niveaux d'expression des ARNm du gène *POMC* (pro-opiomélanocortine) dans la surrénale fœtale entre 18 et 41 SA, normalisés par leur taux d'expression dans des surrénales adultes et aux gènes de ménage *PBGD* et *TBP*.

Dans la surrénale adulte, il est connu que l'ACTH est produite au niveau de la medulla dans une population de cellules chromaffines (Ehrhart-Bornstein et al., 2000; Louiset et al., 2013). Notre étude immunohistochimique préliminaire a montré la présence d'ACTH dans des cellules stéroïdogènes de la surrénale fœtale humaine (**Figure 18**). L'immunomarquage est retrouvé dans quelques groupes cellulaires de la zone sous-capsulaire à 18 SA, à un stade correspondant à l'initiation de l'expression de la 3β HSD. Ceci suggère que la production intra-surrénalienne d'ACTH pourrait favoriser la maturation des cellules stéroïdogènes durant le développement de la surrénale fœtale. Par la suite, la majorité des cellules de la ZD et de la

ZT sont immunoréactives pour l'ACTH, faisant émettre l'hypothèse d'un effet stimulant de l'hormone sur la stéroïdogénèse, en complément de l'ACTH hypophysaire. L'ACTH intra-surrénaliennne pourrait également avoir un rôle plus global sur le développement surrénalien, notamment sur l'angiogénèse, puisque l'ACTH est connue pour augmenter l'expression des gènes codant l'angiopoïétine 2 (Ishimoto et al., 2006). Chez l'adulte, les cellules corticosurréaliennes ne produisent pas d'ACTH en conditions physiologiques. En revanche, notre équipe a rapporté que des groupes de cellules stéroïdogènes productrices d'ACTH sont présents dans les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales (HMBS) (Louiset et al., 2013). Dans ces lésions, la sécrétion intra-surréaliennne d'ACTH est associée à l'hypercortisolisme. Sur la base de mes travaux, on peut supposer que l'existence des cellules ACTH⁺ dans les HMBS pourrait être une réminiscence d'un stade de développement foetal.

En plus des effets positifs de l'ACTH sur la stéroïdogénèse et l'angiogénèse au cours du développement surrénalien, nous envisageons que l'hormone puisse également promouvoir la mise en place de voies de signalisation intra-surréaliennne. En effet, des études réalisées dans l'équipe ont montré que l'activation de la voie AMPc/PKA par l'ACTH (Le Mestre et al., 2019) ou par une mutation inactivatrice de *PRKAR1A*, codant la sous-unité régulatrice de la PKA (Bram et al., 2016), favorise l'émergence de la voie 5-HT dans les cellules stéroïdogènes surréaliennes. De plus, il a été mis en évidence que, chez le rat, l'exposition à un stress chronique induisant une élévation d'ACTH plasmatique était associée à une augmentation de la production de 5-HT et de l'expression du récepteur 5-HT dans des cellules corticosurréaliennes (García-Iglesias et al., 2013). Il est donc envisageable que l'ACTH d'origine hypophysaire et intra-surréaliennne puisse avoir un rôle dans la mise en place de la voie sérotoninergique dans la surrénale en développement.

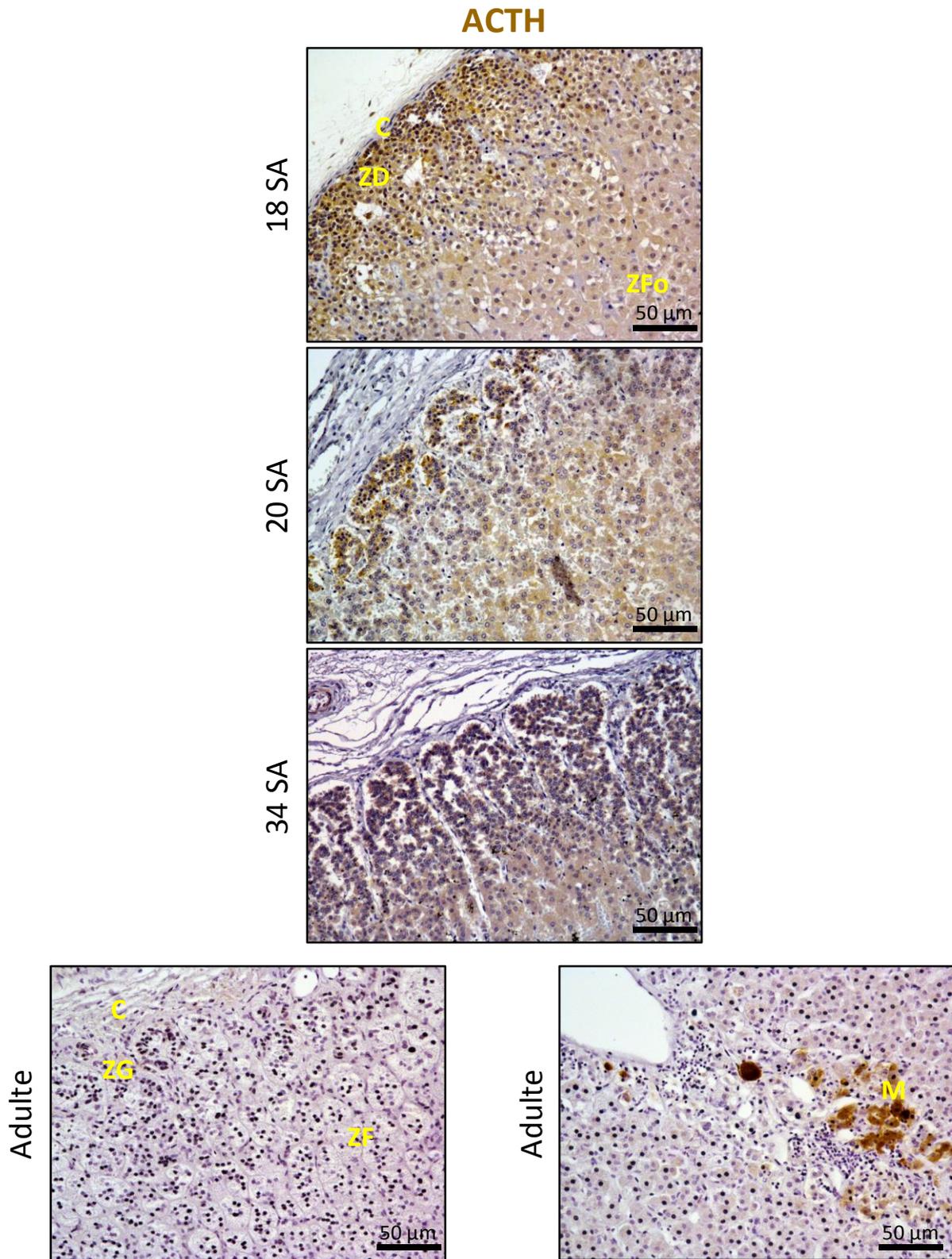


Figure 18 : Distribution de l'ACTH dans la surrénale fœtale et adulte humaine.

Immunomarquage de l'ACTH à 18, 20, 32 et 34 SA.

C : capsule, ZD : Zone définitive, ZFo : Zone fœtale, ZG : Zone glomérulée, ZF : Zone fasciculée, M : medulla, SA : Semaines d'aménorrhée

4.2 Régulation en période postnatale

Bien que les taux plasmatiques d'aldostérone à la naissance soient inférieurs chez les prématurés comparés à ceux détectés chez les nouveau-nés à terme, Travers *et al.* ont montré que les valeurs plasmatiques d'aldostérone étaient équivalentes au 3^{ème} jour de vie chez les nouveau-nés prématurés (âgés de moins de 33 SA, de 33 à 36 SA) et ceux nés à terme (Travers *et al.*, 2018). Ce résultat est en faveur d'une activation rapide des systèmes de régulation de production d'aldostérone après la naissance. D'autre part, les concentrations d'aldostérone sont élevées chez les nouveau-nés, puis décroissent rapidement au cours de la première année de vie (Kowarski *et al.*, 1974; Sippell *et al.*, 1981), suggérant la mise en place de mécanismes de régulation dans la période post-natale.

Il a été rapporté que, chez les prématurés nés avant 30 SA, les niveaux plasmatiques d'aldostérone étaient inversement corrélés à la natrémie à J7 mais pas à J1 de vie, ce qui suggère que l'aldostérone n'est pas active au premier jour de vie (Bourchier, 2004). De même, une corrélation négative a été retrouvée entre l'excrétion urinaire d'aldostérone dans les premières 72h de vie et la natrémie d'enfants de très faible poids de naissance (< 1500 g), démontrant l'établissement d'une adaptation de la sécrétion d'aldostérone aux variations de natrémie en période post-natale (Costa *et al.*, 2012).

Le rôle du stress de naissance dans l'adaptation de la fonction minéralocorticoïde est encore débattu. L'aldostérone semble en partie être régulée par l'ACTH, puisqu'il a été rapporté une diminution des niveaux d'aldostérone dans les 3 premiers jours de vie chez les nouveau-nés prématurés ayant reçu une corticothérapie anténatale à forte dose pour maturation pulmonaire, ce qui entraîne une inhibition de la production d'ACTH hypophysaire (Kessel *et al.*, 2009). De façon intéressante, quelques cas d'hyponatrémie ont été décrits chez des enfants présentant une mutation inactivatrice du *MC2R*, gène codant le récepteur de l'ACTH, suggérant un contrôle de l'ACTH sur la production d'aldostérone en situation aiguë de stress pendant l'enfance (Lin *et al.*, 2007; Guran *et al.*, 2016). Les patients plus âgés porteurs de la mutation ne nécessitent pas de supplémentation en minéralocorticoïdes de synthèse, mais présentent des valeurs de rénine élevées, suggérant une hyperstimulation adaptatrice du SRA (Chan *et al.*, 2009). Par ailleurs, il a été montré que la mutation inactivatrice de *Mc2r* dans un modèle murin entraîne une diminution de l'expression de *Cyp11b2* associée à de faibles

valeurs d'aldostérone plasmatique (Chida et al., 2007). Chez l'homme, le rôle de l'ACTH dans la régulation de la voie minéralocorticoïde reste discuté en période périnatale. Il a en effet été suggéré que l'ACTH pourrait promouvoir la production de minéralocorticoïdes en cas de stress aigu, de régime hyposodé ou lorsqu'il existe une insensibilité partielle aux minéralocorticoïdes (Lin et al., 2007). Cependant, à l'encontre de cette hypothèse, Bourchier *et al.* ont rapporté une relation négative entre les niveaux d'aldostérone et la gravité de l'état clinique générateur de stress chez des nouveau-nés prématurés de moins de 30 SA (Bourchier, 2004) ; une production d'aldostérone plus faible ayant été mesurée à J1 et J7 de vie lors d'un état critique. Toutefois, il est possible qu'il existe dans ces études des facteurs confondants non pris en compte, comme les traitements ou perfusions initiés, qui pourraient être responsables d'une diminution de la sécrétion d'aldostérone. Par ailleurs, ces états de stress pourraient ne pas mettre en cause uniquement l'ACTH mais également impliquer un état d'hypoxie. Il a en effet été montré que des valeurs d'aldostérone au cordon étaient supérieures chez des nouveau-nés ayant présenté une asphyxie périnatale par rapport à des nouveau-nés sains, faisant évoquer le rôle de l'hypoxie dans le contrôle de la production d'aldostérone (Narbona López et al., 1990). Dans notre étude (article 2), nous avons décrit une expression de CYP11B2 plus élevée chez les nouveau-nés comparés à des fœtus de même terme. De façon similaire, nous avons constaté que la densité mastocytaire intra-surrénalienne est plus importante chez les nouveau-nés par rapport aux fœtus de même stade. Cette observation pose l'hypothèse d'un rôle des mastocytes dans la régulation de la fonction minéralocorticoïde en période post-natale, qui pourrait être sous l'influence de l'hypoxie.

L'augmentation de densité mastocytaire mise en évidence dans des surrénales issues de nouveau-nés comparées à celles de fœtus pourrait être liée à l'action du SCF. Le SCF est le facteur de croissance mastocytaire principal, qui agit comme agent chémo-attracteur permettant l'infiltration des mastocytes dans les tissus cibles. Dans nos travaux, l'expression du SCF n'a pas encore été étudiée chez les nouveau-nés, mais elle pourrait être majorée par rapport aux fœtus puisque des travaux ont montré que le SCF est régulé par l'hypoxie. En effet, une augmentation de densité mastocytaire a été observée chez le rat en période néonatale dans l'hémisphère cérébral exposé à une hypoxie (Jin et al., 2007). Ce résultat peut être expliqué par la présence dans le promoteur du gène *SCF* d'éléments de réponse au facteur HIF-1 α , élément régulateur central de l'hypoxie (Gao et al., 2015). De plus, l'hypoxie

peut entraîner une augmentation d'expression du récepteur du SCF, KIT, notamment dans des cellules endothéliales (Kim et al., 2019). Enfin, l'activité sécrétoire des mastocytes qui a été retrouvée majorée dans un contexte d'hypoxie (Sumbayev et al., 2012; Liang et al., 2016). Ainsi, tout le système SCF/c-KIT est activé en contexte d'hypoxie, suggérant que les mastocytes sont des vecteurs importants de la réponse à l'hypoxie. Il a été rapporté que dans un modèle de revascularisation oculaire après hypoxie, la signalisation SCF/KIT induit la phosphorylation de GSK3 et l'activation de la voie β -caténine (Kim et al., 2019). Il serait donc intéressant d'étudier l'activation de la voie β -caténine dans la ZD après la naissance avec ou sans hypoxie en période périnatale. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hypoxie pourrait entraîner une prolifération mastocytaire entraînant une activation de la voie β -caténine puis une majoration de l'expression de CYP11B2.

Une des perspectives pour tester cette hypothèse serait d'exposer des souris à une atmosphère diminuée en oxygène en période post-natale immédiate et d'évaluer les répercussions sur l'expression de *Cyp11b2*, l'activation de la β -caténine, et sur la densité et activité mastocytaire surrénalienne. Dans le laboratoire, le Dr Delphine Burel a utilisé des chambres d'hypoxie adaptées à un modèle murin pour l'étude de l'effet de l'hypoxie sur le développement du cervelet.

La mise en évidence dans les surrénales issues de fœtus et de nouveau-nés d'une expression de TPH1 et de 5-HT non confinée aux mastocytes, comme cela est le cas dans la surrénale adulte, pose la question du rôle respectif des mastocytes intra-surrénaux et de l'action de la sérotonine produite par les cellules stéroïdogènes. Cependant, l'utilisation d'échantillons de surrénales fœtales humaines prélevées en post-mortem ne permet pas d'envisager des études fonctionnelles pour appréhender les mécanismes de communication paracrine. Afin de caractériser le rôle propre des mastocytes, nous avons poursuivi ce travail en initiant une étude sur un modèle murin dépourvu de mastocytes déjà étudié dans le laboratoire (Boyer et al., 2017).

5 Etude du rôle des mastocytes dans le développement surrénalien dans un modèle murin

Nous avons donc fait le choix d'étudier l'impact de l'absence de mastocytes sur le développement surrénalien fœtal et néonatal en utilisant un modèle murin $Kit^{W-sh/W-sh}$ dépourvu de mastocytes (Grimbaldeston et al., 2005). L'expression des gènes impliqués dans la synthèse et la régulation d'aldostérone a été comparée à différents stades de développement périnatal (E18, E20, P0, P1, P3, P7 et P14) entre le modèle $Kit^{W-sh/W-sh}$ et la souche sauvage C57BL/6. Le développement de la surrénale murine présente quelques différences par rapport à celui de l'homme. L'organisation du cortex surrénalien fœtal en ZD et ZFo est effective vers E15.5 (Xing et al., 2015). Il n'y a pas de données précises chez la souris sur la chronologie d'apparition des enzymes Cyp11b1 et Cyp11b2, cependant il a été décrit chez le rat que les cellules exprimant Cyp11b2 sont dispersées dans le cortex à E16, puis localisées dans la ZD à E19 (Wotus et al., 1998). A la naissance, une zone transitoire est individualisée dans la partie la plus interne du cortex murin, nommée la zone X, dont le rôle n'est pas élucidé. Le développement surrénalien se poursuit après les 21 jours de gestation avec en particulier, la régression de la zone X à la puberté chez les mâles et après la première grossesse chez les femelles (**Figure 19**).

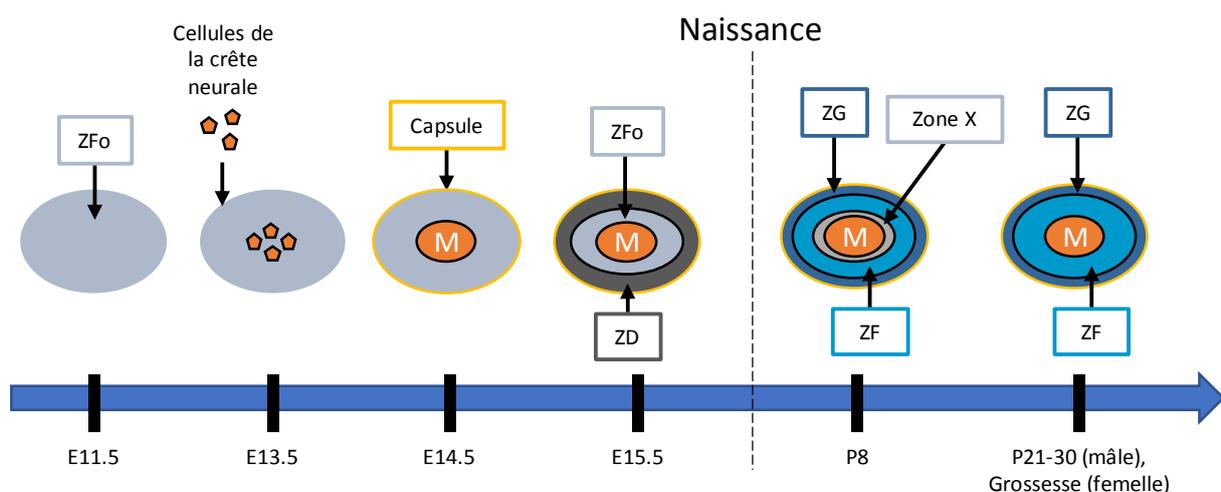


Figure 19 : Développement de la surrénale fœtale murine.

M : medulla, ZFo : zone fœtale, ZD : zone définitive, ZG : zone glomérulée, ZF : zone fasciculée
Adapté de Xing *et al.*, Endocrinol Metab Clin North Am. 2015

Une étude préliminaire de q-PCR indique une expression plus faible de *Cyp11b2* dans les surrénales des souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ aux stades E18, E20, P0, P1, P3, P14 comparée aux souris sauvages (**Figure 20**). De manière surprenante, à P7, on constate une expression surrénalienne de *Cyp11b2* plus élevée chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$. En revanche, il n'a pas été noté de différence d'expression pour les gènes *Cyp11b1* et *Hsd3b1*, codant respectivement la 11 α -hydroxylase et la 3 β HSD de type 1.

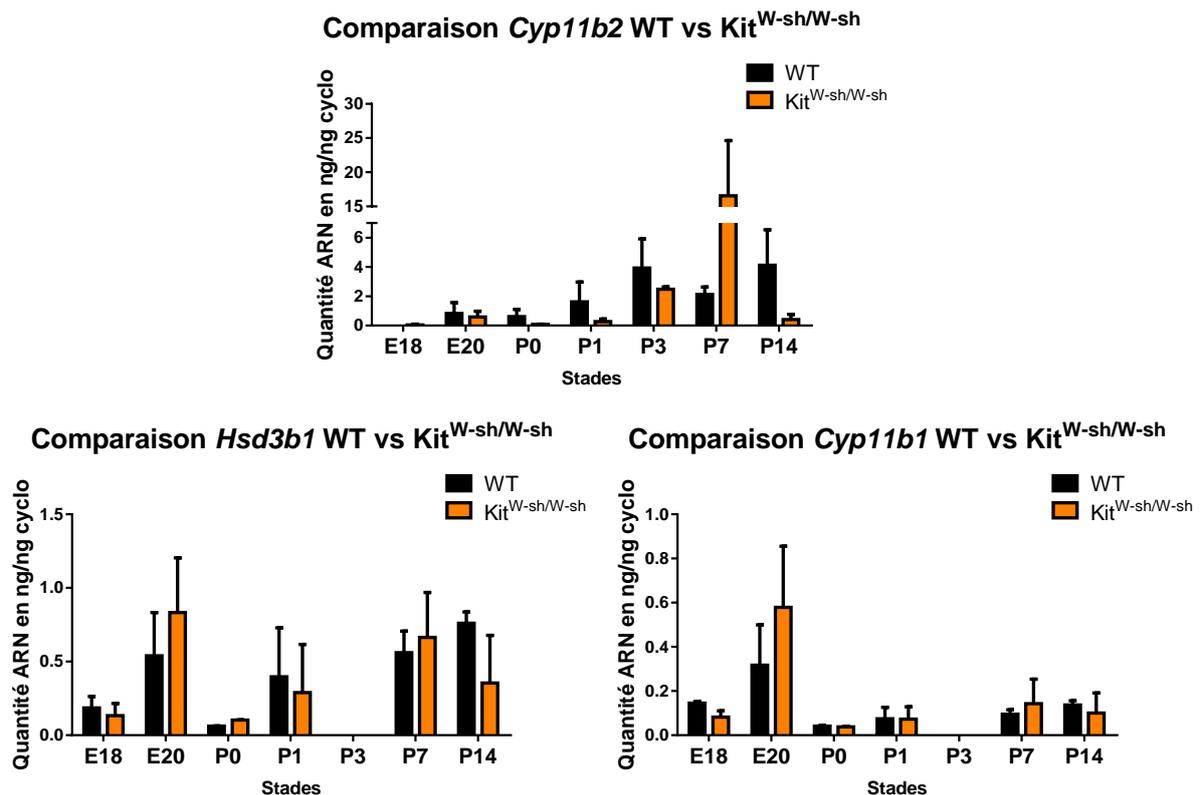


Figure 20 : Comparaison des niveaux d'expression des gènes *Cyp11b2*, *Cyp11b1* et *Hsd3b1* dans la surrénale de souris déficientes en mastocyte ($\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$) et le modèle sauvage entre E18 et P14.

L'expression surrénalienne de *Cyp11b2* est plus faible chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ aux stades E18, E20, P0, P14 comparée aux souris sauvages, contrairement au stade P7. En revanche, l'expression des gènes *Cyp11b1* et *Hsd3b1* n'est pas différente entre les 2 modèles quel que soit le stade de développement.

La faible expression de *Cyp11b2* observée à différents stades chez les souris déficientes en mastocytes est en faveur d'une stimulation spécifique de l'expression de *Cyp11b2* par les mastocytes. En revanche, l'élévation surprenante de l'ARNm de *Cyp11b2* à P7 pourrait être liée à l'activation d'un mécanisme de régulation visant à compenser à ce stade l'absence de mastocytes. Il est connu qu'un SRA local surrénalien est présent chez la souris au cours du

développement (Jones et al., 1990). Nous avons donc initié une étude du SRA chez ces souris. Il n'a pas été noté de différence d'expression du gène codant la rénine (*Ren1*) au niveau surrénalien entre les 2 modèles. Cependant, une augmentation modérée de l'expression de ce gène a été observée à P7 au niveau rénal. De plus, il n'a pas été observé de différence d'expression du gène codant le récepteur de type 1 de l'angiotensine *At1r*. Ces données suggèrent que l'augmentation de l'expression de *Cyp11b2* à P7 dans les surrénales de souris déficientes en mastocytes ne résulte pas d'une activation du SRA intra-surrénalien, ni d'une majoration de réceptivité à l'angiotensine, mais serait consécutive à une augmentation de la production rénale de la rénine entraînant une élévation des taux circulants d'angiotensine II (Figure 21).

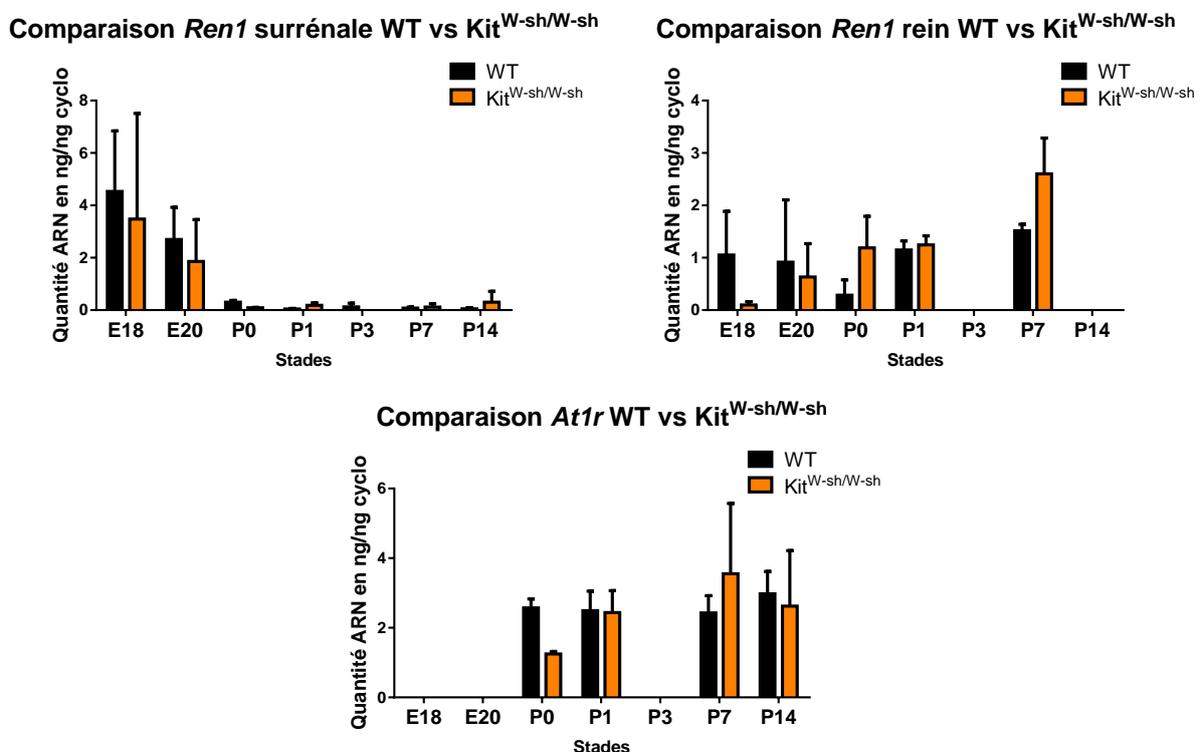


Figure 21 : Comparaison des niveaux d'expression du gène *Ren1* dans la surrénale et le rein, et du gène *At1r* entre le modèle *Kit*^{W-sh/W-sh} et le modèle sauvage entre E18 et P14.

Dans la surrénale, l'expression du gène codant la rénine est observée essentiellement en anténatal, avec une diminution drastique en post natal, sans différence entre les 2 modèles murins. Dans le rein, l'expression de ce gène semble similaire en anté et en post-natal chez la souris WT alors que cette expression est essentiellement post natale chez les souris déficientes en mastocytes. De plus, au stade P7, cette expression semble plus importante dans le modèle *Kit*^{W-sh/W-sh} comparé au modèle WT. L'expression du gène *At1R* semble équivalente entre les 2 modèles

Ces résultats préliminaires démontrent le contrôle des mastocytes sur l'expression du gène codant l'aldostérone synthase durant le développement périnatal murin. Les mécanismes sous-jacents de l'interaction mastocytes/voie minéralocorticoïde et le retentissement fonctionnel de l'absence de mastocytes en période péri-natale restent cependant à déterminer. Chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ adultes, il n'a pas été noté d'anomalie de l'aldostérone plasmatique ni des niveaux de transcrite du gène *Cyp11b2* comparé aux souris sauvages en régime normosodé (Boyer et al., 2017). En régime hyposodé, il a été observé une élévation du gène codant la tryptase dans les surrénales des souris sauvages, signant une activation des mastocytes qui pourrait contribuer à l'élévation de l'aldostérone en complément du SRA. De manière surprenante, un hyperaldostéronisme sévère a été détecté lors d'un régime hyposodé chez les souris déficientes en mastocyte, en lien avec une forte stimulation du SRA intra-surrénalien. Ainsi, chez les animaux adultes, la surexpression de la rénine et du récepteur *At1r* surrénaux pourrait être assimilée à un mécanisme compensateur visant à activer la production d'aldostérone en l'absence de mastocyte. En période périnatale, nous n'avons pas mis en évidence de processus adaptatif similaire, mais le régime hyposodé constitue un cas extrême de stimulation de la production d'aldostérone. Aussi, d'autres expériences complémentaires seraient à envisager. Afin de confirmer les variations d'expression de *Cyp11b2* constatée chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$, il serait utile d'étudier l'expression protéique de *Cyp11b2* par immunohistochimie. Enfin, des dosages plasmatiques d'aldostérone chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ et sauvages en période périnatale permettraient de détecter un éventuel hypoaldostéronisme biologique. Nous avons débuté cette analyse en collaboration avec le Dr Antonin Lamazière (laboratoire INSERM ERL 1157), pour doser par spectrométrie de masse en tandem l'aldostérone et la corticostérone plasmatiques entre les 2 modèles. Les données préliminaires montrent des valeurs réduites d'aldostérone à P0 et P1 chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$ comparés aux sauvages, alors qu'il n'y a pas de différence notée dans des stades ultérieurs à P3, P5 et P7. Ces résultats suggèrent l'existence de mécanismes compensateurs permettant de rétablir une fonction minéralocorticoïde normale après le stade de P1 chez les souris $\text{Kit}^{\text{W-sh/W-sh}}$. Aucune différence des taux de corticostérone entre les 2 modèles ne semble apparaître aux mêmes stades (**Figure 22**).

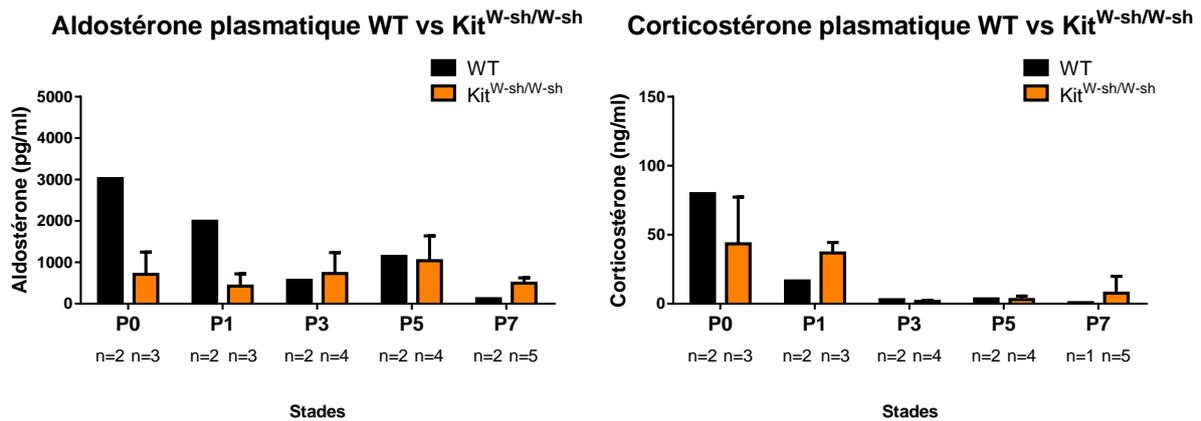


Figure 22 : Comparaison des valeurs d'aldostérone et de corticostérone plasmatiques entre le modèle Kit^{W-sh/W-sh} et le modèle sauvage entre P0 et P7.

Le nombre d'échantillon analysé à chaque stade est renseigné par « n = ».

Par ailleurs, l'étude de souris déficientes en TPH1 (Amireault et al., 2013) permettrait d'étudier le rôle de la 5-HT dans la mise en place de la fonction minéralocorticoïde. Une autre possibilité serait d'étudier des rats déficients en récepteur 5-HT de type 7 (Seitz et al., 2019), car il a été prouvé que chez le rat, la modulation de la fonction minéralocorticoïde passe par l'activation du récepteur 5-HT₇ (Contesse et al., 2000).

CONCLUSION

Le développement de la surrénale fœtale humaine est un processus complexe et les acteurs intervenant dans la mise en place de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes n'avaient pas été étudiés lorsque j'ai entrepris ce travail. L'implication de facteurs paracrines dans la fonction corticosurrénalienne a été suggérée par analogie avec les données obtenues dans les surrénales humaine et murine adultes.

L'objectif principal de ce travail était de préciser la chronologie d'expression des différents acteurs impliqués dans la synthèse des minéralocorticoïdes au cours du développement. Mes résultats indiquent qu'il existe une corrélation spatio-temporelle entre l'apparition des mastocytes et l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse d'aldostérone. De plus, les mastocytes pourraient participer à l'adaptation de la production d'aldostérone lors du passage de la vie intra-à extra-utérine.

Ces données observationnelles nécessiteront d'autres expériences, menées notamment chez l'animal, pour confirmer le rôle des mastocytes dans ces processus physiologiques. Ainsi, les mastocytes pourraient intervenir dans l'adaptation de la synthèse des minéralocorticoïdes en conditions physiologiques particulières, comme au cours de la naissance, d'une hypoxie ou d'un trouble de l'équilibre hydrosodé.

BIBLIOGRAPHIE

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M.** (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **271**, 518–520.
- Agrawal, V., Tee, M.K., Qiao, J., Muench, M.O., and Miller, W.L.** (2015). Potential role of increased oxygenation in altering perinatal adrenal steroidogenesis. *Pediatr. Res.* **77**, 298–309.
- Aiba, M., Iri, H., Suzuki, H., Kageyama, K., Kawai, T., Abe, O., Murai, M., Tazaki, H., and Saruta, T.** (1985). Numerous mast cells in an 11-deoxycorticosterone-producing adrenocortical tumor. Histologic evaluation of benignancy and comparison with mast cell distribution in adrenal glands and neoplastic counterparts of 67 surgical specimens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**, 357–360.
- Åkerström, T., Maharjan, R., Sven Willenberg, H., Cupisti, K., Ip, J., Moser, A., Stålberg, P., Robinson, B., Alexander Iwen, K., Dralle, H., et al.** (2016). Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Sci. Rep.* **6**, 19546.
- Amireault, P., Sibon, D., and Côté, F.** (2013). Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 knockout mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 64–71.
- Ancel, P.-Y., Goffinet, F., EPIPAGE-2 Writing Group, Kuhn, P., Langer, B., Matis, J., Hernandorena, X., Chabanier, P., Joly-Pedespan, L., Lecomte, B., et al.** (2015). Survival and Morbidity of Preterm Children Born at 22 Through 34 Weeks' Gestation in France in 2011: Results of the EPIPAGE-2 Cohort Study. *JAMA Pediatr.* **169**, 230–238.
- Andersson, C.K., Mori, M., Bjermer, L., Löfdahl, C.-G., and Erjefält, J.S.** (2009). Novel site-specific mast cell subpopulations in the human lung. *Thorax* **64**, 297–305.
- Angelousi, A., Kyriakopoulos, G., Nasiri-Ansari, N., Karageorgou, M., and Kassi, E.** (2018). The role of epithelial growth factors and insulin growth factors in the adrenal neoplasms. *Ann. Transl. Med.* **6**(12):253
- Asby, D.J., Arlt, W., and Hanley, N.A.** (2009). The adrenal cortex and sexual differentiation during early human development. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **10**, 43–49.
- Atiakshin, D., Buchwalow, I., Samoilova, V., and Tiemann, M.** (2018). Tryptase as a polyfunctional component of mast cells. *Histochem. Cell Biol.* **149**, 461–477.
- Azhar, S., and Reaven, E.** (2002). Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **195**, 1–26.
- Babu, P.S., Bavers, D.L., Beuschlein, F., Shah, S., Jeffs, B., Jameson, J.L., and Hammer, G.D.** (2002). Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* **143**, 665–673.
- Bagnoli, F., Mori, A., Fommei, C., Coriolani, G., Badii, S., and Tomasini, B.** (2013). ACTH and cortisol cord plasma concentrations in preterm and term infants. *J Perinatol* **33**, 520–524.
- Balcells, E., Meng, Q.C., Johnson, W.H., Oparil, S., and Dell'Italia, L.J.** (1997). Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am. J. Physiol.* **273**, H1769-1774.
- Barrett, P.Q., Bollag, W.B., Isales, C.M., McCarthy, R.T., and Rasmussen, H.** (1989). Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocr. Rev.* **10**, 496–518.
- Barrington, K.J.** (2014). Management during the first 72 h of age of the periviable infant: an evidence-based review. *Semin. Perinatol.* **38**, 17–24.
- Bassett, M.H.** (2004). The Orphan Nuclear Receptor NGFIB Regulates Transcription of 3-Hydroxysteroid Dehydrogenase: IMPLICATIONS FOR THE CONTROL OF ADRENAL FUNCTIONAL ZONATION. *J. Biol. Chem.* **279**, 37622–37630.

- Bassett, J.R., and West, S.H.** (1997). Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. *Microsc. Res. Tech.* **36**, 546–557.
- Bassett, M.H., Suzuki, T., Sasano, H., White, P.C., and Rainey, W.E.** (2004). The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **18**, 279–290.
- Bayard, F., G. Ances, I., J. Tapper, A., V. Weldon, V., Kowarski, A., and J. Migeon, C.** (1970). Transplacental Passage and Fetal Secretion of Aldosterone. *J. Clin. Invest.* **49**, 1389–1393.
- Ben-David, S., Zuckerman-Levin, N., Epelman, M., Shen-Orr, Z., Levin, M., Sujov, P., and Hochberg, Z.** (2007). Parturition itself is the basis for fetal adrenal involution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 93–97.
- Berger, M., Gray, J.A., and Roth, B.L.** (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* **60**, 355–366.
- Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Jousineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., Taketo, M.M., Tissier, F., Bertherat, J., Lefrancois-Martinez, A.M., et al.** (2010). Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1561–1576.
- Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J., and Val, P.** (2012). Wnt/ β -catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 87–95.
- Berthon, A., Drelon, C., Ragazzon, B., Boulkroun, S., Tissier, F., Amar, L., Samson-Couterie, B., Zennaro, M.-C., Plouin, P.-F., Skah, S., et al.** (2014). WNT/ β -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 889–905.
- Bhatia, J.** (2006). Fluid and electrolyte management in the very low birth weight neonate. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* **26** Suppl 1, S19-21.
- Bizzarri, C., Pedicelli, S., Cappa, M., and Cianfarani, S.** (2016). Water Balance and “Salt Wasting” in the First Year of Life: The Role of Aldosterone-Signaling Defects. *Horm. Res. Paediatr.* **86**, 143–153.
- Bochem, A.E., Holleboom, A.G., Romijn, J.A., Hoekstra, M., Dallinga-Thie, G.M., Motzacker, M.M., Hovingh, G.K., Kuivenhoven, J.A., and Stroes, E.S.G.** (2013). High density lipoprotein as a source of cholesterol for adrenal steroidogenesis: a study in individuals with low plasma HDL-C. *J. Lipid Res.* **54**, 1698–1704.
- Bocian-Sobkowska, J., Woźniak, W., and Malendowicz, L.K.** (1998). Postnatal involution of the human adrenal fetal zone: stereologic description and apoptosis. *Endocr. Res.* **24**, 969–973.
- Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libé, R., René-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.-C., et al.** (2011). Wnt/ β -catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E419-426.
- Bornstein, S.R., Gonzalez-Hernandez, J.A., Ehrhart-Bornstein, M., Adler, G., and Scherbaum, W.A.** (1994). Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **78**, 225–232.
- Bornstein, S.R., Rutkowski, H., and Vrezas, I.** (2004). Cytokines and steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **215**, 135–141.
- Böse, J., Grotewold, L., and Rüther, U.** (2002). Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1129–1135.
- Boulkroun, S., Samson-Couterie, B., Dzib, J.-F.G., Lefebvre, H., Louiset, E., Amar, L., Plouin, P.-F., Lalli, E., Jeunemaitre, X., Benecke, A., et al.** (2010). Adrenal Cortex Remodeling and Functional Zona Glomerulosa Hyperplasia in Primary Aldosteronism. *Hypertension* **56**, 885–892.

- Boulkroun, S., Samson-Couterie, B., Golib-Dzib, J.-F., Amar, L., Plouin, P.-F., Sibony, M., Lefebvre, H., Louiset, E., Jeunemaitre, X., Meatchi, T., et al.** (2011). Aldosterone-Producing Adenoma Formation in the Adrenal Cortex Involves Expression of Stem/Progenitor Cell Markers. *Endocrinology* **152**, 4753–4763.
- Bourchier, D.** (2004). Plasma aldosterone levels in the 1st week of life in infants of less than 30 weeks gestation. *Eur. J. Pediatr.* **164**, 141–145.
- Boyer, H.-G., Wils, J., Renouf, S., Arabo, A., Duparc, C., Boutelet, I., Lefebvre, H., and Louiset, E.** (2017). Dysregulation of Aldosterone Secretion in Mast Cell-Deficient Mice. *Hypertension* **70**, 1256–1263.
- Bradding, P., and Arthur, G.** (2016). Mast cells in asthma--state of the art. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* **46**, 194–263.
- Bram, Z., Louiset, E., Ragazzon, B., Renouf, S., Wils, J., Duparc, C., Boutelet, I., Rizk-Rabin, M., Libé, R., Young, J., et al.** (2016). PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight* **1**, e87958.
- Breault, L., Lehoux, J.G., and Gallo-Payet, N.** (1996). The angiotensin AT2 receptor is present in the human fetal adrenal gland throughout the second trimester of gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 3914–3922.
- Briscoe, J., and Théron, P.P.** (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 416–429.
- Brosby-Olsen, S., Carter, M., Kjaer, H.F., Mortz, C.G., Møller, M.B., Kristensen, T.K., Bindselev-Jensen, C., and Agertoft, L.** (2018). Pediatric Expression of Mast Cell Activation Disorders. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* **38**, 365–377.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L.R., Dunkley, P.R., and Rostas, J.A.** (2001). Angiotensin II promotes the phosphorylation of cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) at Ser133 through an ERK1/2-dependent mechanism. *J. Neurochem.* **79**, 1122–1128.
- Carlini, M.J., Dalurzo, M.C.L., Lastiri, J.M., Smith, D.E., Vasallo, B.C., Puricelli, L.I., and Lauría de Cidre, L.S.** (2010). Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. *Hum. Pathol.* **41**, 697–705.
- Carr, B.R., Parker, C.R., MacDonald, P.C., and Simpson, E.R.** (1980). Metabolism of high density lipoprotein by human fetal adrenal tissue. *Endocrinology* **107**, 1849–1854.
- Carr, B.R., Ohashi, M., and Simpson, E.R.** (1982). Low density lipoprotein binding and de novo synthesis of cholesterol in the neocortex and fetal zones of the human fetal adrenal gland. *Endocrinology* **110**, 1994–1998.
- Cartier, D., Jégou, S., Parmentier, F., Lihmann, I., Louiset, E., Kuhn, J.-M., Bastard, C., Plouin, P.-F., Godin, M., Vaudry, H., et al.** (2005). Expression profile of serotonin₄ (5-HT₄) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *Eur. J. Endocrinol.* **153**, 939–947.
- Carvalho, R.F., Ribeiro, R.A., Falcão, R.A., Lima, R.C., Leitão, R.F.C., Alcantara, C., Souza, M.H.L.P., Cunha, F.Q., and Brito, G.A.C.** (2006). Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation. *Eur. J. Pharmacol.* **540**, 175–182.
- Caughey, G.H.** (2016). Mast cell proteases as pharmacological targets. *Eur. J. Pharmacol.* **778**, 44–55.
- Chae, W.-J., and Bothwell, A.L.M.** (2018). Canonical and Non-Canonical Wnt Signaling in Immune Cells. *Trends Immunol.* **39**, 830–847.
- Chamoux, E., Breault, L., Lehoux, J.G., and Gallo-Payet, N.** (1999). Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 4722–4730.

- Chamoux, E., Otis, M., and Gallo-Payet, N.** (2005). A connection between extracellular matrix and hormonal signals during the development of the human fetal adrenal gland. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **38**, 1495–1503.
- Chan, L.F., Metherell, L.A., Krude, H., Ball, C., O’Riordan, S.M.P., Costigan, C., Lynch, S.A., Savage, M.O., Cavarzere, P., and Clark, A.J.L.** (2009). Homozygous nonsense and frameshift mutations of the ACTH receptor in children with familial glucocorticoid deficiency (FGD) are not associated with long-term mineralocorticoid deficiency. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **71**, 171–175.
- Chen, X.-Y., Jia, X.-M., Jia, Y.-S., Chen, X.-R., Wang, H.-Z., and Qi, W.-Q.** (2004). Development and distribution of mast cells and neuropeptides in human fetus duodenum. *WORLD J. Gastroenterol.* **10**, 3349–3352.
- Chida, D., Nakagawa, S., Nagai, S., Sagara, H., Katsumata, H., Imaki, T., Suzuki, H., Mitani, F., Ogishima, T., Shimizu, C., et al.** (2007). Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18205–18210.
- Ching, S., and Vilain, E.** (2009). Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis* **47**, 628–637.
- Clevers, H., and Nusse, R.** (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205.
- Condon, J.C., Pezzi, V., Drummond, B.M., Yin, S., and Rainey, W.E.** (2002). Calmodulin-dependent kinase I regulates adrenal cell expression of aldosterone synthase. *Endocrinology* **143**, 3651–3657.
- Contesse, V., Lefebvre, H., Lenglet, S., Kuhn, J.M., Delarue, C., and Vaudry, H.** (2000). Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: effects of 5-HT on adrenocortical cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **78**, 967–983.
- Corvol, P., Schütz, S., and Gasc, J.M.** (1998). Early expression of all components of the renin-angiotensin system in human development. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* **28**, 195–212.
- Costa, S., Cota, F., Romagnoli, C., Latella, C., Maggio, L., Tesfagabir, M.G., and Gallini, F.** (2012). Early urinary aldosterone excretion in very low birth weight infants. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* **13**, 254–258.
- Coulter, C.L., and Jaffe, R.B.** (1998). Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* **139**, 5144–5150.
- Crane, J.D., Palanivel, R., Mottillo, E.P., Bujak, A.L., Wang, H., Ford, R.J., Collins, A., Blümer, R.M., Fullerton, M.D., Yabut, J.M., et al.** (2015). Inhibiting peripheral serotonin synthesis reduces obesity and metabolic dysfunction by promoting brown adipose tissue thermogenesis. *Nat. Med.* **21**, 166–172.
- Curnow, K.M., Tusie-Luna, M.T., Pascoe, L., Natarajan, R., Gu, J.L., Nadler, J.L., and White, P.C.** (1991). The product of the CYP11B2 gene is required for aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **5**, 1513–1522.
- DeFalco, T., Bhattacharya, I., Williams, A.V., Sams, D.M., and Capel, B.** (2014). Yolk-sac-derived macrophages regulate fetal testis vascularization and morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2384-2393.
- Démurger, F., Ichkou, A., Mougou-Zerelli, S., Merrer, M.L., Goudefroye, G., Delezoide, A.-L., Quélin, C., Manouvrier, S., Baujat, G., Fradin, M., et al.** (2015). New insights into genotype–phenotype correlation for GLI3 mutations. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 92.
- Dinh Cat, A.N., Friederich-Persson, M., White, A., and Touyz, R.M.** (2016). Adipocytes, aldosterone and obesity-related hypertension. *J. Mol. Endocrinol.* **57**, F7–F21.

- Doerr, H.G., Sippell, W.G., Versmold, H.T., Bidlingmaier, F., and Knorr, D.** (1988). Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life. *Pediatr. Res.* **23**, 525–529.
- Doghman, M., Cazareth, J., and Lalli, E.** (2008). The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 3222–3225.
- Dörner, J., Martinez Rodriguez, V., Ziegler, R., Röhrig, T., Cochran, R.S., Götz, R.M., Levin, M.D., Pihlajoki, M., Heikinheimo, M., and Wilson, D.B.** (2017). GLI1+ progenitor cells in the adrenal capsule of the adult mouse give rise to heterotopic gonadal-like tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* **441**, 164–175.
- Douaiher, J., Succar, J., Lancerotto, L., Gurish, M.F., Orgill, D.P., Hamilton, M.J., Krilis, S.A., and Stevens, R.L.** (2014). Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv. Immunol.* **122**, 211–252.
- Drelon, C., Berthon, A., Mathieu, M., Martinez, A., and Val, P.** (2015). Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: A WNT perspective. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408**, 156–164.
- Duparc, C., Moreau, L., Felipe Golib Dzib, J., Boyer, H.-G., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Boulkroun, S., Mukai, K., Benecke, A.G., Amar, L., et al.** (2015). Mast Cell Hyperplasia is Associated with Aldosterone Hypersecretion in a subset of Aldosterone-Producing Adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E550-560.
- Durdu, S., Iskar, M., Revenu, C., Schieber, N., Kunze, A., Bork, P., Schwab, Y., and Gilmour, D.** (2014). Luminal signalling links cell communication to tissue architecture during organogenesis. *Nature* **515**, 120–124.
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A., and Vinson, G.P.** (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr. Rev.* **19**, 101–143.
- Ehrhart-Bornstein, M., Haidan, A., Alesci, S., and Bornstein, S.R.** (2000). Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocr. Res.* **26**, 833–842.
- Ehrhart-Bornstein, M., Lamounier-Zepter, V., Schraven, A., Langenbach, J., Willenberg, H.S., Barthel, A., Hauner, H., McCann, S.M., Scherbaum, W.A., and Bornstein, S.R.** (2003). Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14211–14216.
- Eisele, N., Albrecht, C., Mistry, H.D., Dick, B., Baumann, M., Surbek, D., Currie, G., Delles, C., Mohaupt, M.G., Escher, G., et al.** (2016). Placental expression of the angiogenic placental growth factor is stimulated by both aldosterone and simulated starvation. *Placenta* **40**, 18–24.
- Falhammar, H., Wedell, A., and Nordenström, A.** (2015). Biochemical and genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine* **50**, 306–314.
- Fallo, F., Pistorello, M., Pedini, F., D’Agostino, D., Mantero, F., and Boscaro, M.** (1991). In vitro evidence for local generation of renin and angiotensin II/III immunoreactivity by the human adrenal gland. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **125**, 319–330.
- Faulkner, J.L., Bruder-Nascimento, T., and Belin de Chantemèle, E.J.** (2018). The regulation of aldosterone secretion by leptin: implications in obesity-related cardiovascular disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **27**, 63–69.
- Finco, I., LaPensee, C.R., Krill, K.T., and Hammer, G.D.** (2015). Hedgehog signaling and steroidogenesis. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 105–129.
- Finkielstein, C.V., and Capelluto, D.G.S.** (2016). Disabled-2: A modular scaffold protein with multifaceted functions in signaling. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **38** Suppl 1, S45-55.

- Fokidis, H.B., Adomat, H.H., Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Guns, E.S., and Soma, K.K.** (2015). Regulation of local steroidogenesis in the brain and in prostate cancer: lessons learned from interdisciplinary collaboration. *Front. Neuroendocrinol.* **36**, 108–129.
- Folligan, K., Bouvier, R., Targe, F., Morel, Y., and Trouillas, J.** (2005). Histological and molecular study of fetal human adrenal cortex (12–36 wk). *Ann Endocrinol Paris* **66**, 519–526.
- Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M.** (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **6**, 135–142.
- Ganguly, A., and Davis, J.S.** (1994). Role of calcium and other mediators in aldosterone secretion from the adrenal glomerulosa cells. *Pharmacol. Rev.* **46**, 417–447.
- Gao, C., Li, S., Zhao, T., Chen, J., Ren, H., Zhang, H., Wang, X., Lang, M., Liu, J., Gao, S., et al.** (2015). SCF, regulated by HIF-1 α , promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell progression. *PLoS One* **10**, e0121338.
- García-Iglesias, B.B., Mendoza-Garrido, M.E., Gutiérrez-Ospina, G., Rangel-Barajas, C., Noyola-Díaz, M., and Terrón, J.A.** (2013). Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: involvement of 5-HT₇ receptors. *Neuropharmacology* **71**, 216–227.
- de Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T.** (2000). International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol. Rev.* **52**, 415–472.
- Gaujoux, S., Hantel, C., Launay, P., Bonnet, S., Perlemoine, K., Lefèvre, L., Guillaud-Bataille, M., Beuschlein, F., Tissier, F., Bertherat, J., et al.** (2013). Silencing mutated β -catenin inhibits cell proliferation and stimulates apoptosis in the adrenocortical cancer cell line H295R. *PLoS One* **8**, e55743.
- Gilchrist, A.B., Leake, A., and Charlton, B.G.** (1993). Innervation of the human adrenal cortex: simultaneous visualisation using acetylcholinesterase histochemistry and dopamine beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Acta Anat. (Basel)* **146**, 31–35.
- Gilfillan, A.M., and Tkaczyk, C.** (2006). Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 218–230.
- Giry, J., Safwate, A., and Barlet, J.P.** (1985). Control of aldosterone secretion in domestic mammals during the perinatal period. *Reprod. Nutr. Dev.* **25**, 993–1005.
- Goldberg, E., Grau, J.B., Fortier, J.H., Salvati, E., Levy, R.J., and Ferrari, G.** (2017). Serotonin and catecholamines in the development and progression of heart valve diseases. *Cardiovasc. Res.* **113**, 849–857.
- Gomes, D.C., Leal, L.F., Mermejo, L.M., Scrideli, C.A., Martinelli, C.E., Frago, M.C.B.V., Latronico, A.C., Tone, L.G., Tucci, S., Yunes, J.A., et al.** (2014). Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E1209–1216.
- Gomez-Sanchez, E.P.** (2011). Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? *Trends Endocrinol. Metab.* **22**, 179–187.
- Gomez-Sanchez, C.E., Qi, X., Velarde-Miranda, C., Plonczynski, M.W., Parker, C.R., Rainey, W., Satoh, F., Maekawa, T., Nakamura, Y., Sasano, H., et al.** (2014). Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol. Cell Endocrinol.* **383**, 111–117.
- Goodrich, L.V., Milenković, L., Higgins, K.M., and Scott, M.P.** (1997). Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants. *Science* **277**, 1109–1113.
- Goto, M.** (2006). In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J. Clin. Invest.* **116**, 953–960.

- Goto, M., Brickwood, S., Wilson, D.I., Wood, P.J., Mason, J.I., and Hanley, N.A.** (2002). Steroidogenic enzyme expression within the adrenal cortex during early human gestation. *Endocr. Res.* **28**, 641–645.
- Gozzi, T.G., Harris, N.P., McGown, I.N., Cowley, D.M., Cotterill, A.M., Campbell, P.E., Anderson, P.K., and Warne, G.L.** (2005). Autopsy diagnosis of 21-hydroxylase deficiency CAH in a case of apparent SIDS. *Pediatr. Dev. Pathol.* **8**, 397–401.
- Guasti, L., Paul, A., Laufer, E., and King, P.** (2011). Localization of Sonic hedgehog secreting and receiving cells in the developing and adult rat adrenal cortex. *Mol. Cell. Endocrinol.* **336**, 117–122.
- Guran, T., Buonocore, F., Saka, N., Ozbek, M.N., Aycan, Z., Bereket, A., Bas, F., Darcan, S., Bideci, A., Guven, A., et al.** (2016). Rare Causes of Primary Adrenal Insufficiency: Genetic and Clinical Characterization of a Large Nationwide Cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 284–292.
- Haase, M., Willenberg, H.S., and Bornstein, S.R.** (2011). Update on the corticomedullary interaction in the adrenal gland. *Endocr. Dev.* **20**, 28–37.
- Hall, J.G.** (2016). The early history of Pallister-Hall syndrome—Buried treasure of a sort. *Gene* **589**, 100–103.
- Hanley, N.A., Ball, S.G., Clement-Jones, M., Hagan, D.M., Strachan, T., Lindsay, S., Robson, S., Ostrer, H., Parker, K.L., and Wilson, D.I.** (1999). Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech. Dev.* **87**, 175–180.
- Hattangady, N., Olala, L., Bollag, W.B., and Rainey, W.E.** (2012). Acute and Chronic Regulation of Aldosterone Production. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 151–162.
- Heikkila, M.** (2002). Wnt-4 Deficiency Alters Mouse Adrenal Cortex Function, Reducing Aldosterone Production. *Endocrinology* **143**, 4358–4365.
- Heym, C., Braun, B., Shuyi, Y., Klimaschewski, L., and Colombo-Benkmann, M.** (1995). Immunohistochemical correlation of human adrenal nerve fibres and thoracic dorsal root neurons with special reference to substance P. *Histochem. Cell Biol.* **104**, 233–243.
- Hilbers, U., Peters, J., Bornstein, S.R., Correa, F.M., Jöhren, O., Saavedra, J.M., and Ehrhart-Bornstein, M.** (1999). Local renin-angiotensin system is involved in K⁺-induced aldosterone secretion from human adrenocortical NCI-H295 cells. *Hypertension* **33**, 1025–1030.
- Himathongkam, T., Dluhy, R.G., and Williams, G.H.** (1975). Potassium-aldosterone-renin interrelationships. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **41**, 153–159.
- Hinson, J.P., Vinson, G.P., Pudney, J., and Whitehouse, B.J.** (1989). Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat. *J. Endocrinol.* **121**, 253–260.
- Hinson, J.P., Vinson, G.P., Kapas, S., and Teja, R.** (1991). The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**, 381–389.
- Hoekstra, M., and Van Eck, M.** (2016). HDL is redundant for adrenal steroidogenesis in LDLR knockout mice with a human-like lipoprotein profile. *J. Lipid Res.* **57**, 631–637.
- Hoekstra, M., Ye, D., Hildebrand, R.B., Zhao, Y., Lammers, B., Stitzinger, M., Kuiper, J., Van Berkel, T.J.C., and Van Eck, M.** (2009). Scavenger receptor class B type I-mediated uptake of serum cholesterol is essential for optimal adrenal glucocorticoid production. *J. Lipid Res.* **50**, 1039–1046.
- Hoivik, E.A., Lewis, A.E., Aumo, L., and Bakke, M.** (2010). Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol. Cell. Endocrinol.* **315**, 27–39.

- Hoyer, D.** (2017). 5-HT Receptor Nomenclature: Naming Names, Does It Matter? A Tribute to Maurice Rapport. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 908–919.
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.-J., and Azhar, S.** (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr. Metab.* **7**, 47.
- Huang, C.-C.J., Miyagawa, S., Matsumaru, D., Parker, K.L., and Yao, H.H.-C.** (2010). Progenitor Cell Expansion and Organ Size of Mouse Adrenal Is Regulated by Sonic Hedgehog. *Endocrinology* **151**, 1119–1128.
- Hui, X.-G., Akahira, J. -i., Suzuki, T., Nio, M., Nakamura, Y., Suzuki, H., Rainey, W.E., and Sasano, H.** (2009). Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence. *J. Endocrinol.* **203**, 241–252.
- Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T.J., Hentges, K.E., Zanaria, E., Lalli, E., Tamai, K.T., Sassone-Corsi, P., Lovell-Badge, R., Camerino, G., et al.** (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **10**, 1261–1272.
- Illingworth, D.R., Kenny, T.A., and Orwoll, E.S.** (1982). Adrenal function in heterozygous and homozygous hypobetalipoproteinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **54**, 27–33.
- Irani, A.A., Schechter, N.M., Craig, S.S., DeBlois, G., and Schwartz, L.B.** (1986). Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 4464–4468.
- Ishimoto, H.** (2006). Differential Zonal Expression and Adrenocorticotropin Regulation of Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), a Matricellular Protein, in the Midgestation Human Fetal Adrenal Gland: Implications for Adrenal Development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3208–3214.
- Ishimoto, H., and Jaffe, R.B.** (2010). Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr. Rev.* **32**, 317–355.
- Ishimoto, H., Ginzinger, D.G., and Jaffe, R.B.** (2006). Adrenocorticotropin preferentially up-regulates angiopoietin 2 in the human fetal adrenal gland: implications for coordinated adrenal organ growth and angiogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 1909–1915.
- Ishimoto, H., Minegishi, K., Higuchi, T., Furuya, M., Asai, S., Kim, S.H., Tanaka, M., Yoshimura, Y., and Jaffe, R.B.** (2008). The Periphery of the Human Fetal Adrenal Gland Is a Site of Angiogenesis: Zonal Differential Expression and Regulation of Angiogenic Factors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 2402–2408.
- Ito, S., Iwanaga, T., Yamada, Y., Suzuki, T., Sudo, N., Momotsu, T., and Shibata, A.** (1981). Immunohistological demonstration of ACTH-like immunoreactivity in the foetal adrenal medulla in the 23rd week of gestation. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **97**, 412–418.
- Jeon, J.H., Kim, K., Kim, J.H., Baek, A., Cho, H., Lee, Y.H., Kim, J.W., Kim, D., Han, S.H., Lim, J.-S., et al.** (2008). A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production. *FASEB J.* **22**, 1502–1511.
- Jin, Y., Silverman, A.-J., and Vannucci, S.J.** (2007). Mast cell stabilization limits hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Dev. Neurosci.* **29**, 373–384.
- Jo, Y., King, S.R., Khan, S.A., and Stocco, D.M.** (2005). Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol. Reprod.* **73**, 244–255.
- Johansson, A., Rudolfsson, S., Hammarsten, P., Halin, S., Pietras, K., Jones, J., Stattin, P., Egevad, L., Granfors, T., Wikström, P., et al.** (2010). Mast cells are novel independent prognostic markers in prostate cancer and represent a target for therapy. *Am. J. Pathol.* **177**, 1031–1041.

- Johnston, Z.C., Bellingham, M., Filis, P., Soffientini, U., Hough, D., Bhattacharya, S., Simard, M., Hammond, G.L., King, P., O'Shaughnessy, P.J., et al.** (2018). The human fetal adrenal produces cortisol but no detectable aldosterone throughout the second trimester. *BMC Med.* **16**, 23.
- Jones, C.A., Sigmund, C.D., McGowan, R.A., Kane-Haas, C.M., and Gross, K.W.** (1990). Expression of murine renin genes during fetal development. *Mol. Endocrinol.* **4**, 375–383.
- de Jossineau, C., Sahut-Barnola, I., Levy, I., Saloustros, E., Val, P., Stratakis, C.A., and Martinez, A.** (2012). The cAMP pathway and the control of adrenocortical development and growth. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 28–36.
- Judd, A.M., Call, G.B., Barney, M., McIlmoil, C.J., Balls, A.G., Adams, A., and Oliveira, G.K.** (2000). Possible function of IL-6 and TNF as intraadrenal factors in the regulation of adrenal steroid secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **917**, 628–637.
- Kanczkowski, W., Sue, M., Zacharowski, K., Reincke, M., and Bornstein, S.R.** (2015). The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408**, 241–248.
- Kanczkowski, W., Sue, M., and Bornstein, S.R.** (2016). Adrenal Gland Microenvironment and Its Involvement in the Regulation of Stress-Induced Hormone Secretion during Sepsis. *Front. Endocrinol.* **7**.
- Kawabe, K., Shikayama, T., Tsuboi, H., Oka, S., Oba, K., Yanase, T., Nawata, H., and Morohashi, K.** (1999). Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1267–1284.
- Kessel, J.M., Cale, J.M., Verbrick, E., Parker, C.R., Carlton, D.P., and Bird, I.M.** (2009). Antenatal Betamethasone Depresses Maternal and Fetal Aldosterone Levels. *Reprod. Sci.* **16**(1):94-104
- Khazaie, K., Blatner, N.R., Khan, M.W., Gounari, F., Gounaris, E., Dennis, K., Bonertz, A., Tsai, F.-N., Strouch, M.J., Cheon, E., et al.** (2011). The significant role of mast cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 45–60.
- Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., and Hammer, G.D.** (2008). Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* **135**, 2593–2602.
- Kim, J.-S., Kubota, H., Kiuchi, Y., Doi, K., and Saegusa, J.** (1997). Subcapsular Cell Hyperplasia and Mast Cell Infiltration in the Adrenal Cortex of Mice : Comparative Study in 7 Inbred Strains. *Exp Anim.* **46**, 303–306.
- Kim, K.L., Seo, S., Kim, J.T., Kim, J., Kim, W., Yeo, Y., Sung, J.-H., Park, S.G., and Suh, W.** (2019). SCF (Stem Cell Factor) and cKIT Modulate Pathological Ocular Neovascularization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 2120–2131.
- King, P., Paul, A., and Laufer, E.** (2009). Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 21185–21190.
- Kon, Y., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Sugimura, M., and Murakami, K.** (1991). Intracellular production of adrenal renin in the fetal mouse. An immuno-electron microscopical study. *J. Anat.* **176**, 23–33.
- Kovesdy, C.P., Appel, L.J., Grams, M.E., Gutekunst, L., McCullough, P.A., Palmer, B.F., Pitt, B., Sica, D.A., and Townsend, R.R.** (2017). Potassium homeostasis in health and disease: A scientific workshop cosponsored by the National Kidney Foundation and the American Society of Hypertension. *J. Am. Soc. Hypertens.* **11**, 783–800.
- Kowarski, A., Katz, H., and Migeon, C.J.** (1974). Plasma aldosterone concentration in normal subjects from infancy to adulthood. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **38**, 489–491.
- Kraemer, F.B.** (2007). Adrenal cholesterol utilization. *Mol. Cell. Endocrinol.* **265–266**, 42–45.
- Lalli, E.** (2010). Adrenal cortex ontogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **24**, 853–864.

- Lalli, E.** (2014). Methodological pitfalls in the study of DAX-1 function. *Cell Death Dis.* **5**, e977.
- Lalli, E., and Alonso, J.** (2010). Targeting DAX-1 in embryonic stem cells and cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **14**, 169–177.
- Lalli, E., and Figueiredo, B.C.** (2015). Pediatric adrenocortical tumors: what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. *Front. Endocrinol.* **6**, 23.
- Lalli, E., Barhanin, J., Zennaro, M.-C., and Warth, R.** (2016). Local Control of Aldosterone Production and Primary Aldosteronism. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 123–131.
- Laufer, E., Kesper, D., Vortkamp, A., and King, P.** (2012). Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* **351**, 19–27.
- Lavoie, J.L., and Sigmund, C.D.** (2003). Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* **144**, 2179–2183.
- Le Mestre, J., Duparc, C., Reznik, Y., Bonnet-Serrano, F., Touraine, P., Chabre, O., Young, J., Suzuki, M., Sibony, M., Gobet, F., et al.** (2019). Illicit upregulation of serotonin signaling pathway in adrenals of patients with high plasma or intraadrenal ACTH levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**(11):4967-4980
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilleley, M., Hery, F., Grise, P., Raynaud, G., Verhofstad, A.A.J., Wolf, L.M., and Vaudry, H.** (1992). Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. *Neuroscience* **47**, 999–1007.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Soubrane, C., Legrand, A., Kuhn, J.M., Wolf, L.M., and Vaudry, H.** (1993). Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1662–1666.
- Lefebvre, H., Compagnon, P., Contesse, V., Delarue, C., Thuillez, C., Vaudry, H., and Kuhn, J.-M.** (2001). Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5001–5007.
- Lefebvre, H., Cartier, D., Duparc, C., Lihmann, I., Contesse, V., Delarue, C., Godin, M., Fischmeister, R., Vaudry, H., and Kuhn, J.-M.** (2002). Characterization of serotonin₄ receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1211–1216.
- Lefebvre, H., Prévost, G., and Louiset, E.** (2013). Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur. J. Endocrinol.* **169**, R115-138.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Prévost, G., Zennaro, M.C., Bertherat, J., and Louiset, E.** (2015). Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol. Cell. Endocrinol.* **408**, 198–204.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Naccache, A., Lopez, A.-G., Castanet, M., and Louiset, E.** (2019). Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Vitam. Horm.* **109**, 303–339.
- Lehoux, J.G., and Lefebvre, A.** (1991). Short-term effects of ACTH on the low-density lipoprotein receptor mRNA level in rat and hamster adrenals. *J. Mol. Endocrinol.* **6**, 223–230.
- Lekawanvijit, S., Kamthorn Thamprasert, M.D., and Settakorn, J.** (2011). Adrenal hypoplasia congenita : report of an autopsy case.
- Li, P., Zhang, M., Ma, J.-Q., Sun, Q., Liu, G.-X., Zhao, X.-Z., Feng, W.-H., Shen, S.-M., Guo, H.-Q., and Zhu, D.-L.** (2017). Expression and Histopathological Significance of Disabled-2 in Aldosterone-Producing Adenoma. *Horm. Metab. Res. Horm.* **49**, 520–526.

- Li, Q., Johansson, H., and Grimelius, L.** (1999). Innervation of human adrenal gland and adrenal cortical lesions. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **435**, 580–589.
- Liang, X., Yin, G., Ma, Y., Xu, K., Liu, J., and Li, J.** (2016). The critical role of mast cell-derived hypoxia-inducible factor-1 α in regulating mast cell function. *J. Pharm. Pharmacol.* **68**, 1409–1416.
- Lienhard, D., Lauterburg, M., Escher, G., Frey, F.J., and Frey, B.M.** (2012). High Salt Intake Down-Regulates Colonic Mineralocorticoid Receptors, Epithelial Sodium Channels and 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2. *PLoS One* **7**, e37898.
- Lin, L., Hindmarsh, P.C., Metherell, L.A., Alzyoud, M., Al-Ali, M., Brain, C.E., Clark, A.J.L., Dattani, M.T., and Achermann, J.C.** (2007). Severe loss-of-function mutations in the adrenocorticotropin receptor (ACTHR, MC2R) can be found in patients diagnosed with salt-losing adrenal hypoplasia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **66**, 205–210.
- Lindower, J.B.** (2017). Water balance in the fetus and neonate. *Semin. Fetal. Neonatal Med.* **22**, 71–75.
- Linnoila, R.I., Diaugustine, R.P., Hervonen, A., and Miller, R.J.** (1980). Distribution of [Met⁵]- and [Leu⁵]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience* **5**, 2247–2259.
- Liu, J., Voutilainen, R., Heikkilä, P., and Kahri, A.I.** (1997). Ribonucleic acid expression of the CLA-1 gene, a human homolog to mouse high density lipoprotein receptor SR-BI, in human adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 2522–2527.
- Liu, J., Heikkilä, P., Meng, Q.H., Kahri, A.I., Tikkanen, M.J., and Voutilainen, R.** (2000). Expression of low and high density lipoprotein receptor genes in human adrenals. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* **142**, 677–682.
- Louiset, E., Duparc, C., Young, J., Renouf, S., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., Libé, R., Bram, Z., Groussin, L., Caron, P., et al.** (2013). Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2115–2125.
- Louiset, E., Duparc, C., Lenglet, S., Gomez-Sanchez, C.E., and Lefebvre, H.** (2017). Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **441**, 99–107.
- Lu, L., Suzuki, T., Yoshikawa, Y., Murakami, O., Miki, Y., Moriya, T., Bassett, M.H., Rainey, W.E., Hayashi, Y., and Sasano, H.** (2004). Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 4113–4118.
- Luo, X., Ikeda, Y., and Parker, K.L.** (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* **77**, 481–490.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X.** (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **17**, 9–26.
- MacKenzie, S.M., Connell, J.M.C., and Davies, E.** (2012). Non-adrenal synthesis of aldosterone: a reality check. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 163–167.
- Mandel, H., Shemer, R., Borochowitz, Z.U., Okopnik, M., Knopf, C., Indelman, M., Drugan, A., Tiosano, D., Gershoni-Baruch, R., Choder, M., et al.** (2008). SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am. J. Hum. Genet.* **82**, 39–47.
- Marigo, V., Johnson, R.L., Vortkamp, A., and Tabin, C.J.** (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev. Biol.* **180**, 273–283.

- Martin, G., Pilon, A., Albert, C., Vallé, M., Hum, D.W., Fruchart, J.C., Najib, J., Clavey, V., and Staels, B.** (1999). Comparison of expression and regulation of the high-density lipoprotein receptor SR-BI and the low-density lipoprotein receptor in human adrenocortical carcinoma NCI-H295 cells. *Eur. J. Biochem.* **261**, 481–491.
- Martinerie, L., Pussard, E., Foix-L'Hélias, L., Petit, F., Cosson, C., Boileau, P., and Lombès, M.** (2009a). Physiological partial aldosterone resistance in human newborns. *Pediatr. Res.* **66**, 323–328.
- Martinerie, L., Viengchareun, S., Delezoide, A.-L., Jaubert, F., Sinico, M., Prevot, S., Boileau, P., Meduri, G., and Lombès, M.** (2009b). Low renal mineralocorticoid receptor expression at birth contributes to partial aldosterone resistance in neonates. *Endocrinology* **150**, 4414–4424.
- Martinerie, L., Viengchareun, S., Meduri, G., Kim, H.-S., Luther, J.M., and Lombes, M.** (2011). Aldosterone Postnatally, but not at Birth, Is Required for Optimal Induction of Renal Mineralocorticoid Receptor Expression and Sodium Reabsorption. *Endocrinology* **152**, 2483–2491.
- Martinerie, L., Pussard, E., Yousef, N., Cosson, C., Lema, I., Hussein, K., Mur, S., Lombès, M., and Boileau, P.** (2015). Aldosterone signaling defect exacerbates sodium wasting in very preterm neonates: The Premaldo Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 4074–4081.
- Matsuda, H., Kawakita, K., Kiso, Y., Nakano, T., and Kitamura, Y.** (1989). Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J. Immunol.* **142**, 927–931.
- Mazzocchi, G., Malendowicz, L.K., Musajo, F.G., Gottardo, G., Markowska, A., and Nussdorfer, G.G.** (1998). Role of endothelins in regulation of vascular tone in the in situ perfused rat adrenals. *Am. J. Physiol.* **274**, E1-5.
- McCarty, K.S., Miller, L.S., Cox, E.B., Konrath, J., and McCarty, K.S.** (1985). Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **109**, 716–721.
- McCubrey, J.A., Rakus, D., Gizak, A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Lertpiriyapong, K., Fitzgerald, T.L., Yang, L.V., Montalto, G., Cervello, M., et al.** (2016). Effects of mutations in Wnt/ β -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity-Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 2942–2976.
- McCurley, A., and Jaffe, I.Z.** (2012). Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 256–265.
- McNicol, A.M., Richmond, J., and Charlton, B.G.** (1994). A study of general innervation of the human adrenal cortex using PGP 9.5 immunohistochemistry. *Acta Anat.* **151**, 120–123.
- Mesiano, S., and Jaffe, R.B.** (1997a). Developmental and Functional Biology of the Primate Fetal Adrenal Cortex. *Endocr. Rev.* **18**, 378–403.
- Mesiano, S., and Jaffe, R.B.** (1997b). Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. *Steroids* **62**, 62–72.
- Mesiano, S., Fujimoto, V.Y., Nelson, L.R., Lee, J.Y., Voytek, C.C., and Jaffe, R.B.** (1996). Localization and regulation of corticotropin receptor expression in the midgestation human fetal adrenal cortex: implications for in utero homeostasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 340–345.
- Mesiano, S., Katz, S.L., Lee, J.Y., and Jaffe, R.B.** (1997). Insulin-like growth factors augment steroid production and expression of steroidogenic enzymes in human fetal adrenal cortical cells: implications for adrenal androgen regulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82**, 1390–1396.
- Meyer, N., and Zenclussen, A.C.** (2018). Mast cells—Good guys with a bad image? *Am. J. Reprod. Immunol.* **80**, e13002.

- Miller, W.L., and Bose, H.S.** (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J. Lipid Res.* **52**, 2111–2135.
- Mitani, F.** (2014). Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **90**, 163–183.
- Molin, D., Edström, A., Glimelius, I., Glimelius, B., Nilsson, G., Sundström, C., and Enblad, G.** (2002). Mast cell infiltration correlates with poor prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Haematol.* **119**, 122–124.
- Mulloy, B., Lever, R., and Page, C.P.** (2017). Mast cell glycosaminoglycans. *Glycoconj. J.* **34**, 351–361.
- Mulrow, P.J.** (1989). Adrenal renin: a possible local regulator of aldosterone production. *Yale J. Biol. Med.* **62**, 503–510.
- Mulrow, P.J., and Franco-Saenz, R.** (1996). The adrenal renin-angiotensin system: a local hormonal regulator of aldosterone production. *J. Hypertension* **14**, 173–176.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E.** (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 618–631.
- Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., Gomez-Sanchez, C.E., Mukai, K., Lefebvre, H., and Castanet, M.** (2016). Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* **434**, 69–80.
- Nakamura, Y., Maekawa, T., Felizola, S.J.A., Satoh, F., Qi, X., Velarde-Miranda, C., Plonczynski, M.W., Ise, K., Kikuchi, K., Rainey, W.E., et al.** (2014). Adrenal CYP11B1/2 expression in primary aldosteronism: immunohistochemical analysis using novel monoclonal antibodies. *Mol. Cell. Endocrinol.* **392**, 73–79.
- Nanba, K., Vaidya, A., Williams, G.H., Zheng, I., Else, T., and Rainey, W.E.** (2017). Age-Related Autonomous Aldosteronism. *Circulation* **136**, 347–355.
- Nanba, K., Vaidya, A., and Rainey, W.E.** (2018). Aging and Adrenal Aldosterone Production. *Hypertension* **71**, 218–223.
- Narasaka, T., Suzuki, T., Moriya, T., and Sasano, H.** (2001). Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol. Cell. Endocrinol.* **174**, 111–120.
- Narbona López, E., Maldonado Lozano, J., Nieto García, M., García del Río, C., and Loscertales Abril, M.** (1990). [Plasma concentration of atrial natriuretic peptide, vasopressin and aldosterone in the umbilical cord blood: its relation to perinatal asphyxia]. *An. Esp. Pediatr.* **32**, 49–52.
- Naruse, M., Sussman, C.R., Naruse, K., Jackson, R.V., and Inagami, T.** (1983). Renin exists in human adrenal tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **57**, 482–487.
- Nelson, H.P., Kuhn, R.W., Deyman, M.E., and Jaffe, R.B.** (1990). Human fetal adrenal definitive and fetal zone metabolism of pregnenolone and corticosterone: alternate biosynthetic pathways and absence of detectable aldosterone synthesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **70**, 693–698.
- Neri, G., Andreis, P.G., Prayer-Galetti, T., Rossi, G.P., Malendowicz, L.K., and Nussdorfer, G.G.** (1996). Pituitary adenylate-cyclase activating peptide enhances aldosterone secretion of human adrenal gland: evidence for an indirect mechanism, probably involving the local release of catecholamines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **81**, 169–173.
- Nilsson, G., H. Butterfield, J., Nilsson, K., and Segbahn, A.** (1994). Stem Cell Factor Is a Chemotactic Factor for Human Mast Cells. *J. Immunol.* **153**:3717-23

- Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Shibata, H., Itoh, H., Mitani, F., Yamazaki, T., et al.** (2010). Adrenocortical Zonation in Humans under Normal and Pathological Conditions. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 2296–2305.
- Noack, F., Krüger, S., Thorns, C., Finas, D., Stöcker, W., Diedrich, K., and Horny, H.-P.** (2005). Application of novel tissue microarrays to investigate expression of tryptase, chymase and KIT protein in placental mast cells. *Arch. Gynecol. Obstet.* **272**, 223–228.
- Nogueira, E.F., and Rainey, W.E.** (2010). Regulation of aldosterone synthase by activator transcription factor/cAMP response element-binding protein family members. *Endocrinology* **151**, 1060–1070.
- Nonomura, N., Takayama, H., Nishimura, K., Oka, D., Nakai, Y., Shiba, M., Tsujimura, A., Nakayama, M., Aozasa, K., and Okuyama, A.** (2007). Decreased number of mast cells infiltrating into needle biopsy specimens leads to a better prognosis of prostate cancer. *Br. J. Cancer* **97**, 952–956.
- Nussdorfer, G.G.** (1996). Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol. Rev.* **48**, 495–530.
- Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K., Belloni, A.S., Mazzocchi, G., and Rebuffat, P.** (1988). Effects of substance P on the rat adrenal zona glomerulosa in vivo. *Peptides* **9**, 1145–1149.
- O'Brien, F., and Walker, I.A.** (2014). Fluid homeostasis in the neonate. *Pediatr. Anesth.* **24**, 49–59.
- Oda, N., Takeda, Y., Zhu, A., Usukura, M., Yoneda, T., Takata, H., and Mabuchi, H.** (2006). Pathophysiological Roles of the Adrenal Renin-Angiotensin System in Patients with Primary Aldosteronism. *Hypertens. Res.* **29**, 9–14.
- Oiso, N., Fukai, K., Kawada, A., and Suzuki, T.** (2013). Piebaldism. *J. Dermatol.* **40**, 330–335.
- Okayama, Y., and Kawakami, T.** (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol. Res.* **34**, 97–115.
- Onishi, A., St Ange, K., Dordick, J.S., and Linhardt, R.J.** (2016). Heparin and anticoagulation. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **21**, 1372–1392.
- Orsó, E., Szalay, K.S., Tóth, I.E., Szabó, D., Stark, E., Fehér, T., Perner, F., and Hidvégi, M.** (1995). Effect of histamine on corticosteroid secretion of isolated human and rat adrenocortical cells. *Inflamm. Res.* **44** Suppl 1, S48-49.
- Özgüner, G., Sulak, O., and Koyuncu, E.** (2012). A morphometric study of suprarenal gland development in the fetal period. *Surg. Radiol. Anat.* **34**, 581–587.
- Pagotto, R.M., Pereyra, E.N., Monzón, C., Mondillo, C., and Pignataro, O.P.** (2014). Histamine inhibits adrenocortical cell proliferation but does not affect steroidogenesis. *J. Endocrinol.* **221**, 15–28.
- Pan, Y., Bai, C.B., Joyner, A.L., and Wang, B.** (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3365–3377.
- Parker, K.L., Rice, D.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N.A., et al.** (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog. Horm. Res.* **57**, 19–36.
- Pejler, G., Rönnberg, E., Waern, I., and Wernersson, S.** (2010). Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood* **115**, 4981–4990.
- Peters, J.** (2012). Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland. *Peptides* **34**, 427–432.

- Pezzi, V., Clark, B.J., Ando, S., Stocco, D.M., and Rainey, W.E.** (1996). Role of calmodulin-dependent protein kinase II in the acute stimulation of aldosterone production. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **58**, 417–424.
- Pezzi, V., Mathis, J.M., Rainey, W.E., and Carr, B.R.** (2003). Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **87**, 181–189.
- Procianoy, R.S., and de Oliveira-Filho, E.A.** (1996). Aldosterone cord levels in preterm newborn infants. *Acta Paediatr.* **85**, 611–613.
- Quinn, T., Greaves, R., Badoer, E., and Walker, D.** (2018). DHEA in Prenatal and Postnatal Life: Implications for Brain and Behavior. *Vitam. Horm.* **108**, 145–174.
- Racz, K., Pinet, F., Gasc, J.M., Guyene, T.T., and Corvol, P.** (1992). Coexpression of renin, angiotensinogen, and their messenger ribonucleic acids in adrenal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 730–737.
- Raica, M., Cimpean, A.M., Nico, B., Guidolin, D., and Ribatti, D.** (2010). A comparative study of the spatial distribution of mast cells and microvessels in the foetal, adult human thymus and thymoma. *Int. J. Exp. Pathol.* **91**, 17–23.
- Rainey, W.E., Carr, B.R., Wang, Z.N., and Parker, C.R.** (2001). Gene profiling of human fetal and adult adrenals. *J. Endocrinol.* **171**, 209–215.
- Rainey, W.E., Rehman, K.S., and Carr, B.R.** (2004). The human fetal adrenal: making adrenal androgens for placental estrogens. *Semin. Reprod. Med.* **22**, 327–336.
- Rajput, A.B., Turbin, D.A., Cheang, M.C., Voduc, D.K., Leung, S., Gelmon, K.A., Gilks, C.B., and Huntsman, D.G.** (2008). Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* **107**, 249–257.
- Raymond, W.W., Su, S., Makarova, A., Wilson, T.M., Carter, M.C., Metcalfe, D.D., and Caughey, G.H.** (2009). Alpha 2-macroglobulin capture allows detection of mast cell chymase in serum and creates a reservoir of angiotensin II-generating activity. *J. Immunol.* **182**, 5770–5777.
- Reber, L.L., Marichal, T., and Galli, S.J.** (2012). New models for analyzing mast cell functions in vivo. *Trends Immunol.* **33**, 613–625.
- Rehman, K.S., Carr, B.R., and Rainey, W.E.** (2003). Profiling the steroidogenic pathway in human fetal and adult adrenals. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **10**, 372–380.
- Ribatti, D., Ennas, M.G., Vacca, A., Ferreli, F., Nico, B., Orru, S., and Sirigu, P.** (2003). Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur. J. Clin. Invest.* **33**, 420–425.
- Robillard, J.E., Gomez, R.A., VanOrden, D., and Smith, F.G.** (1982). Comparison of the adrenal and renal responses to angiotensin II fetal lambs and adult sheep. *Circ. Res.* **50**, 140–147.
- Rogerson, F.M., Brennan, F.E., and Fuller, P.J.** (2004). Mineralocorticoid receptor binding, structure and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* **217**, 203–212.
- Romero, D.G., Yanes, L.L., de Rodriguez, A.F., Plonczynski, M.W., Welsh, B.L., Reckelhoff, J.F., Gomez-Sanchez, E.P., and Gomez-Sanchez, C.E.** (2007). Disabled-2 Is Expressed in Adrenal Zona Glomerulosa and Is Involved in Aldosterone Secretion. *Endocrinology* **148**, 2644–2652.
- Rönnberg, E., Melo, F.R., and Pejler, G.** (2012). Mast Cell Proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 950–962.
- Rossi, G.P., Sacchetto, A., Cesari, M., and Pessina, A.C.** (1999). Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc. Res.* **43**, 300–307.

- Rossi, G.P., Cavallin, M., Nussdorfer, G.G., and Pessina, A.C.** (2001). The endothelin-aldosterone axis and cardiovascular diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **38** Suppl 2, S49-52.
- Ruiz i Altaba, A.** (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 3205–3216.
- Ruiz-Babot, G., Balyura, M., Hadjidemetriou, I., Ajodha, S.J., Taylor, D.R., Ghataore, L., Taylor, N.F., Schubert, U., Ziegler, C.G., Storr, H.L., et al.** (2018). Modeling Congenital Adrenal Hyperplasia and Testing Interventions for Adrenal Insufficiency Using Donor-Specific Reprogrammed Cells. *Cell Rep.* **22**, 1236–1249.
- Sadovsky, Y., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Clements, M.A., Tourtellotte, L.M., Simburger, K., and Milbrandt, J.** (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 10939–10943.
- Sarrouilhe, D., and Mesnil, M.** (2019). Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie* **161**, 46–50.
- Sasano, H., Ohashi, Y., Suzuki, T., and Nagura, H.** (1998). Vascularity in human adrenal cortex. *Mod. Pathol.* **11**, 329–333.
- Schiffer, L., Anderko, S., Hannemann, F., Eiden-Plach, A., and Bernhardt, R.** (2015). The CYP11B subfamily. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **151**, 38–51.
- Schinner, S., and Bornstein, S.R.** (2005). Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr. Pathol.* **16**, 91–98.
- Schinner, S., Willenberg, H.S., Krause, D., Schott, M., Lamounier-Zepter, V., Krug, A.W., Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S.R., and Scherbaum, W.A.** (2007). Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int. J. Obes.* **31**, 864–870.
- Schmetzer, O., Valentin, P., Church, M.K., Maurer, M., and Siebenhaar, F.** (2016). Murine and human mast cell progenitors. *Eur. J. Pharmacol.* **5**;2-10
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675.
- Schnermann, J.** (1998). Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am. J. Physiol.* **274**, R263-279.
- Scholl, U.I., Healy, J.M., Thiel, A., Fonseca, A.L., Brown, T.C., Kunstman, J.W., Horne, M.J., Dietrich, D., Riemer, J., Kücükköylü, S., et al.** (2015). Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **83**, 779–789.
- Seitz, B.M., Demireva, E.Y., Xie, H., Fink, G.D., Krieger-Burke, T., Burke, W.M., and Watts, S.W.** (2019). 5-HT does not lower blood pressure in the 5-HT7 knockout rat. *Physiol. Genomics* **51**, 302–310.
- Shen, W.-J., Azhar, S., and Kraemer, F.B.** (2016). ACTH Regulation of Adrenal SR-B1. *Front. Endocrinol.* **7**, 42.
- Shi, G.-P., Bot, I., and Kovanen, P.T.** (2015). Mast cells in human and experimental cardiometabolic diseases. *Nat. Rev. Cardiol.* **12**, 643–658.
- Shibata, S.** (2017). 30 YEARS OF THE MINERALOCORTICOID RECEPTOR: Mineralocorticoid receptor and NaCl transport mechanisms in the renal distal nephron. *J. Endocrinol.* **234**, T35–T47.

- Sicard, F., Ehrhart-Bornstein, M., Corbeil, D., Sperber, S., Krug, A.W., Ziegler, C.G., Rettori, V., McCann, S.M., and Bornstein, S.R. (2007). Age-dependent regulation of chromaffin cell proliferation by growth factors, dehydroepiandrosterone (DHEA), and DHEA sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2007–2012.
- Sippell, W., Müller-Holve, W., Dörr, H., Bidlingmaier, F., and Knorr, D. (1981). Concentrations of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, and cortisone determined simultaneously in human amniotic fluid throughout gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **52**, 385–392.
- de Souza, D.A., Toso, V.D., Campos, M.R. de C., Lara, V.S., Oliver, C., and Jamur, M.C. (2012). Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor progression. *PLoS One* **7**, e40790.
- Speiser, P.W., and White, P.C. (2003). Congenital adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **349**, 776–788.
- Spencer, S.J., Mesiano, S., Lee, J.Y., and Jaffe, R.B. (1999). Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 1110–1115.
- Spyroglou, A., Manolopoulou, J., Wagner, S., Bidlingmaier, M., Reincke, M., and Beuschlein, F. (2009). Short term regulation of aldosterone secretion after stimulation and suppression experiments in mice. *J. Mol. Endocrinol.* **42**, 407–413.
- Stankovic, A.K., Dion, L.D., and Parker, C.R. (1994). Effects of transforming growth factor-beta on human fetal adrenal steroid production. *Mol. Cell. Endocrinol.* **99**, 145–151.
- Stone, D.M., Hynes, M., Armanini, M., Swanson, T.A., Gu, Q., Johnson, R.L., Scott, M.P., Pennica, D., Goddard, A., Phillips, H., et al. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* **384**, 129–134.
- Strouch, M.J., Cheon, E.C., Salabat, M.R., Krantz, S.B., Gounaris, E., Melstrom, L.G., Dangi-Garimella, S., Wang, E., Munshi, H.G., Khazaie, K., et al. (2010). Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **16**, 2257–2265.
- Sucheston, M.E., and Cannon, M.S. (1968). Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J. Morphol.* **126**, 477–491.
- Sulyok, E., Varga, F., Györy, E., Jobst, K., and Csaba, I.F. (1979). Postnatal development of renal sodium handling in premature infants. *J. Pediatr.* **95**, 787–792.
- Sumbayev, V.V., Yasinska, I., Oniku, A.E., Streatfield, C.L., and Gibbs, B.F. (2012). Involvement of hypoxia-inducible factor-1 in the inflammatory responses of human LAD2 mast cells and basophils. *PLoS One* **7**, e34259.
- Suntharalingham, J.P., Buonocore, F., Duncan, A.J., and Achermann, J.C. (2015). DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **29**, 607–619.
- Tanabe, A., Naruse, M., Arai, K., Naruse, K., Yoshimoto, T., Seki, T., Imaki, T., Miyazaki, H., Zeng, Z.P., Demura, R., et al. (1998). Gene expression and roles of angiotensin II type 1 and type 2 receptors in human adrenals. *Horm. Metab. Res.* **30**, 490–495.
- Tanaka, T., Gondo, S., Okabe, T., Ohe, K., Shirohzu, H., Morinaga, H., Nomura, M., Tani, K., Takayanagi, R., Nawata, H., et al. (2007). Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. *J. Mol. Endocrinol.* **39**, 343–350.
- Tao, W., Moore, R., Smith, E.R., and Xu, X.-X. (2016). Endocytosis and Physiology: Insights from Disabled-2 Deficient Mice. *Front. Cell Dev. Biol.* **4**, 129.

- Taves, M.D., Gomez-Sanchez, C.E., and Soma, K.K.** (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**, E11-24.
- Terada, T.** (2015). Stem cells in the development and differentiation of the human adrenal glands. *Microsc. Res. Tech.* **78**, 59–64.
- Terada, T., Urushihara, M., Saijo, T., Nakagawa, R., and Kagami, S.** (2017). (Pro)renin and (pro)renin receptor expression during kidney development in neonates. *Eur. J. Pediatr.* **176**, 183–189.
- Terzolo, M., Boccuzzi, A., Bovio, S., Cappia, S., De Giuli, P., Ali, A., Paccotti, P., Porpiglia, F., Fontana, D., and Angeli, A.** (2001). Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology* **57**, 176–182.
- Theoharides, T.C., Valent, P., and Akin, C.** (2015). Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N. Engl. J. Med.* **373**, 163–172.
- Thomas, C.P., and Itani, O.A.** (2004). New insights into epithelial sodium channel function in the kidney: site of action, regulation by ubiquitin ligases, serum- and glucocorticoid-inducible kinase and proteolysis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **13**, 541–548.
- Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagneré, A.-M., René-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., et al.** (2005). Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* **65**, 7622–7627.
- Travers, S., Martinerie, L., Boileau, P., Lombès, M., and Pussard, E.** (2018). Alterations of adrenal steroidomic profiles in preterm infants at birth. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* **103**, F143–F151.
- Valinsky, W.C., Touyz, R.M., and Shrier, A.** (2018). Aldosterone, SGK1, and ion channels in the kidney. *Clin. Sci. Lond. Engl.* **132**, 173–183.
- Varricchi, G., Galdiero, M.R., Loffredo, S., Marone, G., Iannone, R., Marone, G., and Granata, F.** (2017). Are Mast Cells MASTers in Cancer? *Front. Immunol.* **8**:424
- Vergeer, M., Korporaal, S.J.A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G.K., Hoekstra, M., Sierts, J.A., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., et al.** (2011). Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.* **364**, 136–145.
- Vidal, V., Sacco, S., Rocha, A.S., da Silva, F., Panzolini, C., Dumontet, T., Doan, T.M.P., Shan, J., Rak-Raszewska, A., Bird, T., et al.** (2016). The adrenal capsule is a signaling center controlling cell renewal and zonation through Rspo3. *Genes Dev.* **30**, 1389–1394.
- Vogt, B., Bochud, M., and Burnier, M.** (2007). The association of aldosterone with obesity-related hypertension and the metabolic syndrome. *Semin. Nephrol.* **27**, 529–537.
- Vokes, S.A., Ji, H., McCuine, S., Tenzen, T., Giles, S., Zhong, S., Longabaugh, W.J.R., Davidson, E.H., Wong, W.H., and McMahon, A.P.** (2007). Genomic characterization of Gli-activator targets in sonic hedgehog-mediated neural patterning. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 1977–1989.
- Walczak, E.M., Kuick, R., Finco, I., Bohin, N., Hrycaj, S.M., Wellik, D.M., and Hammer, G.D.** (2014). Wnt signaling inhibits adrenal steroidogenesis by cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **28**, 1471–1486.
- Walther, D.J., and Bader, M.** (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1673–1680.

- Watson, S., Serrate, C., and Vignot, S.** (2010). [Sonic Hedgehog signaling pathway: from embryology to molecular targeted therapies]. *Bull. Cancer* **97**, 1477–1483.
- Welker, P., Grabbe, J., Gibbs, B., Zuberbier, T., and Henz, B.M.** (2000). Nerve growth factor- β induces mast-cell marker expression during in vitro culture of human umbilical cord blood cells. *Immunology* **99**, 418–426.
- Werminghaus, P., Haase, M., Hornsby, P.J., Schinner, S., Schott, M., Malendowicz, L.K., Lammers, B.J., Goretzki, P.E., Müller-Mattheis, V., Markus Giessing, null, et al.** (2014). Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **139**, 7–15.
- Wernersson, S., and Pejler, G.** (2014). Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 478–494.
- Williams, G.H.** (2005). Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Fail. Rev.* **10**, 7–13.
- Winters, A.J., Oliver, C., Colston, C., Macdonald, P.C., and Porter, J.C.** (1974). Plasma ACTH Levels in the Human Fetus and Neonate as Related to Age and Parturition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**, 269–273.
- Wintour, E.M., Alcorn, D., Albiston, A., Boon, W.C., Butkus, A., Earnest, L., Moritz, K., and Shandley, L.** (1998). The renin-angiotensin system and the development of the kidney and adrenal in sheep. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Suppl.* **25**, S97-100.
- Wotus, C., Levay-Young, B.K., Rogers, L.M., Gomez-Sanchez, C.E., and Engeland, W.C.** (1998). Development of adrenal zonation in fetal rats defined by expression of aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase. *Endocrinology* **139**, 4397–4403.
- Xing, Y., Nakamura, Y., and Rainey, W.E.** (2009). G protein-coupled receptor expression in the adult and fetal adrenal glands. *Mol. Cell. Endocrinol.* **300**, 43–50.
- Xing, Y., Parker, C.R., Edwards, M., and Rainey, W.E.** (2010). ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 59–68.
- Xing, Y., Lerario, A.M., Rainey, W., and Hammer, G.D.** (2015). Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **44**, 243–274.
- Zhang, M., Zhou, H., Zheng, C., Xiao, J., Zuo, E., Liu, W., Xie, D., Shi, Y., Wu, C., Wang, H., et al.** (2014). The roles of testicular c-kit positive cells in de novo morphogenesis of testis. *Sci. Rep.* **4**, 5936.

ANNEXE


CHAPTER THIRTEEN

Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions

Hervé Lefebvre^{*,†,1}, Céline Duparc^{*}, Alexandre Naccache^{*,‡},
Antoine-Guy Lopez^{*,†}, Mireille Castanet^{*,‡}, Estelle Louiset^{*}

^{*}Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Normandie University, UNIROUEN, INSERM, Rouen, France

[†]Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Rouen University Hospital, Rouen, France

[‡]Unit of Pediatric Endocrinology, Department of Pediatrics, Rouen University Hospital, Rouen, France

¹Corresponding author: e-mail address: herve.lefebvre@chu-rouen.fr

Contents

1. Introduction	304
2. Autocrine/Paracrine Control of Aldosterone Secretion in the Normal Human Adrenal Gland	305
2.1 Mast Cells and the Serotonin Signaling Pathway	305
2.2 Endothelium	309
2.3 Chromaffin Cells	309
2.4 Innervation	310
2.5 Adipocytes	311
2.6 Steroidogenic Cells	311
2.7 Role of Intraadrenal Autocrine/Paracrine Factors in the Physiological Regulation of Aldosterone Secretion	313
3. Autocrine/Paracrine Mechanisms in Primary Aldosteronism	313
3.1 Mast Cells and the Serotonin Signaling Pathway	314
3.2 Endothelial Cells and Endothelins	317
3.3 Chromaffin Cells, Catecholamines and Vasopressin	318
3.4 Innervation	319
3.5 Adipocytes and Adipokines	319
3.6 Autocrine/Paracrine Regulatory Factors	320
3.7 Autocrine/Paracrine Signaling Pathways	322
4. Integrated Pathophysiology of Primary Aldosteronism	323
4.1 Recent Advances in the Genetics of Primary Aldosteronism	323
4.2 Integration of Genetic Defects and Autocrine/Paracrine Mechanisms in the Pathogenesis of PA	324

5. Perspectives and Conclusion	327
Acknowledgments	328
References	328

Abstract

Aldosterone secretion by the zona glomerulosa of the adrenal cortex is controlled by circulating factors including the renin angiotensin system (RAS) and potassium. Mineralocorticoid production is also regulated through an autocrine/paracrine mechanism by a wide variety of bioactive signals released in the vicinity of adrenocortical cells by chromaffin cells, nerve endings, cells of the immune system, endothelial cells and adipocytes. These regulatory factors include conventional neurotransmitters and neuropeptides. Their physiological role in the control of aldosterone secretion is not fully understood, but it is likely that they participate in the RAS-independent regulation of zona glomerulosa cells. Interestingly, recent observations indicate that autocrine/paracrine processes are involved in the pathophysiology of primary aldosteronism. The intraadrenal regulatory systems observed in aldosterone-producing adenomas (APA), although globally similar to those occurring in the normal adrenal gland, harbor alterations at different levels, which tend to strengthen the potency of paracrine signals to activate aldosterone secretion. Enhancement of paracrine stimulatory tone may participate to APA expansion and aldosterone hypersecretion together with somatic mutations of driver genes which activate the calcium signaling pathway and subsequently aldosterone synthase expression. Intraadrenal regulatory mechanisms represent thus promising pharmacological targets for the treatment of primary aldosteronism.



1. INTRODUCTION

Aldosterone secretion in the zona glomerulosa of the adrenal cortex is positively controlled by circulating factors namely the renin-angiotensin system (RAS), potassium and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). Stimulation of G-protein coupled receptors and membrane depolarization by these factors provokes activation of a calcium signal consecutive to opening of membrane calcium channels and calcium release from intracellular stores (Bollag, 2014; Rossier, 2016). Elevation of intracellular concentration is the major signal responsible for enhancement of aldosterone synthesis which results from an increase in cholesterol transport and phosphorylation of steroidogenic enzymes. The action of calcium mobilization on mineralocorticoid production further involves upregulation of genes encoding steroidogenic enzymes, including *CYP11B2* which encodes for aldosterone synthase, a crucial enzyme for aldosterone synthesis (Bollag, 2014). The present review gives evidence for the existence of an additional control system

of the mineralocorticoid function exerted by intraadrenal mediators released by different cell types present in the human zona glomerulosa. This article also presents the current knowledge supporting the opinion that reinforcement of intraadrenal regulatory factors might contribute to aldosterone overproduction responsible for primary aldosteronism. In addition, we have referred the reader on several occasions to the main review articles devoted to paracrine regulation of mineralocorticoid secretion in physiological and pathological conditions.

Primary aldosteronism (PA) is a major cause of endocrine hypertension which is diagnosed in 6–10% of hypertensive patients (Baguet, Steichen, Mounier-Véhier, & Gosse, 2016). In these patients, arterial hypertension is associated with elevation of the plasma aldosterone to renin ratio and hypokalemia. RAS-independent aldosterone overproduction can result from the presence of a unilateral aldosterone-producing adenoma (APA), also named Conn's adenoma, or unilateral or bilateral adrenal hyperplasia, but is rarely associated with adrenal carcinoma. Determination of the cause of the disease conditions the treatment of aldosterone excess. Patients with APA or unilateral adrenal hyperplasia are cured by adrenalectomy whereas those with bilateral adrenal hyperplasia, causing idiopathic hyperaldosteronism, are treated with antialdosterone medications (Pechère-Bertschi, Herpin, & Lefebvre, 2016; Steichen et al., 2016). The knowledge on the physiopathology of APA is currently evolving. Indeed, recent research has shown that 50–80% of APAs contain somatic mutations of the *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CACNA1D*, or *CTNNB1* genes (Zennaro, Boulkroun, & Fernandes-Rosa, 2017). It is also well established that APAs express ectopic or aberrant membrane G protein-coupled receptors (GPCR) for various regulatory factors, including paracrine factors (Mazzuco, Grunenwald, Lampron, Bourdeau, & Lacroix, 2010; St-Jean, Ghorayeb, Bourdeau, & Lacroix, 2018). Nevertheless, the relationship between somatic mutations, expression of aberrant receptor and upregulation of intraadrenal bioactive factors remains to be explored.



2. AUTOCRINE/PARACRINE CONTROL OF ALDOSTERONE SECRETION IN THE NORMAL HUMAN ADRENAL GLAND

2.1 Mast Cells and the Serotonin Signaling Pathway

Mast cells are immune cells derived from myeloid stem cells. Circulating mast precursors express the Kit receptor (CD117) for the mast cell growth

factor Kit ligand, differentially produced in several organs. Under control of Kit ligand, mast cell precursors infiltrate tissues where they differentiate into mature mast cells containing numerous secretory granules. Indeed, mast cells are able to secrete many factors including proteolytic enzymes (chymase, tryptase, carboxypeptidase A3, renin), cytokines, growth and angiogenic factors, heparin and the biogenic amines histamine and serotonin (5-HT) (Caughey, 2016; Gilfillan, Austin, & Metcalfe, 2011). Mast cells are involved in allergy and anaphylaxis (Metcalfe, 2008). They also play a role in different physiological processes, such as immune tolerance, defense against pathogens, wound healing and angiogenesis.

In the human fetal adrenal, some mast cells expressing Kit receptor and tryptase are present in the definitive zone of cortex from 18 weeks of gestation, prior to expression of steroidogenic enzymes (Naccache et al., 2016). During the subsequent fetal development, mast cells density increases in parallel with transcription of genes encoding 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) and, just before birth, aldosterone synthase, these two enzymes being involved in aldosterone production (Naccache et al., 2016). In the adult adrenal, mast cells are exclusively localized under the capsule of the gland, in the vicinity of cells expressing aldosterone synthase (Duparc et al., 2015; Lefebvre et al., 1992). These data suggest cell-to-cell interactions between mast and steroidogenic cells that may influence the mineralocorticoid function. In support of this hypothesis, we have observed that soluble factors present in human mast cell line-conditioned medium (HMC-1 and LAD2) are able to increase *CYP11B2* expression and aldosterone secretion by the human adrenocortical cell line H295R (Duparc et al., 2015). In order to evaluate this paracrine mode of communication, it will be interesting to test *in vivo* the effect of mast cell inhibiting drugs (Finn & Walsh, 2013), such as cromolyn, nedocromil, nilotinib or masitinib, on the mineralocorticoid function in patients receiving this type of treatments.

The role of mast cells on aldosterone production has been explored *in vivo* by using two mouse models: (i) old female BALB/c mice having high density of mast cells in adrenals, and (ii) mast cell-deficient mice generated by inactive mutation of Kit receptor (*Kit*^{W-sh/W-sh}) (Boyer et al., 2017). In adrenals from BALB/c mice, gene expression level of *Tpsb2*, encoding tryptase, increases in response to low-sodium diet and is positively correlated with the rate of *Cyp11b2* transcript (Boyer et al., 2017). These data indicate that adrenal mast cells are activated by sodium restriction and may contribute to enhance aldosterone synthesis induced by sodium restriction. This process may involve plasma angiotensin II (ANG II) which is able to trigger mast cell

degranulation *via* activation of the angiotensin type 2 (AT2) receptor in rats (Carvalho et al., 2006). By contrast, mast cells do not seem to play a role in the regulation of aldosterone production under normal sodium diet, since plasma and urine aldosterone levels were similar in Kit^{W-sh/W-sh} mice and wild type (WT) animals in this condition (Boyer et al., 2017). Surprisingly, in mast cell-deficient mice, low-sodium diet induced a severe hyperaldosteronism consecutive to activation of the intraadrenal RAS. Activation of intraadrenal RAS may be regarded as a compensatory mechanism aimed to increase aldosterone production in response to sodium depletion in the absence of mast cells. This process obviously overpasses its goal since aldosterone evoked by sodium restriction appears higher than in WT mice.

Paracrine control of mast cells on adrenocortical cells has been further investigated in explants of human adult adrenals. *In vitro* experiments have demonstrated that degranulation of intraadrenal mast cells stimulates aldosterone secretion through release of serotonin (5-HT) and activation of 5-HT type 4 receptors (5-HT4R) positively coupled to the AMPc/protein kinase A pathway and membrane calcium channels (Contesse et al., 2000; Lefebvre et al., 2001, 1993) (Fig. 1). In addition, 5-HT and 5-HT4 receptor agonists weakly increase cortisol production by cultured adrenocortical cells (Louiset, Duparc, Lenglet, Gomez-Sanchez, & Lefebvre, 2017). The expression pattern of 5-HT4R, which is almost exclusive in the zona glomerulosa, explains the higher efficacy of 5-HT to stimulate the mineralocorticoid function (Bram et al., 2016; Cartier et al., 2005; Lefebvre et al., 2015). The glucocorticoid response to 5-HT can be ascribed to activation of 5-HT4R expressed by cortisol-producing cells present in the outer adrenal cortex, i.e., aldosterone synthase-immunonegative and 11 β -hydroxylase-immunopositive cells (Louiset et al., 2017). In agreement with these observations, clinical trials have revealed that 5-HT reuptake inhibitors and 5-HT4R agonists (metoclopramide, cisapride, zacopride) increase plasma aldosterone levels without modifying circulating cortisol concentration (Ahmed et al., 2011; Edwards et al., 1980; Lefebvre et al., 1995, 1993; Pratt, Ganguly, Parkinson, & Weinberger, 1981).

In vivo studies aimed at investigating the physiological role of 5-HT in the control of aldosterone production have been hampered by the lack of specific 5-HT receptor antagonists available for clinical studies. This issue has been recently addressed by using L-lysine which acts as a partial 5-HT4R antagonist *in vitro* and *in vivo* in man (Smriga & Torii, 2003). Food supplementation with this amino acid (5–8 g/day) had no impact on plasma aldosterone measured in healthy subjects in recumbent and upright positions

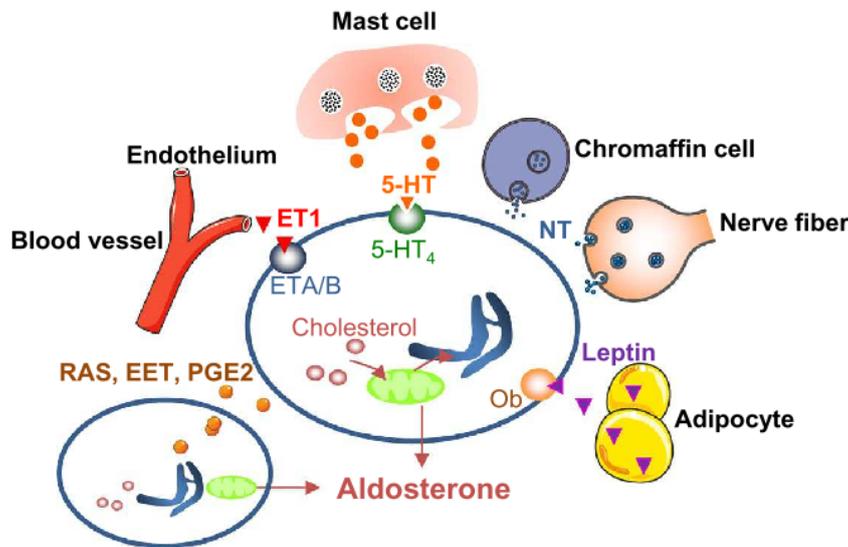


Fig. 1 Schematic representation of the main sources of paracrine regulatory factors involved in control of aldosterone secretion in normal human adrenals. Aldosterone synthesis can be potentially influenced by the bioactive signals released by mast cells, nerve fibers, chromaffin cells, adipocytes, vascular endothelium and steroidogenic cells, through a paracrine mechanism. Serotonin (5-HT) released by mast cells activates the 5-HT type 4 receptor (5-HT₄). Neurotransmitters (NT), including catecholamines and various neuropeptides, are secreted by chromaffin cells and nerve fibers. Leptin produced by adipocytes binds its specific receptor (Ob). Endothelin 1 (ET-1) secreted by endothelial cells is able to activate the endothelin type A and B (ETA/B) receptors. Different factors produced by steroidogenic cells, such as renin angiotensin system (RAS), epoxyeicosatrienoic acid (EET) or prostaglandin E₂ (PGE₂), may modulate aldosterone secretion through an autocrine mechanism.

(Duparc et al., 2017). Similarly, L-lysine uptake did not modify the aldosterone response to low sodium diet. However, the low efficiency of L-lysine to antagonize activation of 5-HT₄R could explain the lack of effect of the amino acid on mineralocorticoid production. Indeed, diet enriched in L-lysine only weakly reduced the plasma aldosterone response to administration of the 5-HT₄R agonist metoclopramide (Duparc et al., 2017). The development of more potent 5-HT₄R antagonists which can be administered in human will provide useful tools to explore the contribution of 5-HT in physiological processes. In this regard, Bharucha et al. have reported that, in healthy volunteers, administration of piboserod, a 5-HT₄R antagonist which is no more available for clinical use, totally blocked the aldosterone response to the 5-HT₄R agonist cisapride (Bharucha et al., 2000). Nevertheless, this clinical study was not designed for evaluating the effect of piboserod on aldosterone secretion in basal

condition and/or under the influence of physiological stimuli. Thus, the putative involvement of the mast cell/5-HT pathway in the regulation of aldosterone production *in vivo* remains to be explored.

2.2 Endothelium

It is well established that the adrenal cortex is richly vascularized. Indeed, immunohistochemical studies with antibodies against endothelial cell markers, such as CD31 and CD34, have revealed a high vascular density reaching 65 vessels/mm² in some studies (Fawcett, Harris, & Bicknell, 1991; Magennis & McNicol, 1998; Sasano, Ohashi, Suzuki, & Nagura, 1998). The vascular network supplies nutrients, cholesterol and oxygen to the adrenocortical cells for steroidogenesis. The dense network of capillaries also allows cell-to-cell interactions between endothelial and glomerulosa cells (Bassett & West, 1997; Sasano et al., 1998). The stimulatory effect of endothelial cell-conditioned medium on aldosterone secretion by human adrenocortical carcinoma H295R cells has reinforced the hypothesis of a paracrine control of endothelium on the mineralocorticoid function (Ansurudeen, Kopprasch, Ehrhart-Bornstein, Bornstein, & Willenberg, 2007; Willenberg et al., 2008). Different factors produced by endothelial cells may participate to this intercellular mode of communication, including cytokines like interleukin-6, nitric oxide (NO) and endothelin (ET-1). Interestingly, the human adrenal cortex expresses big ET-1, the precursor of endothelin, and its specific proteolytic enzyme, endothelin converting enzyme which generates a 21 amino acid peptide named ET-1 (1–21) (Rossi et al., 1995, 2002; Zeng et al., 1998). Rossi et al. have demonstrated that this vasoconstrictor peptide stimulates aldosterone synthesis in cultured human adrenocortical cells (Rossi et al., 2002). The positive action of ET-1 on aldosterone secretion has been confirmed in rats by *in vivo* experiments (Mazzocchi, Rebuffat, Gottardo, Meneghelli, & Nussdorfer, 1996). In human as in rodents, the effect of ET-1 is mediated by the two endothelin receptor subtypes ETA and ETB expressed in zona glomerulosa (Rossi et al., 1994; Zeng et al., 1998). These data indicate that endothelial cells through release of ET-1 participate to the paracrine control of aldosterone secretion (Fig. 1).

2.3 Chromaffin Cells

The presence of islets of chromaffin cells expressing the neuroendocrine marker chromogranin-A has been demonstrated in human adrenal cortex,

including the zona glomerulosa (Bornstein, Gonzalez-Hernandez, Ehrhart-Bornstein, Adler, & Scherbaum, 1994). Mature chromaffin cells located in the outer cortex might derive from nestin-expressing progenitor cells detected under the adrenal capsule, as recently reported in the mouse adrenal (Steenblock et al., 2017). Coexistence of chromaffin and aldosterone-producing cells in the human zona glomerulosa provides the possibility of direct intercellular exchange between these two cellular populations. Chromaffin cells are known to secrete catecholamines, epinephrine and norepinephrine, as well as numerous neurohormones including vasoactive intestinal peptide, calcitonin-related peptide, tachykinins, neuropeptide Y, enkephalins, atrial natriuretic peptides, somatostatin, vasopressin, galanin, corticotropin-releasing hormone, and corticotrophin, which potentially modulate steroidogenesis (Bornstein et al., 1994; Ehrhart-Bornstein, Hinson, Bornstein, Scherbaum, & Vinson, 1998; Nussdorfer, 1996). These catecholamines and neuropeptides are released by chromaffin cells in response to stimulation of splanchnic nerves and proinflammatory cytokines, suggesting that these neuroendocrine cells may contribute to activation of adrenal steroidogenesis during stress and inflammation. In this respect, *in vitro* experiments have revealed that chromaffin cell-conditioned medium stimulated cortisol production but did not influence aldosterone synthesis by cultured bovine adrenocortical cells (Ehrhart-Bornstein, Haidan, Alesci, & Bornstein, 2000). However, it has been reported that norepinephrine activates aldosterone secretion by cultured human adrenocortical cells (Neri et al., 1996).

2.4 Innervation

It is well known for several decades that the human adrenal cortex is richly innervated. Nerve fibers are present in the wall of adrenal arteries at the periphery of the gland and in the capsule. A complex network of nerve structures, comprising both preganglionic and postganglionic cholinergic and noradrenergic fibers, has been described in the zona glomerulosa (Charlton, McGadey, Russell, & Neal, 1992; Charlton, Nkomazana, McGadey, & Neal, 1991; Gilchrist, Leake, & Charlton, 1993; McNicol, Richmond, & Charlton, 1994; Tóth, Vizi, Hinson, & Vinson, 1997). Peptidergic fibers containing neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, calcitonin gene-related peptide and substance P have also been observed in the adrenal cortex (Heym, Colombo-Benckmann, & Mayer, 1994; Li, Johansson, & Grimelius, 1999; Linnoila, Diaugustine, Hervonen, &

Miller, 1980). The occurrence of numerous axon varicosities in the vicinity of blood vessels, subcapsular mast cells and aldosterone-producing cells supports the concept of a nervous control of mineralocorticoid production involving both indirect effects *via* the regulation of adrenal blood flow and mast cell degranulation, and a direct action on zona glomerulosa cells (Fig. 1).

2.5 Adipocytes

The adrenal gland is surrounded by fat tissue. In addition, clusters of adipocytes have been visualized in the adrenocortical parenchyma in some normal subjects (Ehrhart-Bornstein et al., 2003). Following the demonstration that adipocyte-conditioned culture medium stimulated aldosterone production by the adrenocortical cell line H295R, it has been proposed that peri- and intra-adrenal adipocytes may exert a control on steroidogenesis (Krug et al., 2007; Schinner et al., 2007). Up to now, the adipocyte factors involved in the aldosterone response have not been clearly identified. However, it has been evidenced that the cytokine C1q/TNF related protein and the adipokine leptin are able to activate *in vitro* aldosterone production (Faulkner, Bruder-Nascimento, & Belin de Chantemèle, 2018; Huby et al., 2015; Jeon et al., 2008). A direct effect of leptin released by adrenal adipocytes on aldosterone-producing cells is also supported by the expression of Ob leptin receptors in the zona glomerulosa (Faulkner et al., 2018; Glasow et al., 1998) (Fig. 1).

2.6 Steroidogenic Cells

Intercellular communication between steroidogenic cells also plays a role in the control of steroidogenesis. This mode of communication consists in an exchange of steroid precursors or regulatory factors in the extracellular compartment. Conversely, although the human adrenal cortex has been shown to express the mineralocorticoid receptor (MR), aldosterone does not seem to regulate its own production since MR antagonists have no influence on mineralocorticoid synthesis by human adrenocortical cells (Burton, Azizan, & Brown, 2011; Burton et al., 2009).

The diverse components of the RAS have been detected in the zona glomerulosa in human and rodents (Peters, 2012). Expression of RAS is even upregulated in adrenals from anephric rats to compensate the lack of circulating renin (Doi, Atarashi, Franco-Saenz, & Mulrow, 1984). In physiological conditions, high expression levels of renin have been detected in

mouse adrenal during embryonic development, a period during which kidneys are immature (Kon, Hashimoto, Kitagawa, Sugimura, & Murakami, 1990, 1991). After birth, intraadrenal renin production is progressively downregulated in wild type animals. By contrast, renin remains highly expressed at adult stage in adrenals from genetically modified mice which are deficient in proteins involved in the control of aldosterone synthesis, such as aldosterone synthase or Task3 potassium channel, as well as in mast cell-deficient mice subjected to sodium restriction (Bandulik et al., 2013; Boyer et al., 2017; Lee et al., 2005). Thus, upregulation of intraadrenal renin represents a compensatory system aimed to activate aldosterone production *via* locally released ANG II in animals with primary or secondary mineralocorticoid deficiency.

Campbell and co-workers have demonstrated that, in response to Ang II or ACTH stimulation, bovine and rat zona glomerulosa cells produce vasoactive factors such as epoxyeicosatrienoic acid (EET) and dihydroxyeicosatrienoic acid which derive from arachidonic acid metabolism (Kopf, Gauthier, Zhang, Falck, & Campbell, 2011; Shah, Kriska, Gauthier, Falck, & Campbell, 2018). Zona glomerulosa cells are also able to release prostaglandin E2 (PGE2), another metabolite of arachidonic acid (Csukas, Hanke, Rewolinski, & Campbell, 1998). All these molecules provoke vasorelaxation inducing an increase in adrenal blood flow and thus promote steroidogenesis by enhancing oxygen and cholesterol supply to adrenocortical cells. In addition, PGE2 may directly stimulate aldosterone secretion through activation of type 2 (EP2) and type 4 (EP4) prostaglandin receptors expressed in the bovine and rat outer cortex, respectively (Csukas et al., 1998; Muro et al., 2000).

The human adrenal cortex expresses both endothelial and inducible nitric oxide (NO) synthase. *In vitro* studies have shown that expression of NO synthase is increased *in vitro* by potassium at concentrations above the physiological level (3.5 mM) (Kovzun, Lukashenya, Pushkarev, Mikosha, & Tron'ko, 2014). In addition, NO donors inhibited the aldosterone response of human, rat and bovine adrenocortical cells to ACTH and ANG II (Kreklau, Carlson, & Drewett, 1999; Natarajan, Lanting, Bai, Bravo, & Nadler, 1997; Sainz et al., 2004). These data indicate that intraadrenal production of NO is involved in a short regulatory loop to counteract the stimulatory action of circulating regulatory factors.

Adrenomedullin and adrenomedullin 2 are related vasodilator peptides binding to calcitonin-like receptor heterodimerized with receptor activity-modifying protein (RAMP) types 1–3. The presence of both adrenomedullin peptides and their receptors has been documented in the

human zona glomerulosa (Belloni et al., 1998; Rebuffat et al., 2002; Satoh et al., 1997). Functional *in vitro* studies have revealed that adrenomedullin reduces the aldosterone responses to ANG II and potassium in cultured zona glomerulosa cells (Andreis, Tortorella, Mazzocchi, & Nussdorfer, 1998). In addition, it has been reported that activation of the adrenomedullin system stimulates NO synthase in rat adrenal (Rebuffat, Malendowicz, Nussdorfer, & Mazzocchi, 2001). These data suggest that adrenomedullin is a negative paracrine/autocrine factor which exerts a direct effect on steroidogenic cells and an indirect action involving participation of NO synthase.

Finally, it has been demonstrated that diverse cytokines (interleukins 1 and 6, tumor necrosis factor) are produced by adrenocortical cells in the inner cortex but not in the zona glomerulosa, excluding a possible paracrine control of aldosterone secretion by cytokines in the normal adrenal gland (González-Hernández et al., 1995, 1994; González-Hernández, Ehrhart-Bornstein, Späth-Schwalbe, Scherbaum, & Bornstein, 1996).

2.7 Role of Intraadrenal Autocrine/Paracrine Factors in the Physiological Regulation of Aldosterone Secretion

The physiological role of the paracrine regulation of aldosterone secretion remains currently unknown. However, it is well established that renin suppression or pharmacological blockade of the RAS only induces partial and transient inhibition of aldosterone production, indicating that the secretory activity of zona glomerulosa cells is to some extent independent of the RAS (Seifarth, Trenkel, Schobel, Hahn, & Hensen, 2002). It is thus conceivable that intraadrenal bioactive factors may represent a major component of this RAS-independent system of regulation. Paracrine/neurocrine signals may also be involved in extraadrenal diseases associated with hypersecretion of aldosterone. In particular, the neural control of mineralocorticoid production may be responsible for elevation of the plasma aldosterone to renin ratio observed in patients with obesity and metabolic syndrome, a condition known to be associated with sympathetic system overactivity (Ruano et al., 2005; Thorp & Schlaich, 2015).



3. AUTOCRINE/PARACRINE MECHANISMS IN PRIMARY ALDOSTERONISM

Intraadrenal paracrine factors may also play a significant role in the pathophysiology of primary aldosteronism since, in this condition,

aldosterone secretion is independent of the RAS which is suppressed by mineralocorticoid excess. In this regard, a growing body of *in vitro* studies has allowed identification of paracrine regulatory processes in APA tissues.

3.1 Mast Cells and the Serotonin Signaling Pathway

It is now well demonstrated that resident mast cells play a key role in tumorigenesis in various organs even when tumor development is genetically determined (Aponte-López, Fuentes-Pananá, Cortes-Muñoz, & Muñoz-Cruz, 2018; Dyduch, Kaczmarczyk, & Okoń, 2012; Strouch et al., 2010; Yang et al., 2008). Mast cells promote tumor clone expansion through local release of growth factors and angiogenic signals (Hu, Wang, & Cheng, 2018; Mukai, Tsai, Saito, & Galli, 2018; Varricchi et al., 2017). In particular, infiltration of tumor tissues by mast cells has also been observed in endocrine neoplasias including thyroid and pancreatic neuroendocrine tumors, and pheochromocytomas (Ammendola et al., 2017; Białas, Dyduch, Szpor, Demczuk, & Okoń, 2012; Visciano, Prevede, Liotti, & Marone, 2015). The presence of mast cells in adrenocortical neoplasms has been reported for the first time in 1985 (Aiba et al., 1985). Mast cell proliferation was observed in a deoxycorticosterone-secreting tumor and aldosterone-producing adenomas but not in cortisol-secreting adenomas, suggesting that mast cells preferentially favor proliferation of glomerulosa cells and mineralocorticoid secretion. More recently, the increase in mast cell density was confirmed in a large series of APAs (Fig. 2) and transcriptome analysis of genes expressed by mast cells discriminates APAs from normal adrenals by use of unsupervised clustering (Duparc et al., 2015). Interestingly, two main patterns of distribution of mast cells in APA tissues were noted. In approximately one-third of APA tissues, the adenoma was found to be infiltrated by numerous mast cells and mast cell density strongly correlated with aldosterone synthase immunoreactivity and both plasma aldosterone and aldosterone/renin ratio levels, suggesting that intraadenomatous mast cells stimulate aldosterone secretion by adenoma cells through a paracrine mechanism of action. In the remaining APA tissues, mast cells were mainly visualized in the adrenal cortex adjacent to adenoma (ACAA) and associated with larger tumors consistently with the previous observation that peritumoral mast cells are more efficient to promote tumor expansion than intratumoral mast cells (Marichal, Tsai, & Galli, 2013). In this second group of tissues, aldosterone synthase expression, which was detected both in adenoma and ACAA, correlated with the presence of mast cells in ACAA

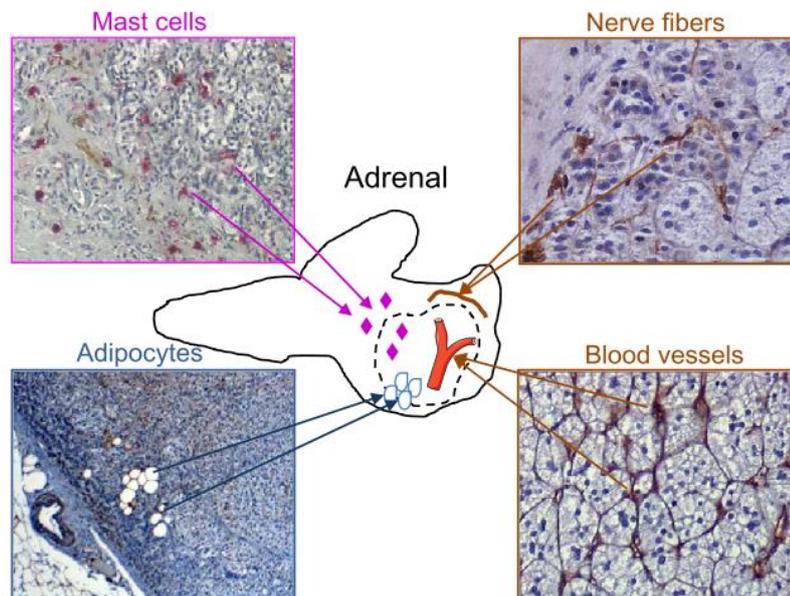


Fig. 2 Main sources of paracrine regulatory factors in aldosterone-producing adenoma (APA) tissues. The secretory activity and proliferation of APA (delineated by dashed line in the central panel) can be potentially influenced by the bioactive signals released by mast cells, nerve fibers, adipocytes and vascular endothelium. Mast cells and adipocytes are present in both APAs and the adrenal cortex adjacent to adenoma while nerve fibers are exclusively observed at the periphery of the adenoma. In addition, APAs, like the normal adrenal cortex, contain a dense network of capillaries resulting in close contacts between endothelial and adrenocortical cells. Mast cells, nerve fibers and blood vessels are labeled by antibodies to tryptase, PS100 and CD34, respectively. Adipocytes are well visible on a hematoxylin APA stained section.

but not in adenomas (Duparc et al., 2015). In ACAA, mast cells, which establish connections with nerve fibers, are intermingled with aldosterone-producing cell clusters and may thus control aldosterone secretion by ZG cells, like in the normal adrenal gland. Globally, these findings suggest that adrenal mast cells are involved in the pathogenesis of APA with different functions depending on their localization. The comprehension of the role of mast cells in the physiology and pathophysiology of the mineralocorticoid function will undoubtedly benefit from the use of animals models. Very recently, a study has shown that mast cell-deficient mice show an exaggerated plasma aldosterone response to sodium restriction leading to hypertension and hypokalemia (Boyer et al., 2017). The severe hyperaldosteronism induced by low sodium diet is associated with overexpression of adrenal renin and type 1 ANG II receptor (AT1R) resulting in strong stimulation of aldosterone synthase expression and aldosterone secretion (Boyer et al., 2017). The ensuing increase in plasma aldosterone represses

renal renin production, a phenomenon that results in an elevation of the plasma aldosterone to renin ratio. Mast cell-deficient mice represent thus an unexpected model of primary aldosteronism which has the particularity to be induced by sodium restriction.

In the normal adrenal gland and human adrenocortical cell line H295R, mast cells stimulate aldosterone production through the release of 5-HT and activation of 5-HT₄R (Duparc et al., 2015; Lefebvre et al., 2001). The increased density of mast cells in APA tissues likely results in an enhancement of intraadrenal production of 5-HT in primary aldosteronism (Duparc et al., 2015) (Fig. 3). The reinforcement of the serotonergic adrenal tone also appears to result from abnormal synthesis of 5-HT by a subpopulation of steroidogenic cells in APAs, suggesting the involvement of autocrine regulations in addition to the paracrine control exerted on steroidogenic cells by mast cells (Cartier et al., 2005) (Fig. 3). Other observations indicate that APA tissues are overresponsive to the stimulatory action of 5-HT. Especially, patients with APA show exaggerated plasma aldosterone responses to 5-HT₄ receptor agonists like metoclopramide and tegaserod (Lampron et al., 2009; Zwermann, Suttman, Bidlingmaier, Beuschlein, & Reincke, 2009). As expected, APA tissues were found to overexpress the 5-HT₄ receptor providing a molecular basis for the increased sensitivity of APAs to 5-HT₄ receptor ligands *in vivo* (Azizan et al., 2012; Cartier et al., 2005; Itcho et al., 2018; Ye, Mariniello, Mantero, Shibata, &

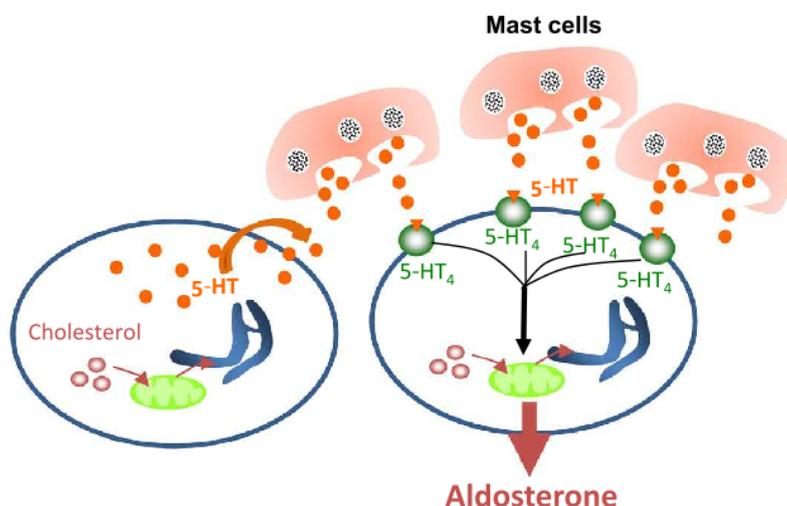


Fig. 3 Schematic representation of the autocrine/paracrine serotonergic control of aldosterone production in APAs. The 5-HT signaling pathway is upregulated in APA tissues as a result of mast cell proliferation, and both illicit synthesis of 5-HT and overexpression of the 5-HT₄ receptor in adrenocortical cells.

Table 1 Overexpression of 5-HT₄ Receptors in Primary Aldosteronism

Experimental Approaches	Patient Tissues	Control Tissues	References
qRT-PCR	APA	Normal adrenals	Cartier et al. (2005)
Microarray and qRT-PCR	APA	Normal adrenals	Ye et al. (2007)
qRT-PCR	APA and hyperplasia	Normal adrenals	Zwermann et al. (2009)
qRT-PCR	APA	Normal adrenals	Lampron et al. (2009)
Microarray	APA	Normal adrenals	Williams et al. (2010)
Microarray	APA	Non-functioning adenomas	Itcho et al. (2018)
Microarray	APA	Peritumoral tissues	Azizan et al. (2012)

Rainey, 2007; Zwermann et al., 2009) (Table 1). Moreover, the expression profile of 5-HT₄ receptor isoforms was different in APAs in comparison with normal adrenals (Cartier et al., 2005). It is conceivable that the alteration of splicing of 5-HT₄ receptor primary transcripts in APAs may also play a role in the potentiation of the adrenal response to serotonergic agents. More recently, it has been shown that overexpression of the 5-HT₄ receptor in APAs may result from hypomethylation of the promoter region of the *HTR4* gene (Itcho et al., 2018). Interestingly, early postoperative testing in patients with APA preoperatively overresponsive to 5-HT₄ receptor agonists shows normalization of basal plasma aldosterone level but no response of aldosterone to the 5-HT₄ receptor cisapride, indicating that the 5-HT₄ receptor is downregulated or not functional in the adrenal gland contralateral to the adenoma (Lefebvre et al., 2002). This finding suggests that aldosterone hypersecretion represses the 5-HT signaling pathway in the normal adrenal gland. It may also have important potential implications for the diagnosis of primary aldosteronism (see Section 4).

3.2 Endothelial Cells and Endothelins

As previously mentioned, the adrenal cortex is a richly vascularized tissue and APAs have shown no major differences with normal adrenals in term

of vascular surface (Bernini et al., 2002; Boulkroun et al., 2010) (Fig. 2). It is thus conceivable that ET-1, which is released by endothelial cells, may exert a stimulatory action on aldosterone secretion in APAs, as observed in the normal adrenal gland (Rossi et al., 2002). Several findings support this hypothesis. First, expression of genes encoding prepro-ET-1, the endothelin-converting enzyme and the endothelin receptors ETA and ETB, has been observed through both PCR and microarray analyses in APA samples (Morello et al., 2009). The expression levels of the diverse components of the endothelin system were similar to those of normal adrenal tissues (Egidy, Baviera, Ciuffo, Corvol, & Pinet, 2001; Zeng et al., 1998). Second, substantial amounts of ET-1 and high-affinity binding endothelin sites have been detected in APA and ET-1 is as efficient as ANG II to activate aldosterone production from APA cells (Rossi et al., 2000). However, plasma ET-1 levels appear to be similar in inferior vena cava and adrenal veins (Morello et al., 2009), and ET-1 receptors seem to be partially downregulated in APAs in comparison with normal adrenal explants (Zeng et al., 1998). Nevertheless, administration of a combination of ETA and ETB antagonists to patients with primary aldosteronism leads to a transient decrease in plasma aldosterone levels (Rossi et al., 2003). Taken collectively, these data suggest that the intra-adrenal endothelin system plays a role in the regulation of aldosterone production in APA but endothelin is probably not a major actor in the pathogenesis of primary aldosteronism.

3.3 Chromaffin Cells, Catecholamines and Vasopressin

3.3.1 Catecholamines

Norepinephrine stimulates aldosterone secretion by normal adrenocortical cells (Neri et al., 1996) but there is no data on the action of catecholamines on mineralocorticoid production from APA cells. In addition, β -blockers mildly reduce circulating aldosterone concentrations in patients with primary aldosteronism but this effect is associated with a simultaneous decrease in plasma renin activity and may thus be regarded as a consequence of the inhibition of the adrenergic command of the juxtaglomerular apparatus (Mulatero et al., 2002). It seems from these data that catecholamines produced by chromaffin cells do not play a significant role in the paracrine control of aldosterone secretion in primary aldosteronism.

3.3.2 Vasopressin

Arginine vasopressin (AVP), after its release by chromaffin cells, may stimulate aldosterone secretion through a paracrine mechanism involving the

V1a receptor (Grazzini et al., 1998; Guillon et al., 1998). Although the role of AVP and its receptors in cortisol overproduction has been well documented in adrenocortical hyperplasias and adenomas causing Cushing's syndrome (Lacroix et al., 2010, 1997; St-Jean et al., 2018), only few studies have suggested that the nonapeptide may be involved in the pathophysiology of primary aldosteronism. AVP has been detected in clusters of cells in APAs but these cells were not further characterized (Perraudin et al., 2006). In addition, APAs were found to express the eutopic V1a receptor and the V2 receptor which is not physiologically found in the normal adrenal gland (Perraudin et al., 2006; Suzuki et al., 2008; Zwermann et al., 2009). Functional studies have revealed that the action of AVP on aldosterone production from APA explants is principally, if not exclusively, mediated by the V1a receptor (Perraudin et al., 2006). However, administration of SR49059, a V1a receptor antagonist, to patients with APA has no significant impact on plasma aldosterone levels but paradoxically induces an increase in plasma aldosterone concentration in response to the upright stimulation test (Perraudin et al., 2006).

3.4 Innervation

APAs, as other types of adrenal neoplasms, are innervated (Li et al., 1999). The nerve fibers observed in APA tissues are exclusively visualized in the adrenal cortex adjacent to adenoma (Fig. 2). It is thus doubtful that neural inputs may directly influence the secretory activity of APAs but an indirect action involving modulation of peradenomatous mast cell degranulation and vascular tone is possible. It is also conceivable that the nervous command of the adrenal cortex may be involved in APA formation as previously shown in various types of tumors (Boilly, Faulkner, Jobling, & Hondermarck, 2017). The neurotransmitters which could potentially mediate this neurocrine mechanism are not known. Nevertheless, it is interesting to mention that APA tissues overexpress mRNAs encoding the receptors for several neurotransmitters such as *GRM3* and *TACR1* mRNAs which respectively encode membrane receptors for glutamate and substance P (Duparc et al., 2015; Itcho et al., 2018; Ye et al., 2007).

3.5 Adipocytes and Adipokines

APAs are surrounded by the perirenal adipose tissue and also contain islets of adipocytes (Fig. 2) intermingled with adrenocortical cells favoring cell-to-cell communications. In fact, the interactions between adipocytes and

steroidogenic cells appear to be bidirectional. Hypersecretion of aldosterone by APAs has been shown to induce several important changes in the perirenal adipose tissue including tissue hypertrophy through stimulation of pre-adipocyte differentiation (Infante, Armani, Mammi, Fabbri, & Caprio, 2017; Wu et al., 2018) and both inflammation and fibrosis (Wu et al., 2018). Intraadrenal adipocytes may reciprocally favor hypersecretion of aldosterone *via* the release of leptin which may exert a direct stimulatory action on adenoma cells. Indeed, APA tissues express significant levels (although lower than those measured in the normal adrenal) of the leptin receptor and *LEPR* mRNA levels positively correlate with plasma supine aldosterone concentrations in patients with APA (Chen et al., 2010). The potential influence of adipocytes on APA cells may also involve other adipokines like adiponectin whose receptors types 1 and 2 are expressed in adenoma tissues (Rossi et al., 2006).

3.6 Autocrine/Paracrine Regulatory Factors

Like in the normal adrenal gland, aldosterone has no action on its own production by APA cells although APA samples have been shown to express the MR (Burton et al., 2011). Nevertheless, other autocrine bioactive signals may participate in the pathophysiology of primary aldosteronism. As the normal adrenals, APAs express the diverse components of the RAS as well as type 1 and 2 ANG II receptors (Oda et al., 2006; Wu et al., 2010). The fact that aldosterone production is not responsive to ANG II in most APAs suggests that the adrenal RAS does not play a role in aldosterone overproduction but it cannot be excluded that ANG II may be involved in APA expansion *via* its mitogenic properties. In addition, *AT2R* mRNAs have been shown to be overexpressed in the subgroup of ANG II-responsive APAs, suggesting that the AT2 receptor may participate in the pathogenesis of aldosterone hypersecretion in some adenomas (Oda et al., 2006).

Zona glomerulosa cells have been shown to synthesize and release various metabolites of arachidonic acid including PGE₂ (Campbell, Brady, Rosolowsky, & Falck, 1991; Csukas et al., 1998). In return, PGE₂ is able to stimulate aldosterone release through both an indirect action involving modulation of the adrenal blood flow and a direct effect on ZG cells. Interestingly, a recent study has shown overexpression of *PTGER1* which encodes PGER1, one of the four PGE₂ receptors, in APA tissues (Itcho et al., 2018). Upregulation of *PTGER1* in APAs is associated with

demethylation of the promotor region of the gene (Itcho et al., 2018). Since aldosterone stimulates PGE2 synthesis *via* activation of cyclooxygenase-2 expression (Rebsamen, Perrier, Gerber-Wicht, Benitah, & Lang, 2004), it is proposed that PGE2, PGER1 and aldosterone itself may form a local auto-crine amplificatory loop which could participate in the pathophysiology of mineralocorticoid hypersecretion by APA tissues (Itcho et al., 2018).

Adrenal autocrine/paracrine factors may also exert inhibitory actions on aldosterone secretion in pathological conditions. Adrenomedullin, initially characterized in a pheochromocytoma tissue, and its related peptide adrenomedullin 2, also called intermedin, have been detected in APA tissues (Forneris, Gottardo, Albertin, Malendowicz, & Nussdorfer, 2001; Morimoto et al., 2008; Satoh et al., 1997). In addition, production of adrenomedullin by APAs has been demonstrated *in vivo*. In fact, patients with APA exhibit higher plasma adrenomedullin levels than normal subjects and the plasma peptide concentration significantly decreases after adrenal adenomectomy (Letizia et al., 1998). Interestingly, a positive correlation between preoperative circulating adrenomedullin level and adenoma size was found in the same patients. Adrenomedullin binding sites have been observed in APAs which have also been found to express calcitonin-like receptor and RAMP1–3 (Forneris et al., 2001; Morimoto et al., 2008). The APA adrenomedullin receptor complexes are highly functional, as indicated by some *in vitro* and *in vivo* studies. Indeed, adrenomedullin even appeared to be more potent to inhibit spontaneous and ANG II-evoked aldosterone production from cultured aldosteronoma cells than in normal adrenocortical cells (Andreis et al., 1998). This finding likely results from overexpression of calcitonin-like receptors. Moreover, adrenomedullin infusion is followed by a decrease in plasma aldosterone levels in patients with primary aldosteronism (Kita, Tokashiki, & Kitamura, 2010). It seems thus that the adrenal adrenomedullin system may exert an inhibitory auto-crine/paracrine on aldosterone synthesis in APA. This process may be regarded as a compensatory mechanism aimed at counteracting the influence of the local paracrine stimulatory factors on steroidogenesis. Conversely, adrenomedullin may be involved in APA expansion as suggested by the positive correlation between adenoma size and blood adrenomedullin levels in patients with primary aldosteronism (Letizia et al., 1998). This hypothesis is supported by the observation that, in the normal adrenal gland, adrenomedullin exerts proliferative and antiapoptotic effects on zona glomerulosa cells (Rebuffat et al., 2002).

3.7 Autocrine/Paracrine Signaling Pathways

During the recent years, a special focus has been given to the role of autocrine/paracrine signaling pathways in the physiology and pathophysiology of the adrenal cortex. The sonic hedgehog (Shh) signaling pathway plays a pivotal role in the development of the adrenal cortex in mice, in which its expression is characteristic of stem cells located in the capsule of the gland (Bitgood & McMahon, 1995; Finco, Lerario, & Hammer, 2018; Laufer, Kesper, Vortkamp, & King, 2012; Penny, Finco, & Hammer, 2017). The diverse components of the Shh pathway are expressed by the normal human adrenal cortex at fetal, postnatal and adult stages, but the role of this pathway in adrenal development has not yet been established in man (Camponova, Duparc, Lefebvre, & Thomas, 2018; Gomes et al., 2014). Shh expression appears increased in both APAs and adrenal cortex adjacent to adenoma (Boulkroun et al., 2011). In addition, transcriptomic analyses have revealed overexpression of genes encoding proteins of the Shh pathway in a subset of APAs (Boulkroun et al., 2011). It appears therefore possible that upregulation of the Shh pathway could be involved in APA formation by favoring nodulation in the adrenal cortex.

The Wnt/ β -catenin pathway is a major actor of the control of adrenocortical development and differentiation (El Wakil & Lalli, 2011). In the normal human adrenal gland, β -catenin is selectively activated in ZG (Boulkroun et al., 2011). In tumor tissues, activation of the pathway is often due to somatic mutations that affect exon 3 of the β -catenin gene (*CTNNB1*) which encodes a serine/threonine-rich domain, preventing the protein from degradation and favoring its accumulation in the cytoplasm and nucleus (Tissier et al., 2005). In fact, immunohistochemical studies have shown that activation of β -catenin is frequent in APAs but somatic mutations are rare, suggesting the involvement of non genomic mechanisms in mobilization of the pathway (Berthon et al., 2014; Boulkroun et al., 2011; Scholl et al., 2015). It has been proposed, on the basis of the study of three female APA cases in whom primary aldosteronism was diagnosed during pregnancy or menopause, that somatic β -catenin mutations may favor illicit expression of the LH/hCG and the gonadotropin-releasing hormone receptors in APA cells (Teo et al., 2015). However, this potential pathophysiological link was not confirmed in a retrospective series of 36 APAs (Gagnon et al., 2018). Data obtained in a transgenic mouse model harboring selective activation of β -catenin in the adrenal cortex indicate that *Cyp11b2* expression is upregulated by β -catenin, a process which may play a

role in both ZG differentiation and hypersecretion of aldosterone by APAs (Berthon et al., 2010). Conversely, it seems that activation of the β -catenin pathway is not sufficient by itself to trigger *CYP11B2* expression because cytoplasmic and nuclear localization of β -catenin has been observed in several types of adrenocortical tumors that do not secrete aldosterone (Tissier et al., 2005).

Finally, one study has shown that the epidermal growth factor-like teratocarcinoma-derived growth factor-1 (TDGF-1) is highly over-expressed in APAs (Williams et al., 2010). In the adrenocortical cell line H295R, TDGF-1 triggers both an increase in aldosterone secretion and inhibition of apoptosis *via* the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling pathway (Williams et al., 2010). It is thus conceivable that this growth factor may participate in tumor expansion and aldosterone hypersecretion during APA formation.



4. INTEGRATED PATHOPHYSIOLOGY OF PRIMARY ALDOSTERONISM

4.1 Recent Advances in the Genetics of Primary Aldosteronism

The development of new highly effective genomic sequencing techniques recently allowed impressive progress in the current knowledge of the genetics of primary aldosteronism. These significant advances have been summarized in several review articles (Boukroun, Fernandes-Rosa, & Zennaro, 2015; Lalli, Barhanin, Zennaro, & Warth, 2016; Zennaro et al., 2017; Zennaro, Fernandes-Rosa, & Boukroun, 2018). To date, four mendelian autosomal dominant forms of PA (I–IV) have been documented (Zennaro et al., 2018), involving respectively formation of a chimeric gene from the *CYP11B1* and *CYP11B2* genes (PA type I), and mutations of the *KCNJ5* gene encoding the potassium channel GIRK4 (PA types II and III) and the *CACNA1H* gene encoding the pore-forming $\alpha 1$ subunit of the T-type voltage-dependent calcium channel Cav3.2 (PA types II and IV). In addition, mutations of the *CACNA1D* gene that encodes the L-type calcium channel Cav1.3 subunit alpha-1D have been reported in a rare condition associating PA, seizures and neurological defects. Germline variants of the armadillo repeat containing 5 (*ARMC5*) gene have also been described in patients with APA but the role of these genetic alterations in the pathophysiological of PA

remains to be elucidated (Mulatero et al., 2016; Zilbermint et al., 2015). More recently, it has been shown that around up to 60% of APA tissues harbor somatic gene mutations that globally increase aldosterone production by enhancing the calcium signaling pathway which is a major regulator of aldosterone synthase expression (Zennaro et al., 2017). These somatic genetic events include mutations in *KCNJ5*, *CACNA1D*, *ATP1A1* and *ATP2B3* encoding ATPases, and *CLCN2* which encodes the voltage-gated ClC-2 chloride channel (Fernandes-Rosa et al., 2018; Lalli et al., 2016; Mulatero, Monticone, Rainey, Veglio, & Williams, 2013; Zennaro et al., 2017, 2018). Mutations in *PRKACA*, encoding the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase catalytic subunit, have also been reported in a limited number of cases (Rhayem et al., 2016). However, it is now well established that mutations of *PRKACA* are principally involved in primary adrenal hypercortisolism, and it is not known how these genetic defects can favor aldosterone hypersecretion in some adrenocortical neoplasms.

4.2 Integration of Genetic Defects and Autocrine/Paracrine Mechanisms in the Pathogenesis of PA

It is now considered that the pathophysiological mechanisms involved respectively in aldosterone hypersecretion and APA formation are different. The role of the somatic mutations in the pathogenesis of aldosterone hypersecretion by APA is admitted but the mechanisms involved in APA formation and expansion are still debated. Based on the results of histological and genetic studies, two main pathophysiological models have been proposed for APA development (Zennaro et al., 2017, 2018) (Fig. 4). The two-hit model suggests that APA results from a first genetic alteration that stimulates adrenocortical cell proliferation ensued by a second mutation triggering aldosterone hypersecretion. In fact, pathological examination of surgically removed APAs has revealed remodeling of the adrenal cortex at the periphery of APA which frequently contains multiple micro- or macronodules (Boulkroun et al., 2010; Nishimoto et al., 2010). Interestingly, these nodules express aldosterone synthase (Boulkroun et al., 2010; Dekkers et al., 2014; Enberg et al., 2004) and harbor different somatic mutations in the driver genes (Dekkers et al., 2014; Fernandes-Rosa et al., 2015) that appear correlated with expression of aldosterone synthase (Nanba et al., 2013). A similar observation has been reported in a multinodular adrenal gland removed from a patient with primary aldosteronism and germline heterozygous mutation in the *APC* gene which encodes a protein of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. In the surgically removed adrenal tissue,

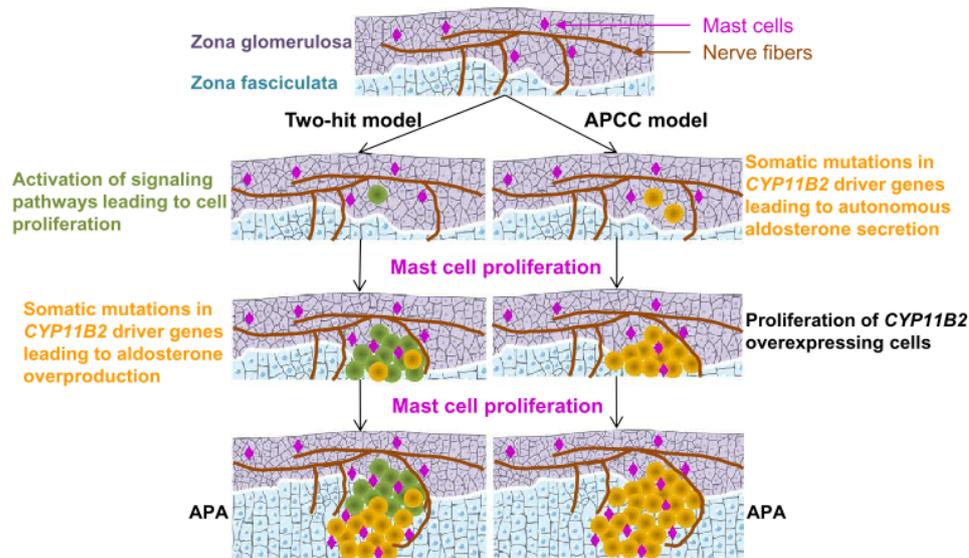


Fig. 4 Schematic representation of the putative mechanisms involved in APA formation. In the two-hit model, APA formation starts with proliferation of zona glomerulosa (ZG) cells under the influence of signaling pathways like the Wnt/ β -catenin and sonic hedgehog pathways. This first step is followed by occurrence of somatic mutations in driver genes favoring an increase in aldosterone synthase expression. Conversely, in the APCC model, somatic mutations appear first in groups of ZG cells resulting in autonomous aldosterone production. Subsequent proliferation of mutated cells leads to development of APA. In the two models, proliferation of mast cells and neural inputs is likely to play a role in both APA growth and aldosterone hypersecretion. *Adapted from Zennaro, M.-C., Boulkroun, S., & Fernandes-Rosa, F. (2017). Genetic causes of functional adrenocortical adenomas. Endocrine Reviews, 38(6), 516–537.*

aldosterone synthase expression was found exclusively in a nodule mutated for *KCNJ5* whereas all nodules showed biallelic inactivation of the *APC* gene and β -catenin activation (Vouillarmet et al., 2016). It is possible that activation of the β -catenin pathway, which is highly frequent in APA tissues (see, above), may represent the first occurrence resulting in cell proliferation and nodule formation. Shh may also be involved in this initial step of expansion. Mast cells, which are recognized players of tumorigenesis in various organs (Marichal et al., 2013; Varricchi et al., 2017) and surround peripheral micronodules in about two-third of APA tissues (Duparc et al., 2015), may participate in this process and secondarily trigger aldosterone hypersecretion, especially in non-mutated adenomas (Fig. 4). In this subset of adenomas, mast cells may indeed stimulate aldosterone secretion independently of the RAS through local release of 5-HT. In this regard, it is relevant to highlight that the 5-HT intraadrenal tone is certainly markedly increased in

APAs, resulting from both mast cells proliferation and illicit production of 5-HT by adrenocortical cells which, on the other hand, overexpress the 5-HT₄ receptor (Cartier et al., 2005; Duparc et al., 2015; Itcho et al., 2018; Ye et al., 2007). It is possible that abnormal synthesis of 5-HT and overexpression of the 5-HT₄ receptor in adrenocortical cells may represent a reminiscence of a fetal stage, as observed in other tumors (Coulter, 2005; Gardiner, Shima, Morohashi, & Swain, 2012). In fact, it has been observed that, in the human fetal adrenal, cells of the definitive zone of the cortex (which gives rise to ZG) express Tph1 and synthesize detectable amounts of 5-HT, and express high levels of the 5-HT₄ receptor mRNA (Naccache et al., 2016). The occurrence of this local regulatory system precedes that of *CYP11B2* expression and apparently regresses after birth since synthesis of 5-HT is not seen in adult adrenal cells although expression of the 5-HT₄ receptor is conserved but at lower levels. Adenoma growth may be promoted by other paracrine factors like neurotransmitters released by intra-adrenal nerve fibers which are observed at the periphery of APAs (Li et al., 1999). However, the neurotransmitters involved in this process remain to be characterized.

Conversely, the second model, i.e., the aldosterone-producing cell cluster (APCC) model, suggests that formation of APA begins with the occurrence of a somatic mutation in a driver gene in ZG cells. In the normal adrenal cortex, *CYP11B2* expression has been visualized in APCCs (Boulkroun et al., 2010; Nishimoto et al., 2010). Interestingly, several mutations of the *CACNA1D* and *ATP1A1* driver genes have been detected in APCCs from normal glands whereas no *KCNJ5* mutation was observed (Nishimoto et al., 2015; Omata et al., 2017). Formation of APA may secondarily result from mutated APCC through possible APCC-to-APA translational lesions (pAATL), at least in *CACNA1D*- and *ATP1A1*-mutated adenomas (Nishimoto et al., 2017). Whether paracrine mechanisms may be involved in this transition is an exciting issue (Fig. 4). Interestingly, it has been noticed that, in primary pigmented nodular adrenocortical disease responsible for cortisol hypersecretion, activation of protein kinase A (PKA) by germline *PRKAR1A* mutations which are causative of the disease triggers upregulation of the 5-HT signaling system leading to enhancement of glucocorticoid production (Bram et al., 2016). A similar observation has been made in adrenal glands removed from patients with Cushing's disease in which the cAMP/PKA pathway is activated by ACTH excess (Le Mestre et al., 2017). It is not known whether somatic mutations in APCCs that activate the calcium signaling pathway may in the same way favor activation of paracrine mechanisms capable of promoting APA growth. However, it is

worthy of note that APAs carrying *CACNA1D* mutations contain a higher density of mast cells than *CACNA1D* non-mutated adenomas (Duparc et al., 2015). Although this observation deserves to be confirmed in a larger series of adenomas, the increased mast cell density in *CACNA1D* mutated APAs is consistent with the previous observation that the L-type calcium channel blocker nifedipine inhibits mast cell proliferation in heart (Liu, Shimada, Xiao, Hu, & Matsumori, 2009). The mechanisms mediating the impact of *CACNA1D* mutations on mast cell density have not been identified. Adrenocortical cells activated by *CACNA1D* mutations may release various signals favoring MC migration, differentiation and proliferation such as stem cell growth factor, interleukin-8 and MCP-1 (Conti et al., 2007; Halova, Draberova, & Draber, 2012). In addition, it is not excluded that aldosterone itself may activate MC which are known to express the mineralocorticoid receptor (Schjerning et al., 2013; Xiao, Shimada, Liu, Hu, & Matsumori, 2009), resulting thus in the development of an intra-adrenal amplification loop. Nevertheless, it seems conceivable that MC recruited by adrenocortical cells under the influence of somatic mutations may both favor APCC growth and participate in the pathogenesis of aldosterone hypersecretion, as also suggested by the fact that, in the normal adrenal gland, some MC are observed in the vicinity of APCCs (Duparc et al., 2015). The role of mast cells in ZG remodeling, nodulation and possibly adenoma formation will have to be explored in animal models exhibiting adrenocortical MC proliferation, like the IQI/Jic mouse strain (Kim, Kubota, Kiuchi, Doi, & Saegusa, 1997).



5. PERSPECTIVES AND CONCLUSION

The current literature suggests that deciphering the intraadrenal paracrine regulatory mechanisms may lead to important practical applications in the field of primary aldosteronism. Especially, targeting the mast cell/5-HT stimulatory pathway is probably the most promising strategy to improve the diagnosis accuracy and therapeutic efficiency in the management of primary aldosteronism. In particular, 5-HT₄ receptor PET ligands, which are presently developed for brain imaging (Deen et al., 2018), could be proposed for lateralization of the source of aldosterone hypersecretion. In addition, pharmacological agents targeted to adrenal 5-HT synthesis or adrenocortical receptivity to 5-HT may represent innovative treatments of primary aldosteronism. In this regard, inhibitors of tryptophan hydroxylase, the key enzyme for 5-HT synthesis, which are currently developed for the

treatment of carcinoid syndrome (Pavel et al., 2018), deserve to be tested in patients with this condition. 5-HT₄ receptor antagonists, like GR113808, inhibit the aldosterone response to 5-HT and 5-HT₄ receptor agonists *in vitro* but these drugs are not currently available for a clinical use. However, the observation that L-lysine, which behaves *in vitro* and *in vivo* as a 5-HT₄ receptor antagonist (Duparc et al., 2017; Smriga & Torii, 2003), inhibits the increase in plasma aldosterone secretion evoked by metoclopramide in healthy volunteers (Duparc et al., 2017) suggests that oral supplementation with L-lysine may reduce aldosterone production in patients with APA. Conversely, non specific serotonergic antagonists like cyproheptadine and ketanserin only induce a modest decrease in plasma aldosterone levels in primary aldosteronism (Gross, Grekin, Gniadek, & Villareal, 1981; Mantero et al., 1985).

In conclusion, it is now admitted that intraadrenal paracrine factors play a significant role in the physiological control of aldosterone secretion together with the renin-angiotensin system and circulating potassium. These local regulatory processes, especially the mast cell/5-HT pathway and adrenal innervation, may also be involved in the pathophysiology of primary aldosteronism although their relationships with the genetic events recently identified in aldosterone-producing adenomas need to be clarified. Finally, they also offer valuable targets for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism.

ACKNOWLEDGMENTS

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

REFERENCES

- Ahmed, A. H., Calvird, M., Gordon, R. D., Taylor, P. J., Ward, G., Pimenta, E., et al. (2011). Effects of two selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants, sertraline and escitalopram, on aldosterone/renin ratio in normotensive depressed male patients. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *96*(4), 1039–1045.
- Aiba, M., Iri, H., Suzuki, H., Kageyama, K., Kawai, T., Abe, O., et al. (1985). Numerous mast cells in an 11-deoxycorticosterone-producing adrenocortical tumor. Histologic evaluation of benignancy and comparison with mast cell distribution in adrenal glands and neoplastic counterparts of 67 surgical specimens. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *109*(4), 357–360.
- Ammendola, M., Gadaleta, C. D., Frampton, A. E., Piardi, T., Memeo, R., Zuccalà, V., et al. (2017). The density of mast cells c-Kit⁺ and tryptase⁺ correlates with each other and with angiogenesis in pancreatic cancer patients. *Oncotarget*, *8*(41), 70463–70471.

- Andreis, P. G., Tortorella, C., Mazzocchi, G., & Nussdorfer, G. G. (1998). Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide inhibits aldosterone secretion of human adrenocortical and Conn's adenoma cells: Comparison with adrenomedullin effect. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(1), 253–257.
- Ansurudeen, I., Kopprasch, S., Ehrhart-Bornstein, M., Bornstein, S. R., & Willenberg, H. S. (2007). Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 265–266, 150–156.
- Aponte-López, A., Fuentes-Pananá, E. M., Cortes-Muñoz, D., & Muñoz-Cruz, S. (2018). Mast cell, the neglected member of the tumor microenvironment: Role in breast Cancer. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2584243.
- Azizan, E. A. B., Lam, B. Y. H., Newhouse, S. J., Zhou, J., Kuc, R. E., Clarke, J., et al. (2012). Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(5), E819–E829.
- Baguet, J.-P., Steichen, O., Mounier-Véhier, C., & Gosse, P. (2016). SFE/SFHATA/AFCE consensus on primary aldosteronism, part 1: Epidemiology of PA, who should be screened for sporadic PA? *Annales d'Endocrinologie*, 77(3), 187–191.
- Bandulik, S., Tauber, P., Penton, D., Schweda, F., Tegtmeier, I., Sterner, C., et al. (2013). Severe hyperaldosteronism in neonatal Task3 potassium channel knockout mice is associated with activation of the intraadrenal renin-angiotensin system. *Endocrinology*, 154(8), 2712–2722.
- Bassett, J. R., & West, S. H. (1997). Vascularization of the adrenal cortex: Its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. *Microscopy Research and Technique*, 36(6), 546–557.
- Belloni, A. S., Meneghelli, V., Champion, H. C., Murray, W. A., Coy, D. H., Kadowitz, P. J., et al. (1998). Autoradiographic evidence that zona glomerulosa and capsular vessels of the human adrenal cortex are provided with different subtypes of adrenomedullin receptors. *Peptides*, 19(9), 1581–1584.
- Bernini, G. P., Moretti, A., Bonadio, A. G., Menicagli, M., Viacava, P., Naccarato, A. G., et al. (2002). Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(11), 4961–4965.
- Berthon, A., Drelon, C., Ragazzon, B., Boulkroun, S., Tissier, F., Amar, L., et al. (2014). WNT/ β -catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Human Molecular Genetics*, 23(4), 889–905.
- Berthon, A., Sahut-Barnola, I., Lambert-Langlais, S., de Joussineau, C., Damon-Soubeyrand, C., Louiset, E., et al. (2010). Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Human Molecular Genetics*, 19(8), 1561–1576.
- Bharucha, A. E., Camilleri, M., Haydock, S., Ferber, I., Burton, D., Cooper, S., et al. (2000). Effects of a serotonin 5-HT(4) receptor antagonist SB-207266 on gastrointestinal motor and sensory function in humans. *Gut*, 47(5), 667–674.
- Białas, M., Dyduch, G., Szpor, J., Demczuk, S., & Okoń, K. (2012). Microvascular density and mast cells in benign and malignant pheochromocytomas. *Polish Journal of Pathology*, 63(4), 235–242.
- Bitgood, M. J., & McMahon, A. P. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Developmental Biology*, 172(1), 126–138.
- Boilly, B., Faulkner, S., Jobling, P., & Hondermarck, H. (2017). Nerve dependence: From regeneration to cancer. *Cancer Cell*, 31(3), 342–354.
- Bollag, W. B. (2014). Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Comprehensive Physiology*, 4(3), 1017–1055.

- Bornstein, S. R., Gonzalez-Hernandez, J. A., Ehrhart-Bornstein, M., Adler, G., & Scherbaum, W. A. (1994). Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *78*(1), 225–232.
- Boukroun, S., Fernandes-Rosa, F. L., & Zennaro, M.-C. (2015). Molecular and cellular mechanisms of aldosterone producing adenoma development. *Frontiers in Endocrinology*, *6*, 95.
- Boukroun, S., Samson-Couterie, B., Dzib, J.-F. G., Lefebvre, H., Louiset, E., Amar, L., et al. (2010). Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism. *Hypertension*, *56*(5), 885–892.
- Boukroun, S., Samson-Couterie, B., Golib-Dzib, J.-F., Amar, L., Plouin, P.-F., Sibony, M., et al. (2011). Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology*, *152*(12), 4753–4763.
- Boyer, H.-G., Wils, J., Renouf, S., Arabo, A., Duparc, C., Boutelet, I., et al. (2017). Dysregulation of aldosterone secretion in mast cell-deficient mice. *Hypertension*, *70*(6), 1256–1263.
- Bram, Z., Louiset, E., Ragazzon, B., Renouf, S., Wils, J., Duparc, C., et al. (2016). PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight*, *1*(15), e87958.
- Burton, T. J., Azizan, E. A. B., & Brown, M. J. (2011). Investigating the function of an aldosterone response pathway in primary human adrenocortical cells obtained from Conn's and pheochromocytoma patients. *European Journal of Pharmacology*, *657*(1–3), 184–189.
- Burton, T. J., Cope, G., Wang, J., Sim, J. C., Azizan, E. A. B., O'Shaughnessy, K. M., et al. (2009). Expression of the epithelial Na⁺ channel and other components of an aldosterone response pathway in human adrenocortical cells. *European Journal of Pharmacology*, *613*(1–3), 176–181.
- Campbell, W. B., Brady, M. T., Rosolowsky, L. J., & Falck, J. R. (1991). Metabolism of arachidonic acid by rat adrenal glomerulosa cells: Synthesis of hydroxyeicosatetraenoic acids and epoxyeicosatrienoic acids. *Endocrinology*, *128*(4), 2183–2194.
- Camponova, P., Duparc, C., Lefebvre, H., & Thomas, M. (2018). Expression of sonic hedgehog signaling components in normal human adrenal cortices and in adrenocortical carcinomas. In *100th Annual meeting of the endocrine society, Chicago, IL, USA*.
- Cartier, D., Jégou, S., Parmentier, F., Lihmann, I., Louiset, E., Kuhn, J.-M., et al. (2005). Expression profile of serotonin₄ (5-HT₄) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *European Journal of Endocrinology*, *153*(6), 939–947.
- Carvalho, R. F., Ribeiro, R. A., Falcão, R. A., Lima, R. C., Leitão, R. F. C., Alcantara, C., et al. (2006). Angiotensin II potentiates inflammatory edema in rats: Role of mast cell degranulation. *European Journal of Pharmacology*, *540*(1–3), 175–182.
- Caughey, G. H. (2016). Mast cell proteases as pharmacological targets. *European Journal of Pharmacology*, *778*, 44–55.
- Charlton, B. G., McGadey, J., Russell, D., & Neal, D. E. (1992). Noradrenergic innervation of the human adrenal cortex as revealed by dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Journal of Anatomy*, *180*(Pt. 3), 501–506.
- Charlton, B. G., Nkomazana, O. F., McGadey, J., & Neal, D. E. (1991). A preliminary study of acetylcholinesterase-positive innervation in the human adrenal cortex. *Journal of Anatomy*, *176*, 99–104.
- Chen, S., Zeng, Z., Li, H., Tong, A., Lu, L., Song, A., et al. (2010). Relationship between plasma level of leptin and the expression of leptin receptor in human adrenal tissues and tumors. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *90*(38), 2667–2670.
- Contesse, V., Lefebvre, H., Lenglet, S., Kuhn, J. M., Delarue, C., & Vaudry, H. (2000). Role of 5-HT in the regulation of the brain-pituitary-adrenal axis: Effects of 5-HT on adrenocortical cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *78*(12), 967–983.

- Conti, P., Castellani, M. L., Kempuraj, D., Salini, V., Vecchiet, J., Tetè, S., et al. (2007). Role of mast cells in tumor growth. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 37(4), 315–322.
- Coulter, C. L. (2005). Fetal adrenal development: Insight gained from adrenal tumors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16(5), 235–242.
- Csukas, S., Hanke, C. J., Rewolinski, D., & Campbell, W. B. (1998). Prostaglandin E2-induced aldosterone release is mediated by an EP2 receptor. *Hypertension*, 31(2), 575–581.
- Deen, M., Hansen, H. D., Hougaard, A., Nørgaard, M., Eiberg, H., Lehel, S., et al. (2018). High brain serotonin levels in migraine between attacks: A 5-HT4 receptor binding PET study. *NeuroImage. Clinical*, 18, 97–102.
- Dekkers, T., ter Meer, M., Lenders, J. W. M., Hermus, A. R. M., Schultze Kool, L., Langenhuijsen, J. F., et al. (2014). Adrenal nodularity and somatic mutations in primary aldosteronism: One node is the culprit? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 99(7), E1341–E1351.
- Doi, Y., Atarashi, K., Franco-Saenz, R., & Mulrow, P. J. (1984). Effect of changes in sodium or potassium balance, and nephrectomy, on adrenal renin and aldosterone concentrations. *Hypertension*, 6(2 Pt. 2), I124–I129.
- Duparc, C., André, C., Ménard, J., Godouet-Getti, B., Wils, J., Cailleux, A. F., et al. (2017). L-lysine acts as a serotonin type 4 receptor antagonist to counteract in vitro and in vivo the stimulatory effect of serotonergic agents on aldosterone secretion in man. *Hormone and Metabolic Research*, 49(4), 269–275.
- Duparc, C., Moreau, L., Dzib, J. F. G., Boyer, H., Tetsi Nomigni, M., Boutelet, I., et al. (2015). Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(4), E550–E560.
- Dyduch, G., Kaczmarczyk, K., & Okoń, K. (2012). Mast cells and cancer: Enemies or allies? *Polish Journal of Pathology*, 63(1), 1–7.
- Edwards, C. R., Al-Dujaili, E. A., Boscaro, M., Quyyumi, S., Miall, P. A., & Rees, L. H. (1980). In vivo and in vitro studies on the effect of metoclopramide on aldosterone secretion. *Clinical Endocrinology*, 13(1), 45–50.
- Egidy, G., Baviera, E., Ciuffo, G., Corvol, P., & Pinet, F. (2001). Localization of the endothelin system in aldosterone-producing adenomas. *Hypertension*, 38(5), 1137–1142.
- Ehrhart-Bornstein, M., Haidan, A., Alesci, S., & Bornstein, S. R. (2000). Neurotransmitters and neuropeptides in the differential regulation of steroidogenesis in adrenocortical-chromaffin co-cultures. *Endocrine Research*, 26(4), 833–842.
- Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J. P., Bornstein, S. R., Scherbaum, W. A., & Vinson, G. P. (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocrine Reviews*, 19(2), 101–143.
- Ehrhart-Bornstein, M., Lamounier-Zepter, V., Schraven, A., Langenbach, J., Willenberg, H. S., Barthel, A., et al. (2003). Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14211–14216.
- El Wakil, A., & Lalli, E. (2011). The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1–2), 32–37.
- Enberg, U., Volpe, C., Höög, A., Wedell, A., Farnebo, L.-O., Thorén, M., et al. (2004). Postoperative differentiation between unilateral adrenal adenoma and bilateral adrenal hyperplasia in primary aldosteronism by mRNA expression of the gene CYP11B2. *European Journal of Endocrinology*, 151(1), 73–85.
- Faulkner, J. L., Bruder-Nascimento, T., & Belin de Chantemèle, E. J. (2018). The regulation of aldosterone secretion by leptin: Implications in obesity-related cardiovascular disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 27(2), 63–69.

- Fawcett, J., Harris, A. L., & Bicknell, R. (1991). Isolation and properties in culture of human adrenal capillary endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *174*(2), 903–908.
- Fernandes-Rosa, F. L., Daniil, G., Orozco, I. J., Göppner, C., El Zein, R., Jain, V., et al. (2018). A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nature Genetics*, *50*(3), 355–361.
- Fernandes-Rosa, F. L., Giscos-Douriez, I., Amar, L., Gomez-Sanchez, C. E., Meatchi, T., Boulkroun, S., et al. (2015). Different somatic mutations in multinodular adrenals with aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*, *66*(5), 1014–1022.
- Finco, I., Lerario, A. M., & Hammer, G. D. (2018). Sonic hedgehog and WNT signaling promote adrenal gland regeneration in male mice. *Endocrinology*, *159*(2), 579–596.
- Finn, D. F., & Walsh, J. J. (2013). Twenty-first century mast cell stabilizers. *British Journal of Pharmacology*, *170*(1), 23–37.
- Forneris, M., Gottardo, L., Albertin, G., Malendowicz, L. K., & Nussdorfer, G. G. (2001). Expression and function of adrenomedullin and its receptors in Conn's adenoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, *8*(6), 675–679.
- Gagnon, N., Caceres, K., Corbeil, G., El Ghorayeb, N., Ludwig, N., Latour, M., et al. (2018). Genetic characterization of GnRH/LH-responsive primary aldosteronism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *103*, 2926–2935.
- Gardiner, J. R., Shima, Y., Morohashi, K., & Swain, A. (2012). SF-1 expression during adrenal development and tumorigenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *351*(1), 12–18.
- Gilchrist, A. B., Leake, A., & Charlton, B. G. (1993). Innervation of the human adrenal cortex: Simultaneous visualisation using acetylcholinesterase histochemistry and dopamine beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Acta Anatomica*, *146*(1), 31–35.
- Gilfillan, A. M., Austin, S. J., & Metcalfe, D. D. (2011). Mast cell biology: Introduction and overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *716*, 2–12.
- Glasow, A., Haidan, A., Hilbers, U., Breidert, M., Gillespie, J., Scherbaum, W. A., et al. (1998). Expression of Ob receptor in normal human adrenals: Differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *83*(12), 4459–4466.
- Gomes, D. C., Leal, L. F., Mermejo, L. M., Scrideli, C. A., Martinelli, C. E., Fragoso, M. C. B. V., et al. (2014). Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(7), E1209–E1216.
- González-Hernández, J. A., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., Gschwend, J. E., Gwosdow, A., Jirikowski, G., et al. (1995). IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clinical and Experimental Immunology*, *99*(1), 137–141.
- Gonzalez-Hernandez, J. A., Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., Späth-Schwalbe, E., Jirikowski, G., & Scherbaum, W. A. (1994). Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: New clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *79*(5), 1492–1497.
- González-Hernández, J. A., Ehrhart-Bornstein, M., Späth-Schwalbe, E., Scherbaum, W. A., & Bornstein, S. R. (1996). Human adrenal cells express tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid: Evidence for paracrine control of adrenal function. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *81*(2), 807–813.
- Grazzini, E., Boccarda, G., Joubert, D., Trueba, M., Durroux, T., Guillon, G., et al. (1998). Vasopressin regulates adrenal functions by acting through different vasopressin receptor subtypes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *449*, 325–334.
- Gross, M. D., Grekin, R. J., Gniadek, T. C., & Villareal, J. Z. (1981). Suppression of aldosterone by cyproheptadine in idiopathic aldosteronism. *The New England Journal of Medicine*, *305*(4), 181–185.

- Guillon, G., Grazzini, E., Andrez, M., Breton, C., Trueba, M., Serradeil-LeGal, C., et al. (1998). Vasopressin: A potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocrine Research*, 24(3–4), 703–710.
- Halova, I., Draberova, L., & Draber, P. (2012). Mast cell chemotaxis—Chemoattractants and signaling pathways. *Frontiers in Immunology*, 3, 119.
- Heym, C., Colombo-Benckmann, M., & Mayer, B. (1994). Immunohistochemical demonstration of the synthesis enzyme for nitric oxide and of comediators in neurons and chromaffin cells of the human adrenal medulla. *Annals of Anatomy*, 176(1), 11–16.
- Hu, G., Wang, S., & Cheng, P. (2018). Tumor-infiltrating tryptase + mast cells predict unfavorable clinical outcome in solid tumors. *International Journal of Cancer*, 142(4), 813–821.
- Huby, A.-C., Antonova, G., Groenendyk, J., Gomez-Sanchez, C. E., Bollag, W. B., Filosa, J. A., et al. (2015). Adipocyte-derived hormone leptin is a direct regulator of aldosterone secretion, which promotes endothelial dysfunction and cardiac fibrosis. *Circulation*, 132(22), 2134–2145.
- Infante, M., Armani, A., Mammi, C., Fabbri, A., & Caprio, M. (2017). Impact of adrenal steroids on regulation of adipose tissue. *Comprehensive Physiology*, 7(4), 1425–1447.
- Itcho, K., Oki, K., Kobuke, K., Yoshii, Y., Ohno, H., Yoneda, M., et al. (2018). Aberrant G protein-receptor expression is associated with DNA methylation in aldosterone-producing adenoma. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 461, 100–104.
- Jeon, J. H., Kim, K., Kim, J. H., Baek, A., Cho, H., Lee, Y. H., et al. (2008). A novel adipokine CTRP1 stimulates aldosterone production. *FASEB Journal*, 22(5), 1502–1511.
- Kim, J. S., Kubota, H., Kiuchi, Y., Doi, K., & Saegusa, J. (1997). Subcapsular cell hyperplasia and mast cell infiltration in the adrenal cortex of mice: Comparative study in 7 inbred strains. *Experimental Animals*, 46(4), 303–306.
- Kita, T., Tokashiki, M., & Kitamura, K. (2010). Aldosterone antiseoretagogue and antihypertensive actions of adrenomedullin in patients with primary aldosteronism. *Hypertension Research*, 33(4), 374–379.
- Kon, Y., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Sugimura, M., & Murakami, K. (1990). Renin immunohistochemistry in the adrenal gland of the mouse fetus and neonate. *The Anatomical Record*, 227(1), 124–131.
- Kon, Y., Hashimoto, Y., Kitagawa, H., Sugimura, M., & Murakami, K. (1991). Intracellular production of adrenal renin in the fetal mouse. An immuno-electron microscopical study. *Journal of Anatomy*, 176, 23–33.
- Kopf, P. G., Gauthier, K. M., Zhang, D. X., Falck, J. R., & Campbell, W. B. (2011). Angiotensin II regulates adrenal vascular tone through zona glomerulosa cell-derived EETs and DHETs. *Hypertension*, 57(2), 323–329.
- Kovzun, E. I., Lukashenya, O. S., Pushkarev, V. M., Mikosha, A. S., & Tron'ko, N. D. (2014). Effect of ions of potassium and lithium on NO synthase expression in the human adrenal cortex. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 156(3), 332–334.
- Kreklau, E. L., Carlson, E. J., & Drewett, J. G. (1999). Nitric oxide inhibits human aldosteronogenesis without guanylyl cyclase stimulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 153(1–2), 103–111.
- Krug, A. W., Vleugels, K., Schinner, S., Lamounier-Zepter, V., Ziegler, C. G., Bornstein, S. R., et al. (2007). Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human adrenocortical cells. *International Journal of Obesity* (2005), 31(10), 1605–1616.
- Lacroix, A., Bourdeau, I., Lampron, A., Mazzuco, T. L., Tremblay, J., & Hamet, P. (2010). Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clinical Endocrinology*, 73(1), 1–15.
- Lacroix, A., Tremblay, J., Touyz, R. M., Deng, L. Y., Lariviere, R., Cusson, J. R., et al. (1997). Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a

- V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(8), 2414–2422.
- Lalli, E., Barhanin, J., Zennaro, M.-C., & Warth, R. (2016). Local control of aldosterone production and primary aldosteronism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 27(3), 123–131.
- Lampron, A., Bourdeau, I., Oble, S., Godbout, A., Schürch, W., Arjane, P., et al. (2009). Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for glucose-dependent insulinotropic peptide in a patient with an aldosteronoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(3), 750–756.
- Lauffer, E., Kesper, D., Vortkamp, A., & King, P. (2012). Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 351(1), 19–27.
- Le Mestre, J., Duparc, C., Reznik, Y., Bertherat, J., Touraine, P., Young, J., et al. (2017). In *Abnormal expression of serotonergic receptors in adrenals of patients with 21-hydroxylase deficiency or Cushing's disease 99th Endocrine society annual meeting*. Orlando, FL, USA: ENDO.
- Lee, G., Makhanova, N., Caron, K., Lopez, M. L. S., Gomez, R. A., Smithies, O., et al. (2005). Homeostatic responses in the adrenal cortex to the absence of aldosterone in mice. *Endocrinology*, 146(6), 2650–2656.
- Lefebvre, H., Cartier, D., Duparc, C., Lihmann, I., Contesse, V., Delarue, C., et al. (2002). Characterization of serotonin(4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: In vivo and in vitro studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(3), 1211–1216.
- Lefebvre, H., Compagnon, P., Contesse, V., Delarue, C., Thuillez, C., Vaudry, H., et al. (2001). Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: Paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(10), 5001–5007.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Feuilleley, M., Hery, F., Grise, P., et al. (1992). Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience*, 47(4), 999–1007.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Legrand, A., Kuhn, J. M., Vaudry, H., et al. (1995). The serotonin-4 receptor agonist cisapride and angiotensin-II exert additive effects on aldosterone secretion in normal man. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(2), 504–507.
- Lefebvre, H., Contesse, V., Delarue, C., Soubrane, C., Legrand, A., Kuhn, J. M., et al. (1993). Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: In vivo and in vitro studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77(6), 1662–1666.
- Lefebvre, H., Duparc, C., Prévost, G., Zennaro, M., Bertherat, J., & Louiset, E. (2015). Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 408, 198–204.
- Letizia, C., De Toma, G., Cerci, S., Massa, R., Coassin, S., Subioli, S., et al. (1998). Adrenomedullin levels are high in primary aldosteronism due to adenoma and decline after surgical cure. *Blood Pressure*, 7(1), 19–23.
- Li, Q., Johansson, H., & Grimelius, L. (1999). Innervation of human adrenal gland and adrenal cortical lesions. *Virchows Archiv*, 435(6), 580–589.
- Linnoila, R. I., Diaugustine, R. P., Hervonen, A., & Miller, R. J. (1980). Distribution of [Met5]- and [Leu5]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience*, 5(12), 2247–2259.
- Liu, W., Shimada, M., Xiao, J., Hu, D., & Matsumori, A. (2009). Nifedipine inhibits the activation of inflammatory and immune reactions in viral myocarditis. *Life Sciences*, 85(5–6), 235–240.

- Louiset, E., Duparc, C., Lenglet, S., Gomez-Sanchez, C. E., & Lefebvre, H. (2017). Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *441*, 99–107.
- Magennis, D. P., & McNicol, A. M. (1998). Vascular patterns in the normal and pathological human adrenal cortex. *Virchows Archiv*, *433*(1), 69–73.
- Mantero, F., Rocco, S., Opocher, G., Armanini, D., Boscaro, M., & D'Agostino, D. (1985). Effect of ketanserin in primary aldosteronism. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *7*(Suppl. 7), S172–S175.
- Marichal, T., Tsai, M., & Galli, S. J. (2013). Mast cells: Potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunology Research*, *1*(5), 269–279.
- Mazzocchi, G., Rebuffat, P., Gottardo, G., Meneghelli, V., & Nussdorfer, G. G. (1996). Evidence that both ETA and ETB receptor subtypes are involved in the in vivo aldosterone secretagogue effect of endothelin-1 in rats. *Research in Experimental Medicine*, *196*(3), 145–152.
- Mazzuco, T. L., Grunenwald, S., Lampron, A., Bourdeau, I., & Lacroix, A. (2010). Aberrant hormone receptors in primary aldosteronism. *Hormone and Metabolic Research*, *42*(6), 416–423.
- McNicol, A. M., Richmond, J., & Charlton, B. G. (1994). A study of general innervation of the human adrenal cortex using PGP 9.5 immunohistochemistry. *Acta Anatomica*, *151*(2), 120–123.
- Metcalf, D. D. (2008). Mast cells and mastocytosis. *Blood*, *112*(4), 946–956.
- Morello, F., Schiavone, D., Mengozzi, G., Bertello, C., Liew, C. C., Bisbocci, D., et al. (2009). Adrenal endothelin-1 levels are not associated with aldosterone secretion in primary aldosteronism. *European Journal of Endocrinology*, *160*(3), 453–458.
- Morimoto, R., Satoh, F., Murakami, O., Hirose, T., Totsune, K., Imai, Y., et al. (2008). Expression of adrenomedullin 2/intermedin in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *The Journal of Endocrinology*, *198*(1), 175–183.
- Mukai, K., Tsai, M., Saito, H., & Galli, S. J. (2018). Mast cells as sources of cytokines, chemokines, and growth factors. *Immunological Reviews*, *282*(1), 121–150.
- Mulatero, P., Monticone, S., Rainey, W. E., Veglio, F., & Williams, T. A. (2013). Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. *Nature Reviews. Endocrinology*, *9*(2), 104–112.
- Mulatero, P., Rabbia, F., Milan, A., Paglieri, C., Morello, F., Chiandussi, L., et al. (2002). Drug effects on aldosterone/plasma renin activity ratio in primary aldosteronism. *Hypertension*, *40*(6), 897–902.
- Mulatero, P., Schiavi, F., Williams, T. A., Monticone, S., Barbon, G., Opocher, G., et al. (2016). ARMC5 mutation analysis in patients with primary aldosteronism and bilateral adrenal lesions. *Journal of Human Hypertension*, *30*(6), 374–378.
- Muro, S., Tanaka, I., Usui, T., Kotani, M., Koide, S., Mukoyama, M., et al. (2000). Expression of prostaglandin E receptor EP4 subtype in rat adrenal zona glomerulosa: Involvement in aldosterone release. *Endocrine Journal*, *47*(4), 429–436.
- Naccache, A., Louiset, E., Duparc, C., Laquerrière, A., Patrier, S., Renouf, S., et al. (2016). Temporal and spatial distribution of mast cells and steroidogenic enzymes in the human fetal adrenal. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *434*, 69–80.
- Nanba, K., Tsuiki, M., Sawai, K., Mukai, K., Nishimoto, K., Usui, T., et al. (2013). Histopathological diagnosis of primary aldosteronism using CYP11B2 immunohistochemistry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *98*, 1567–1574.
- Natarajan, R., Lanting, L., Bai, W., Bravo, E. L., & Nadler, J. (1997). The role of nitric oxide in the regulation of aldosterone synthesis by adrenal glomerulosa cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *61*(1–2), 47–53.
- Neri, G., Andreis, P. G., Prayer-Galetti, T., Rossi, G. P., Malendowicz, L. K., & Nussdorfer, G. G. (1996). Pituitary adenylate-cyclase activating peptide enhances aldosterone secretion of human adrenal gland: Evidence for an indirect mechanism, probably

- involving the local release of catecholamines. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81(1), 169–173.
- Nishimoto, K., Koga, M., Seki, T., Oki, K., Gomez-Sanchez, E. P., Gomez-Sanchez, C. E., et al. (2017). Immunohistochemistry of aldosterone synthase leads the way to the pathogenesis of primary aldosteronism. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441, 124–133.
- Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., et al. (2010). Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(5), 2296–2305.
- Nishimoto, K., Tomlins, S. A., Kuick, R., Cani, A. K., Giordano, T. J., Hovelson, D. H., et al. (2015). Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(33), E4591–E4599.
- Nussdorfer, G. G. (1996). Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacological Reviews*, 48(4), 495–530.
- Oda, N., Takeda, Y., Zhu, A., Usukura, M., Yoneda, T., Takata, H., et al. (2006). Pathophysiological roles of the adrenal renin-angiotensin system in patients with primary aldosteronism. *Hypertension Research*, 29(1), 9–14.
- Omata, K., Anand, S. K., Hovelson, D. H., Liu, C.-J., Yamazaki, Y., Nakamura, Y., et al. (2017). Aldosterone-producing cell clusters frequently harbor somatic mutations and accumulate with age in normal adrenals. *Journal of the Endocrine Society*, 1(7), 787–799.
- Pavel, M., Gross, D. J., Benavent, M., Perros, P., Srirajaskanthan, R., Warner, R. R. P., et al. (2018). Telotristat ethyl in carcinoid syndrome: Safety and efficacy in the TELECAST phase 3 trial. *Endocrine-Related Cancer*, 25(3), 309–322.
- Pechère-Bertschi, A., Herpin, D., & Lefebvre, H. (2016). SFE/SFHTA/AFCE consensus on primary aldosteronism, part 7: Medical treatment of primary aldosteronism. *Annales d'Endocrinologie*, 77(3), 226–234.
- Penny, M. K., Finco, I., & Hammer, G. D. (2017). Cell signaling pathways in the adrenal cortex: Links to stem/progenitor biology and neoplasia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 445, 42–54.
- Perraudin, V., Delarue, C., Lefebvre, H., Do Rego, J.-L., Vaudry, H., & Kuhn, J.-M. (2006). Evidence for a role of vasopressin in the control of aldosterone secretion in primary aldosteronism: In vitro and in vivo studies. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(4), 1566–1572.
- Peters, J. (2012). Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland. *Peptides*, 34(2), 427–432.
- Pratt, J. H., Ganguly, A., Parkinson, C. A., & Weinberger, M. H. (1981). Stimulation of aldosterone secretion by metoclopramide in humans: Apparent independence of renal and pituitary mediation. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 30(2), 129–134.
- Rebsamen, M. C., Perrier, E., Gerber-Wicht, C., Benitah, J.-P., & Lang, U. (2004). Direct and indirect effects of aldosterone on cyclooxygenase-2 and interleukin-6 expression in rat cardiac cells in culture and after myocardial infarction. *Endocrinology*, 145(7), 3135–3142.
- Rebuffat, P., Forneris, M. L., Aragona, F., Ziolkowska, A., Malendowicz, L. K., & Nussdorfer, G. G. (2002). Adrenomedullin and its receptors are expressed in the zona glomerulosa of human adrenal gland: Evidence that ADM enhances proliferation and decreases apoptosis in cultured ZG cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 9(2), 119–124.
- Rebuffat, P., Malendowicz, L. K., Nussdorfer, G. G., & Mazzocchi, G. (2001). Stimulation of endogenous nitric oxide production is involved in the inhibitory effect of adrenomedullin on aldosterone secretion in the rat. *Peptides*, 22(6), 923–926.
- Rhayem, Y., Perez-Rivas, L. G., Dietz, A., Bathon, K., Gebhard, C., Riester, A., et al. (2016). PRKACA somatic mutations are rare findings in aldosterone-producing adenomas. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(8), 3010–3017.

- Rossi, G. P., Albertin, G., Belloni, A., Zanin, L., Biasolo, M. A., Prayer-Galetti, T., et al. (1994). Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(3), 1226–1234.
- Rossi, G. P., Albertin, G., Franchin, E., Sacchetto, A., Cesari, M., Palù, G., et al. (1995). Expression of the endothelin-converting enzyme gene in human tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *211*(1), 249–253.
- Rossi, G. P., Andreis, P. G., Colonna, S., Albertin, G., Aragona, F., Belloni, A. S., et al. (2002). Endothelin-1[1–31]: A novel autocrine-paracrine regulator of human adrenal cortex secretion and growth. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *87*(1), 322–328.
- Rossi, G. P., Andreis, P. G., Neri, G., Tortorella, C., Pelizzo, M. R., Sacchetto, A., et al. (2000). Endothelin-1 stimulates aldosterone synthesis in Conn's adenomas via both A and B receptors coupled with the protein kinase C- and cyclooxygenase-dependent signaling pathways. *Journal of Investigative Medicine*, *48*(5), 343–350.
- Rossi, G. P., Ganzaroli, C., Cesari, M., Maresca, A., Plebani, M., Nussdorfer, G. G., et al. (2003). Endothelin receptor blockade lowers plasma aldosterone levels via different mechanisms in primary aldosteronism and high-to-normal renin hypertension. *Cardiovascular Research*, *57*(1), 277–283.
- Rossi, G. P., Sticchi, D., Giuliani, L., Bernante, P., Zavattiero, S., Pessina, A. C., et al. (2006). Adiponectin receptor expression in the human adrenal cortex and aldosterone-producing adenomas. *International Journal of Molecular Medicine*, *17*(6), 975–980.
- Rossier, M. F. (2016). T-type calcium channel: A privileged gate for calcium entry and control of adrenal steroidogenesis. *Frontiers in Endocrinology*, *7*, 43.
- Ruano, M., Silvestre, V., Castro, R., García-Lescún, M. C. G., Rodríguez, A., Marco, A., et al. (2005). Morbid obesity, hypertensive disease and the renin-angiotensin-aldosterone axis. *Obesity Surgery*, *15*(5), 670–676.
- Sainz, J. M., Reche, C., Rábano, M. A., Mondillo, C., Patrignani, Z. J., Macarulla, J. M., et al. (2004). Effects of nitric oxide on aldosterone synthesis and nitric oxide synthase activity in glomerulosa cells from bovine adrenal gland. *Endocrine*, *24*(1), 61–71.
- Sasano, H., Ohashi, Y., Suzuki, T., & Nagura, H. (1998). Vascularity in human adrenal cortex. *Modern Pathology*, *11*(4), 329–333.
- Satoh, F., Takahashi, K., Murakami, O., Totsune, K., Sone, M., Ohneda, M., et al. (1997). Immunoreactive adrenomedullin in human adrenal glands and adrenal tumors. *Cancer Detection and Prevention*, *21*(1), 51–54.
- Schinner, S., Willenberg, H. S., Krause, D., Schott, M., Lamounier-Zepter, V., Krug, A. W., et al. (2007). Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *International Journal of Obesity (2005)*, *31*(5), 864–870.
- Schjerning, J., Uehnholt, T. R., Svenningsen, P., Vanhoutte, P. M., Skøtt, O., Jensen, B. L., et al. (2013). Histamine-dependent prolongation by aldosterone of vasoconstriction in isolated small mesenteric arteries of the mouse. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *304*(8), H1094–H1102.
- Scholl, U. I., Healy, J. M., Thiel, A., Fonseca, A. L., Brown, T. C., Kunstman, J. W., et al. (2015). Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clinical Endocrinology*, *83*(6), 779–789.
- Seifarth, C., Trenkel, S., Schobel, H., Hahn, E. G., & Hensen, J. (2002). Influence of anti-hypertensive medication on aldosterone and renin concentration in the differential diagnosis of essential hypertension and primary aldosteronism. *Clinical Endocrinology*, *57*(4), 457–465.

- Shah, A. J., Kriska, T., Gauthier, K. M., Falck, J. R., & Campbell, W. B. (2018). Effect of angiotensin II and ACTH on adrenal blood flow in the male rat adrenal gland in vivo. *Endocrinology*, *159*(1), 217–226.
- Smriga, M., & Torii, K. (2003). L-lysine acts like a partial serotonin receptor 4 antagonist and inhibits serotonin-mediated intestinal pathologies and anxiety in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15370–15375.
- Steenblock, C., Rubin de Celis, M. F., Androutsellis-Theotokis, A., Sue, M., Delgadillo Silva, L. F., Eisenhofer, G., et al. (2017). Adrenal cortical and chromaffin stem cells: Is there a common progeny related to stress adaptation? *Molecular and Cellular Endocrinology*, *441*, 156–163.
- Steichen, O., Amar, L., Chaffanjon, P., Kraimps, J.-L., Ménégau, F., & Zinzindohoue, F. (2016). SFE/SFHTA/AFCE consensus on primary aldosteronism, part 6: Adrenal surgery. *Annales d'Endocrinologie*, *77*(3), 220–225.
- St-Jean, M., Ghorayeb, N. E., Bourdeau, I., & Lacroix, A. (2018). Aberrant G-protein coupled hormone receptor in adrenal diseases. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *32*(2), 165–187.
- Strouch, M. J., Cheon, E. C., Salabat, M. R., Krantz, S. B., Gounaris, E., Melstrom, L. G., et al. (2010). Crosstalk between mast cells and pancreatic cancer cells contributes to pancreatic tumor progression. *Clinical Cancer Research*, *16*(8), 2257–2265.
- Suzuki, S., Uchida, D., Koide, H., Suyama, K., Shibata, T., Yoshida, T., et al. (2008). A possible association between aldosterone response to vasopressin and circadian change of aldosterone in the patients with aldosterone-producing adenoma. *Peptides*, *29*(12), 2225–2231.
- Teo, A. E. D., Garg, S., Shaikh, L. H., Zhou, J., Karet Frankl, F. E., Gurnell, M., et al. (2015). Pregnancy, primary aldosteronism, and adrenal CTNNB1 mutations. *The New England Journal of Medicine*, *373*(15), 1429–1436.
- Thorp, A. A., & Schlaich, M. P. (2015). Relevance of sympathetic nervous system activation in obesity and metabolic syndrome. *Journal of Diabetes Research*, *2015*, 341583.
- Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagneré, A.-M., et al. (2005). Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: Activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Research*, *65*(17), 7622–7627.
- Tóth, I. E., Vizi, E. S., Hinson, J. P., & Vinson, G. P. (1997). Innervation of the adrenal cortex, its physiological relevance, with primary focus on the noradrenergic transmission. *Microscopy Research and Technique*, *36*(6), 534–545.
- Varricchi, G., Galdiero, M. R., Loffredo, S., Marone, G., Iannone, R., Marone, G., et al. (2017). Are mast cells MASTers in cancer? *Frontiers in Immunology*, *8*, 424.
- Visciano, C., Prevede, N., Liotti, F., & Marone, G. (2015). Tumor-associated mast cells in thyroid cancer. *International Journal of Endocrinology*, *2015*, 705169.
- Vouillarnet, J., Fernandes-Rosa, F., Graeppi-Dulac, J., Lantelme, P., Decaussin-Petrucci, M., Thivolet, C., et al. (2016). Aldosterone-producing adenoma with a somatic KCNJ5 mutation revealing APC-dependent familial adenomatous polyposis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(11), 3874–3878.
- Willenberg, H. S., Ansurudeen, I., Schebesta, K., Haase, M., Wess, B., Schinner, S., et al. (2008). The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6 and aldosterone generation by adrenocortical cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *116*(Suppl. 1), S70–S74.
- Williams, T. A., Monticone, S., Morello, F., Liew, C.-C., Mengozzi, G., Pilon, C., et al. (2010). Teratocarcinoma-derived growth factor-1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas and increases aldosterone secretion and inhibits apoptosis in vitro. *Hypertension*, *55*(6), 1468–1475.

- Wu, Z., Ni, D., Yan, Y., Li, J., Wang, B., Ouyang, J., et al. (2010). Expression of angiotensin II receptors in aldosterone-producing adenoma of the adrenal gland and their clinical significance. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Science*, 30(4), 486–489.
- Wu, C., Zhang, H., Zhang, J., Xie, C., Fan, C., Zhang, H., et al. (2018). Inflammation and fibrosis in perirenal adipose tissue of patients with aldosterone-producing adenoma. *Endocrinology*, 159(1), 227–237.
- Xiao, J., Shimada, M., Liu, W., Hu, D., & Matsumori, A. (2009). Anti-inflammatory effects of eplerenone on viral myocarditis. *European Journal of Heart Failure*, 11(4), 349–353.
- Yang, F.-C., Ingram, D. A., Chen, S., Zhu, Y., Yuan, J., Li, X., et al. (2008). Nf1-dependent tumors require a microenvironment containing Nf1 +/– and c-kit-dependent bone marrow. *Cell*, 135(3), 437–448.
- Ye, P., Mariniello, B., Mantero, F., Shibata, H., & Rainey, W. E. (2007). G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: A potential cause of hyperaldosteronism. *The Journal of Endocrinology*, 195(1), 39–48.
- Zeng, Z., Tang, X., Yang, D., Li, H., Zhang, R., Zeng, Q., et al. (1998). Immunoreactive endothelin-1 and its receptors in human adrenal tissues. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 31(Suppl. 1), S212–S214.
- Zennaro, M.-C., Boulkroun, S., & Fernandes-Rosa, F. (2017). Genetic causes of functional adrenocortical adenomas. *Endocrine Reviews*, 38(6), 516–537.
- Zennaro, M.-C., Fernandes-Rosa, F. L., & Boulkroun, S. (2018). Overview of aldosterone-related genetic syndromes and recent advances. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 25(3), 147–154.
- Zilbermint, M., Xekouki, P., Faucz, F. R., Berthon, A., Gkourogiani, A., Scherthaner-Reiter, M. H., et al. (2015). Primary aldosteronism and ARMC5 variants. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 100(6), E900–E909.
- Zwermann, O., Suttman, Y., Bidlingmaier, M., Beuschlein, F., & Reincke, M. (2009). Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. *European Journal of Endocrinology*, 160(3), 443–451.

RESUME

La mise en place de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes au cours du développement fœtal chez l'homme reste un processus encore non totalement élucidé, que ce soit du point de vue de la chronologie d'expression des enzymes de la stéroïdogenèse ou bien des acteurs déterminant la production d'aldostérone en période péri-natale. Chez l'adulte, la sécrétion d'aldostérone est contrôlée majoritairement par des facteurs circulants tels que le système rénine angiotensine et le potassium. L'importance des mécanismes paracrines a été plus récemment démontré, impliquant différents acteurs, dont les mastocytes intra-surrénaux situés dans la région sous-capsulaire. En effet, les produits de sécrétion mastocytaire stimulent la production d'aldostérone par l'intermédiaire de la libération de sérotonine et de l'activation des récepteurs sérotoninergiques de type 4 présents à la surface des cellules stéroïdogènes. Cependant, le rôle des mastocytes et de la voie sérotoninergique dans le développement surrénalien n'a jamais été étudié.

Dans ce travail, nous montrons que les mastocytes colonisent la surrénale fœtale vers 18 semaines d'aménorrhée (SA) dans la zone définitive de façon conjointe à l'apparition des premières cellules exprimant la 3β -hydroxystéroïde déshydrogénase. L'aldostérone synthase (CYP11B2) est détectée dans la même zone vers 24 SA, puis son expression augmente au cours du développement. De façon intéressante, nous mettons en évidence une densité mastocytaire ainsi qu'une expression de CYP11B2 plus importantes chez les fœtus comparés aux nouveau-nés de termes équivalents, suggérant l'implication des mastocytes dans le processus d'adaptation à la vie extra-utérine. Par ailleurs, nous rapportons une activation des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Shh au cours du développement surrénalien, qui ne semble pas contrôler la prolifération cellulaire. La voie Shh pourrait être associée à l'acquisition du phénotype stéroïdogène mature alors que la voie β -caténine qui est active antérieurement à l'expression de CYP11B2 ne semble pas suffisante pour initier la fonction minéralocorticoïde.

Globalement, ce travail montre la chronologie de la différenciation de la zone définitive surrénalienne au cours du développement et révèle pour la première fois la mise en place de système de régulation paracrine impliquée dans la production d'aldostérone en anté et post-natal.

Mots clefs : surrénale fœtale humaine, aldostérone, mastocyte, sérotonine, Sonic Hedgehog, β -caténine