

Université de Montréal

Élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans  
l'expression aberrante du récepteur au peptide insulino-tropique  
glucose-dépendant (GIP) dans les tumeurs du cortex de la glande  
surrénale.

Par

Antoine Lampron

Faculté de médecine

Département de sciences biomédicales

Thèse présentée à la faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctoris (Ph.D.)

En Sciences Biomédicales

4 octobre 2009

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression aberrante du récepteur au peptide insulino-tropique glucose-dépendant (GIP) dans les tumeurs du cortex de la glande surrénale.

A été évaluée par un jury composé des membres suivants :

Michèle Brochu, Président rapporteur

André Lacroix, Directeur de recherche

Isabelle Bourdeau, Co-directrice de recherche

Sophie Valette, Membre de jury

Nicole Gallo-Payet, Examineur externe

Yolanda Gutkowska, Représentant du doyen de la FES

*À Laurence,*

*Mon amour*

*Ma raison d'être*

## Remerciements

- Laurence, pour ton soutien inconditionnel et ton amour constant.
- Mes parents, Pierre et Lise, qui m'ont toujours encouragé à me surpasser et atteindre mes objectifs, quels qu'ils soient.
- Mon frère Julien, mon modèle, celui qui m'a appris tant de choses qu'on ne retrouvera jamais dans un livre.
- Véronique et Hadrien, pour tous les bons moments passés et à venir.
- La famille Harvey, qui m'a appris que ce n'est pas tout de chercher, il faut aussi trouver.
- Sylvie, la mère du 7-026, j'aimerais pouvoir un jour t'aider autant que tu l'as fait pour moi. Si j'en suis là, c'est en grande partie grâce à toi.
- Valérie, Maude, Mimi, Marcia, Audrey, Julien, Tania et tous les autres du labo, vous avez rendu ces années dans l'hôtel Dieu encore plus intéressantes.
- À tous mes amis qui m'ont aidé et soutenu au travers de cette aventure.
- Conrad Lampron et Joachin Julien, vous êtes partis beaucoup trop vite et c'est pour vous que je fais de la recherche.
- Dr Isabelle Bourdeau, pour son mentorat et la prise en compte de mes idées au cours du projet
- Dr André Lacroix, mon mentor. Travailler pour vous aura été un honneur pour moi. Merci de m'avoir donné la chance de vous montrer ce dont je suis capable, et de m'avoir poussé à le surpasser.

## Résumé

Les tumeurs du cortex surrénalien sont variées et fréquentes dans la population. Bien que des mutations aient été identifiées dans certains syndromes familiaux, les causes génétiques menant à la formation de tumeurs du cortex surrénalien ne sont encore que peu connues. Un sous-type de ces tumeurs incluent les hyperplasies macronodulaires et sont pressenties comme la voie d'entrée de la tumorigenèse du cortex surrénalien. L'événement génétique le plus fréquemment observé dans ces tumeurs est l'expression aberrante d'un ou de plusieurs récepteurs couplés aux protéines G qui contrôle la production de stéroïdes ainsi que la prolifération cellulaire. L'événement génétique menant à l'expression aberrante de ces récepteurs est encore inconnu.

En utilisant le récepteur au peptide insulinothropique dépendant du glucose (GIP) comme modèle, cette étude se propose d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression aberrante du récepteur au GIP (GIPR) dans les tumeurs du cortex surrénalien.

Une première partie clinique de cette étude se penchera sur l'identification de nouveaux cas de tumeurs surrénaliennes exprimant le GIPR de façon aberrante. Les patients étudiés seront soumis à un protocole d'investigation *in vivo* complet et les tumeurs prélevées seront étudiées extensivement *in vitro* par RT-PCR en temps réel, culture primaire des tumeurs, immunohistochimie et biopuces. Le lien entre le GIP et la physiologie normale sera également étudié de cette façon. Une autre partie de l'étude utilisera les nouvelles techniques d'investigation à grande échelle en identifiant le transcriptome de différents cas de tumeurs exprimant le GIPR de façon aberrante. L'importance fonctionnelle des gènes identifiés par ces techniques sera confirmée dans des modèles cellulaires.

Cette étude présente les premiers cas de tumeurs productrices d'aldostérone

présentant des réponses aberrantes, auparavant confinées aux tumeurs productrices de cortisol ou d'androgènes surrénaliens. Le cas probant présenté avait une production d'aldostérone sensible au GIP, le GIPR était surexprimé au niveau de l'ARNm et un fort marquage a été identifié dans la tumeur spécifiquement. Dans les surrénales normales, cette étude démontre que le GIP est impliqué dans le contrôle de la production d'aldostérone. Ces résultats ont été confirmés *in vitro*. Finalement, le profilage à grande échelle des niveaux d'expression de tous les gènes du génome a permis d'isoler une liste de gènes spécifiquement liés à la présence du GIPR dans des hyperplasies du cortex surrénalien. Cette liste inclut la périlipine, une protéine de stockage des lipides dans les adipocytes et la glande surrénale, dont l'expression est fortement réprimée dans les cas GIP-dépendant. Des études réalisées dans un modèle cellulaire démontrent que la répression de ce gène par siRNA est suffisante pour induire l'expression du récepteur au GIP et que cette protéine est impliquée dans la stimulation de la stéroïdogénèse par le GIP.

En alliant des méthodes d'investigation *in vivo* de pointe à des techniques *in vitro* avancées, cette étude offre de nouveaux regards sur les liens entre le GIP et la physiologie de la glande surrénale, que ce soit dans des conditions normales ou pathologiques.

## Abstract

Tumors of the adrenal cortex are varied and frequently found in the population. Aside from rare family cases in which mutations have been identified, the genetic events leading to the formation of adrenocortical tumors remain obscure. A subtype of these tumors includes macronodular hyperplasias, now perceived as the entry point of adrenocortical tumorigenesis. The most commonly observed molecular event in these cases is the presence of aberrantly expressed G-protein coupled receptor that drive steroid production and cellular proliferation. The genetic events leading to these aberrant levels of expression are unknown.

This study will use the Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) receptor as a model to identify the molecular mechanisms leading to the aberrant expression of the GIP receptor (GIPR) in adrenocortical tumors.

The first part of the study will be a clinical investigation of new cases of adrenocortical tumors to screen for aberrant responses to GIP in various types of these tumors. The patients will be evaluated by a thorough clinical investigation protocol and the resected tumors will be extensively analysed *in vitro*, using real-time RT-PCR, immunohistochemistry, microarray and primary cultures of the tumors. The link between GIP and the normal physiology of the adrenal cortex will also be assessed in normal subjects. The second part of the study will use novel large-scale investigation techniques to determine the transcriptome of different cases of adrenocortical tumors expressing aberrant levels of the GIPR. The functional importance of identified genes will be assessed in cellular models.

This study presents the first cases of aldosterone-producing tumors with aberrant responses to hormones, previously confined to cortisol- or androgen producing tumors. The

case presented showed an aldosterone production sensitive, among others, to GIP. The GIPR's mRNA was strongly over expressed and a specific staining was observed in immunohistochemistry. The responses were confirmed in primary cultures of the tumor. In normal adrenals, a role for the control of aldosterone by GIP was also demonstrated. Finally, large-scale profiling of the transcriptome led to the identification of a list of genes with expression levels strictly related to the presence of the GIPR in adrenocortical hyperplasias. One of these genes, perilipin, was strongly repressed specifically in GIP-dependent cases. siRNA techniques were used in a cellular model and confirmed that the repression of perilipin is sufficient to induce the expression of GIPR and that this protein is implicated in the GIP induced steroidogenesis.

Allying state-of-the-art *in vivo* investigation methods to advanced *in vitro* techniques, the present study identifies novel insights on the link between GIP and the normal adrenal physiology, in normal and pathological conditions.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>v</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>x</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>xv</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Liste des abréviations utilisées</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Partie I : INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I. La glande surrénale</b> .....	<b>1</b>
1. Anatomie et embryogenèse de la glande surrénale humaine.....	1
2. Stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien.....	4
a. Synthèse des minéralocorticoïdes.....	6
b. Synthèse des glucocorticoïdes.....	7
c. Synthèse des stéroïdes sexuels surrénaliens.....	7
3. Contrôle de la fonction surrénalienne.....	8
a. Contrôle de la synthèse des minéralocorticoïdes.....	8
• Le système Rénine-Angiotensine.....	8
• Le potassium.....	10
• L'ACTH, la sérotonine et les mécanismes dépendant de l'AMP cyclique... ..	11
• Mécanismes de régulation négative de la production d'aldostérone.....	12
b. Contrôle de la synthèse des glucocorticoïdes.....	13
• L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.....	13
• Mécanismes moléculaires de l'ACTH sur le cortex surrénalien.....	14

c.	Contrôle de la synthèse des stéroïdes sexuels .....	17
d.	Contrôle de la prolifération cellulaire dans le cortex surrénalien .....	18
4.	Rôles des stéroïdes surrénaliens dans la physiologie humaine .....	21
a.	Rôle des glucocorticoïdes .....	21
•	Effets immunologiques .....	21
•	Effets métaboliques.....	22
•	Autres effets .....	23
•	Mécanismes d'action moléculaire .....	24
b.	Rôle des minéralocorticoïdes .....	26
•	Fonction rénale.....	26
•	Fonctions non rénales.....	28
•	Mécanisme d'action moléculaire.....	29
c.	Rôles des androgènes surrénaliens.....	30
<b>II.</b>	<b>Conditions pathologiques du cortex surrénalien.....</b>	<b>31</b>
1.	Excès chronique de glucocorticoïdes: le syndrome de Cushing .....	31
a.	Pathophysiologie .....	31
b.	Syndrome de Cushing ACTH-dépendant.....	33
c.	Syndrome de Cushing ACTH-indépendant.....	35
2.	Excès chronique de minéralocorticoïdes: l'hyperaldostéronisme primaire.....	36
a.	Pathophysiologie.....	36
b.	Hyperaldostéronisme familial .....	38
c.	Tumeurs sporadiques productrices d'aldostérone.....	38
•	Adénomes producteurs d'aldostérone : le syndrome de Conn.....	38
•	Hyperplasies bilatérales idiopathiques.....	39

3.	Excès chronique d'androgènes surrénalien: syndrome de virilisation surrénalien	40
<b>III.</b>	<b>Tumorigenèse corticosurrénalienn</b>	<b>41</b>
1.	Profil génétique des tumeurs corticosurréaliennes	42
a.	Principe de clonalité	42
b.	Cytogénétique des tumeurs cortico-surréaliennes	43
2.	Syndromes de tumeurs héréditaires	44
a.	Le locus 17p13 et le gène <i>TP53</i> : syndrome de Li-Fraumeni	44
b.	Le locus 11p15 et <i>IGF2</i> : Syndrome de Beckwith-Wiedemann	45
c.	Le locus 11q13 et <i>MEN1</i> : syndrome de néoplasies endocriniennes multiples	46
d.	Le locus 17q22-24 et <i>PRKARIA</i> : Syndrome du Complexe de Carney	47
e.	<i>GNAS</i> : syndrome de McCune-Albright	48
f.	<i>CYP21A1</i> : Hyperplasies Congénitales Surréaliennes (CAH)	49
3.	Mutations somatiques et autres gènes mutés dans les tumeurs du cortex surrénalien	49
a.	Voie de Wnt/ $\beta$ -caténine	49
b.	Les phosphodiéstérases : <i>PDE11A</i> et <i>PDE8B</i>	51
c.	Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)	52
4.	Importance de l'AMPc dans les hyperplasies surréaliennes : Modèle d'initiation de la tumorigenèse cortico-surréalienn	52
<b>IV.</b>	<b>Expression aberrante de récepteurs hormonaux dans les tumeurs surréaliennes</b>	<b>55</b>
1.	Réponses aberrantes retrouvées dans des tumeurs productrices de cortisol	57
a.	GIP	57
b.	Vasopressine	59

c.	Catécholamine.....	60
d.	LH/hCG.....	61
e.	Sérotonine .....	61
f.	Angiotensine .....	62
2.	Réponses aberrantes retrouvées dans d'autres types de tumeurs cortico-surréaliennes.....	63
a.	Tumeurs productrices d'androgènes .....	63
b.	Tumeurs productrices d'aldostérone .....	63
3.	Le syndrome de Cushing GIP-dépendant .....	64
a.	Fonctions du GIP dans la physiologie normale.....	64
b.	Contrôle de l'expression génique du récepteur au GIP .....	68
c.	Mécanismes moléculaires impliqués dans le syndrome de Cushing GIP-dépendant .....	70
<b>V.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>71</b>
<b><u>Partie II : ÉNONCÉ DU PROJET DE RECHERCHE.....</u></b>		<b><u>73</u></b>
<b><u>Partie III : RÉSULTATS .....</u></b>		<b><u>75</u></b>
<b>I.</b>	<b>Réponses aberrantes dans les tumeurs productrices d'aldostérone.....</b>	<b>75</b>
1.	Situation du sujet.....	75
2.	Article 1.....	77
3.	Discussion .....	98
<b>II.</b>	<b>Rôle du GIP dans la physiologie normale du cortex surrénalien .....</b>	<b>100</b>
1.	Situation du sujet.....	100
2.	Article 2.....	101
3.	Discussion .....	120

<b>III. Profilage à grande échelle de l'expression génique dans les hyperplasies GIP-dépendantes .....</b>	<b>123</b>
1. Situation du sujet.....	123
2. Article 3.....	125
3. Discussion.....	157
<b>IV. Confirmation de l'importance d'un gene identifié par biopuce à ADN dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant.....</b>	<b>160</b>
1. Situation du sujet.....	160
2. Article 4.....	163
3. Discussion.....	182
<b><u>Partie IV : CONCLUSIONS .....</u></b>	<b><u>185</u></b>
<b><u>Partie V : DISCUSSION GÉNÉRALE .....</u></b>	<b><u>186</u></b>
<b><u>Bibliographie .....</u></b>	<b><u>194</u></b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Étiologies du syndrome de Cushing.....	33
Tableau 2 : Protocole de dépistage <i>in vivo</i> de récepteurs hormonaux aberrants dans le syndrome de Cushing surrénalien.....	76

## Liste des figures

Figure 1 : Modèle de développement embryonnaire et post-natal de la glande surrénale.....	2
Figure 2 : Anatomie de la glande surrénale mature.....	4
Figure 3 : Stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien.....	6
Figure 4 : Le système Rénine-Angiotensine de contrôle de la production d'aldostérone. ...	10
Figure 5 : Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien du contrôle de la synthèse des glucocorticoïdes .....	13
Figure 6 : Mécanisme de régulation de la stéroïdogénèse par l'ACTH.....	15
Figure 7 : Séquence des mécanismes moléculaires induits par l'ACTH dans le cortex surrénalien.....	16
Figure 8 : Modèle de différenciation et de migration centripète de cellules souches/progénitrices en cellules compétentes dans le cortex surrénalien. ....	19
Figure 9 : Stimulation de la prolifération cellulaire par l'angiotensine 2 .....	20
Figure 10 : Mécanismes d'action moléculaire des glucocorticoïdes.. .....	25
Figure 11 : Modèle des mécanismes d'activation transcriptionnelle de l'aldostérone sur la fonction des canaux ENaC .....	27
Figure 12 : Différentes étiologies du syndrome de Cushing.....	35
Figure 13 : Voie de signalisation canonique de WNT/ $\beta$ -caténine.....	51
Figure 14 : Aberrations de la voie de signalisation de l'AMPc dans les tumeurs cortico-surréaliennes.....	54
Figure 15 : Modèle de transplantation de cellules cortico surréaliennes menant à la formation de tissus transgéniques ACTH-dépendant et la formation de tumeurs induite par le GIP .....	59
Figure 16 : Différentes fonctions physiologiques du GIP.....	68

Figure 17 : Modèle de progression des évènements génétiques menant à la formation de tumeurs cortico-surréaliennes surexprimant un GPCR.....	71
Figure 18 : Schéma fonctionnel de l'étude de profilage génique à grande échelle.....	124
Figure 19 : Relations possibles entre les gènes candidates identifiés par biopuces et l'expression aberrante du GIPR .....	161

## Liste des abréviations utilisées

3 $\beta$ HSD = 3 $\beta$  Hydroxystéroïde deshydrogénase

5HT4 = Sérotonine 4, sous-type de récepteur de la sérotonine

ACE = Enzyme de conversion de l'angiotensinogène

ACTH = Hormone adrenocorticotropique

AIMAH = Hyperplasie surrénalienne bilatérale indépendant de l'ACTH

AMPc = Adénosine monophosphate cyclique

ANG2 = Angiotensine 2

ANP = Peptide natriurétique de l'oreillette

APA = Adénome producteur d'aldostérone

AVP = Arginine vasopressine

CaMK = Calmoduline kinase

CGH = Hybridation génomique comparative

CNC = Syndrome de néoplasies multiples du complexe de Carney

CRH = Hormone de relâche de la corticotropine

CYP11A1 = Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol

CYP11B1 = 11 $\beta$ -hydroxylase

CYP17 = 17 $\alpha$ -hydroxylase

CYP21 = 21-hydroxylase

DHEA = Déhydroépiandrostènedione

DHEA-S = DHEA sulfate

ENaC = Canal sodique épithélial

G6P = Glucose-6-phosphatase

GILZ = gène à tirette de leucine induite par les glucocorticoïdes

GIP = Peptide insulino-tropique dépendant du glucose

GIPR = Récepteur au GIP

GLP1 = peptide glucagon-like de type 1

GNAS = Sous-unité  $\alpha$  des protéines G

GR = Récepteur aux glucocorticoïdes

GRE = Élément de réponse aux glucocorticoïdes

HAP = Hyperaldostéronisme primaire

hCG = Hormone chorionique gonadotrope humaine

HF = Hyperaldostéronisme familiale

HHS = Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien

HRE = Élément de réponse aux hormones

HSL = Lipase hormono-sensible

IHA = Hyperaldostéronisme primaire secondaire à une hyperplasie bilatérale idiopathique des surrénales

IP3 = Inositol triphosphate

LH = Hormone lutéale

LOH = Perte d'hétérozygotie

MC2R = Récepteur à mélanocortine de type 2 (récepteur à ACTH)

MEN1 = Syndrome de néoplasies multiples endocriniennes de type 1, Gène de la ménine

MKP1 = Phosphate à spécificité multiple de type 1

MR = Récepteur aux minéralocorticoïdes

Nedd4-2 = Gène similaire au gène exprimé dans les précurseurs neuronaux, réprimé dans le

développement de type 4.

NO = Oxyde nitreux

PAI1 = Inhibiteur de l'activateur plasminogénique de type 1

PEPCK = Phosphoénolpyruvate carboxykynase

PKA = Protéine kinase A (Protéine kinase dépendante de l'AMPc)

PLIN = Périlipine

PPNAD = Maladie surrénalienne de nodules primaires pigmentés

PRKAR1A = Sous-unité régulatrice 1 $\alpha$  de la protéine kinase A

SF1 = Facteur de transcription stéroïdogénique de type 1

SGK1 = Kinase régulée par les glucocorticoïdes et le sérum de type 1

siRNA = Petits ARN d'interférence

StAR = Protéine de régulation aigue de la stéroïdogénèse

SULT2A1 = Sulfotransférase 2 de type A 1

$\beta$ -AR = Récepteur  $\beta$ -adrénergique

VEGF = Facteur de croissance vasculaire endothélial

## **Partie I : INTRODUCTION**

### **I. La glande surrénale**

Les glandes surrénales sont des organes endocriniens importants impliqués dans le contrôle du développement embryonnaire, de la réponse au stress ainsi que de la pression artérielle. Sous un contrôle important et complexe, la production des hormones surrénales est essentielle à l'homéostasie de l'ensemble de l'organisme.

#### **1. Anatomie et embryogenèse de la glande surrénale humaine**

Les mammifères possèdent deux glandes surrénales situées chacune au pôle supérieur des reins. De forme pyramidale, la glande surrénale pèse entre 4 et 6 grammes chez un adulte normal. Entourée d'une capsule de fibroblastes et collagène, la glande surrénale est composée de deux parties distinctes d'origines embryonnaires différentes : la médulla et le cortex (1). Celles-ci possèdent des caractéristiques physiologiques et histologiques spécifiques. La médulla est composée en grande partie de cellules chromaffines issues de la crête neurale lors de l'embryogenèse. Leur fonction principale est de produire et de relâcher dans la circulation les catécholamines adrénaline et noradrénaline. La présente étude se concentrera toutefois sur la partie externe de la glande surrénale, le cortex. Celui-ci provient de cellules du mésenchyme de la cavité coelomique bordant la membrane urogénitale. La surrénale fœtale peut être observée au deuxième mois du développement embryonnaire. C'est à ce moment que les cellules neuroectodermes

envahissent les cellules corticales menant à la formation de la medulla. Au deuxième trimestre de gestation, la zone définitive qui formera le cortex se différencie de la zone fœtale qui représente la majorité de la surrénale fœtale, plus grande que les reins à ce stade. La zone fœtale régresse rapidement à la naissance et disparaît à la fin de la première année de vie. C'est au cours de cette année que la zone définitive se différencie en trois zones fonctionnelles caractéristiques du cortex surrénalien adulte (2).

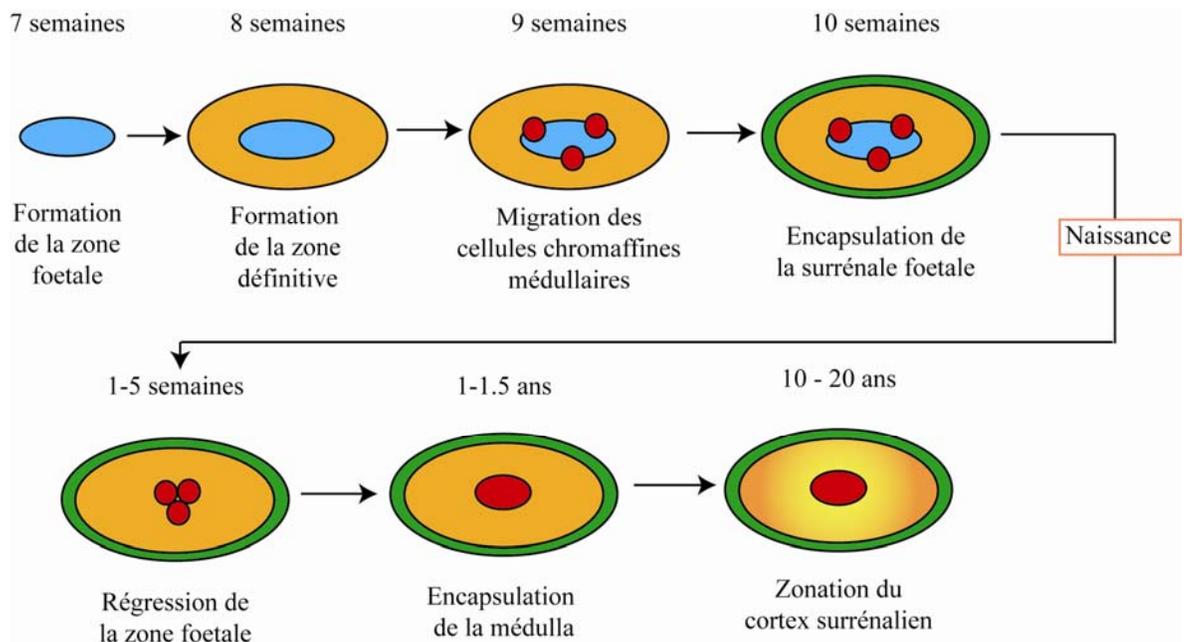
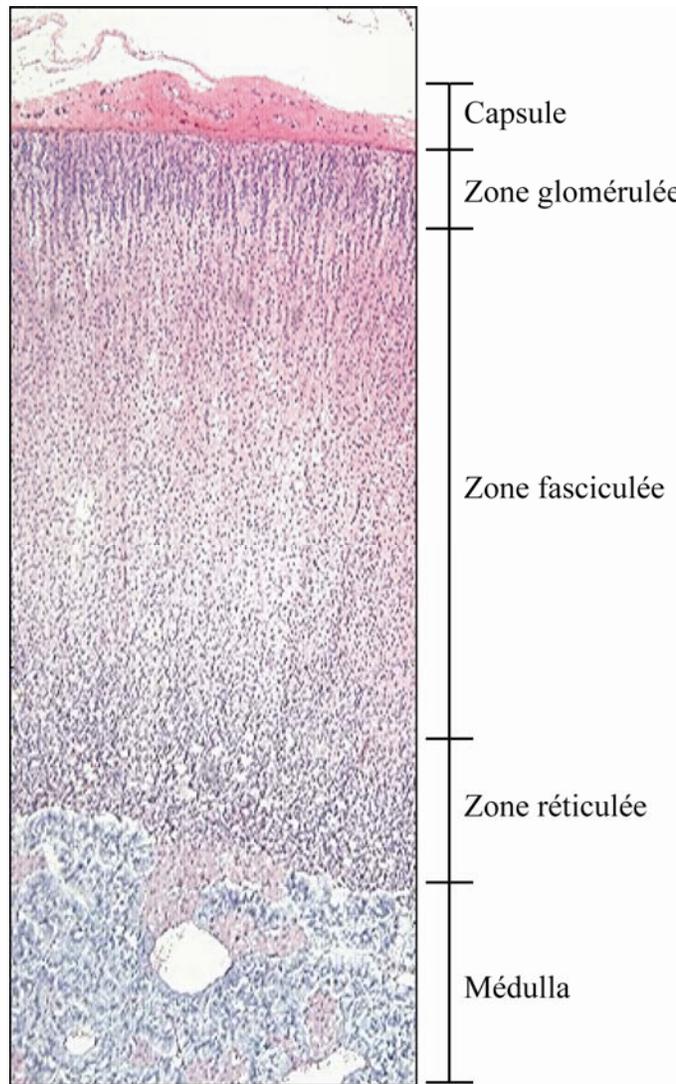


Figure 1 : Modèle de développement embryonnaire et post-natal de la glande surrénale

(Adapté de Hammer et al, Endocrinology, 2005, (2))

À maturité, le cortex est formé de trois types cellulaires distincts arrangés en couches superposées (voir Figure 2). En périphérie, on retrouve la zone glomérulée, composée de petites cellules faiblement démarquées en arrangements sphériques. Cette zone constitue environ 15 % de la masse surrénalienne et est le site de production des minéralocorticoïdes, dont le principal est l'aldostérone. En dessous de cette zone se trouve

la zone fasciculée composée de cellules en faisceaux parallèles. C'est le site de production des glucocorticoïdes, en majorité le cortisol chez l'humain. Représentant plus de 75 % du cortex, les cellules de cette zone possèdent un plus grand ratio cytoplasme/noyau, avec de nombreuses inclusions lipidiques. Ces cellules sont arrangées en cordons serrés et bien organisés. La démarcation entre cette zone et la zone glomérulée peut être floue, avec des cellules de la fasciculée pouvant envahir la zone glomérulée jusqu'à la capsule. La dernière zone bordant la médulla est la zone réticulée, site de production des androgènes surrénaliens dont les plus importants sont la déhydroépiandrostérone (DHEA). Bien que ce stéroïde soit également produit dans la zone fasciculée, seules les cellules de la zone réticulée peuvent produire la forme sulfatée active du DHEA. La démarcation entre la zone réticulée et ses zones voisines est plus franche. Ces cellules sont organisées en cordons irréguliers en anastomose. La démarcation des différentes zones de la glande surrénale est facilement observable avec les techniques d'histologie classiques (voir Figure 2) (1). Les rats et souris possèdent en plus une zone intermédiaire (ou « zone X ») entre la zone réticulée et la médulla (3). En absence de l'expression d'enzymes de stéroïdogénèse (4), les fonctions de cette zone ne sont que peu connues, bien que des données suggèrent que cette zone pourrait contenir des cellules avec un grand pouvoir prolifératif, potentiellement des précurseurs des cellules des autres zones (5).



*Figure 2 : Anatomie de la glande surrénale mature*

## 2. Stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien

Les stéroïdes sont une famille de composés dérivés d'une même structure de base (trois cyclohexanes et un cyclopentane) conservée largement dans les royaumes animaux et végétaux. La spécificité de leurs actions diverses provient des modifications apportées à ce noyau central par différentes enzymes (désaturation de liens carbone-carbone, ajout de groupes cétones, hydroxyles ou autres). Chez les mammifères, ce noyau est fourni par le

cholestérol. Dans la glande surrénale, le cholestérol peut être synthétisé *de novo* par les cellules surréaliennes mais provient en majorité des lipoprotéines plasmatiques internalisées par un mécanisme de récepteurs membranaires (6). Le cholestérol est ensuite modifié par une batterie d'enzymes dérivées de la famille des cytochromes P450. Quatre enzymes principales catalysent les réactions les plus importantes. La réaction limitante de cette voie de synthèse est la translocation du cholestérol à la membrane mitochondriale interne qui est médiée par la protéine de régulation aiguë de stéroïdogénèse (StAR, voir point I.3.b). L'enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (CYP11A1) transforme alors le cholestérol en pregnénolone, précurseur des stéroïdes surréaliens. Cette enzyme est commune à toutes les cellules du cortex. La modification de la pregnénolone détermine donc le type de stéroïdes produits par les différentes zones du cortex (voir Figure 3)(1).

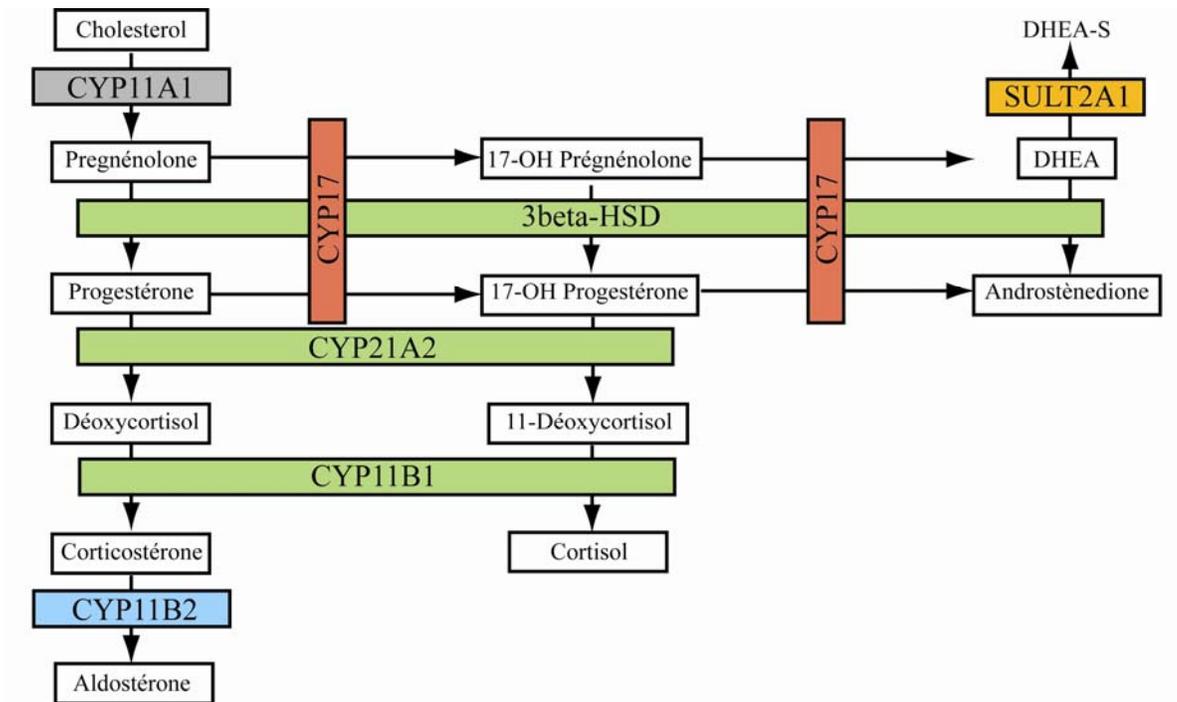


Figure 3 : Stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien. Boite grise : Enzyme ubiquitaire  
 Boites vertes : enzymes exprimées dans toutes les zones du cortex. Boites rouges : Enzymes exprimées dans la zone fasciculée. Boite bleue : Enzyme exprimée uniquement dans la glomérulée. Boite jaune : Enzyme exprimée uniquement dans la zone réticulée

### a. Synthèse des minéralocorticoïdes

Les minéralocorticoïdes sont synthétisés exclusivement dans la zone glomérulée. Les cellules de cette zone n'expriment pas la  $17\alpha$ -hydroxylase (CYP17), ce qui pousse la pregnénolone à être transformée en corticostérone par la  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase ( $3\beta$ -HSD), la 21 hydroxylase (CYP21) et la  $11\beta$ -hydroxylase (CYP11B1). La conversion de corticostérone en aldostérone, principal minéralocorticoïde, est effectuée par l'aldostérone synthétase (CYP11B2) qui n'est exprimée que dans les cellules de la zone

glomérulée (1).

### b. Synthèse des glucocorticoïdes

La production de glucocorticoïdes est assurée par la zone fasciculée. Les cellules de cette zone expriment la  $17\alpha$ -hydroxylase ce qui permet la conversion de la pregnénolone en 17 hydroxy-pregnénolone. Ce précurseur peut alors emprunter la voie de synthèse du cortisol, glucocorticoïde majeur chez l'humain. Les cellules fasciculées n'expriment pas l'enzyme CYP11B2, ce qui empêche leur production d'aldostérone. Les rongeurs ne possèdent pas l'enzyme CYP17. C'est donc la corticostérone qui est le glucocorticoïde majeur dans ces espèces (1).

### c. Synthèse des stéroïdes sexuels surrénaliens

Les stéroïdes sexuels sont produits en majorité par les gonades. La glande surrénale produit toutefois des androgènes : la DHEA et sa forme sulfatée DHEA-S ainsi que de l'androstenedione, un précurseur de la testostérone. La production d'œstrogènes par la surrénale est trop faible pour avoir un impact physiologique. Les cellules de la zone réticulée ont leur spécificité fonctionnelle assurée par la perte d'expression de la  $3\beta$ -HSD, ce qui empêche la production des autres stéroïdes surrénaliens. La DHEA est produite par les zones réticulée et fasciculée mais seules les cellules de la réticulée expriment la sulfatase SULT2A1 nécessaire à la production de DHEA-S (1).

### 3. Contrôle de la fonction surrénalienne

Occupant des rôles physiologiques capitaux, les stéroïdes surrénaliens ont un contrôle strict de leurs niveaux de production. Tel qu'illustré précédemment, le contrôle de leur site de production dépend en grande partie des profils d'expression différentiels de chaque enzyme stéroïdogénique. Chaque zone du cortex possède également différentes voies de signalisation contrôlant la quantité de stéroïdes produits.

#### a. Contrôle de la synthèse des minéralocorticoïdes

- *Le système Rénine-Angiotensine*

La sécrétion d'aldostérone est contrôlée principalement par le système rénine-angiotensine (voir Figure 4). Le produit de ce système, l'angiotensine II (Ang2), agit directement sur les cellules de la zone glomérulée en se liant à un récepteur membranaire couplé aux protéines G, exprimé exclusivement par les cellules glomérulées. La production d'Ang2 se fait par le clivage enzymatique du précurseur angiotensinogène par la rénine dans le foie. Le produit de cette réaction (Ang-1) est ensuite coupé une fois de plus, par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), produisant l'ANG2 mature (7). Au niveau moléculaire, la liaison d'Ang2 à son récepteur (AG2R) active la voie de la phospholipase C qui, par l'entremise de l'inositol 3-phosphate et le 3,4-diacylglycérol, entraîne une hausse de la concentration intracellulaire de calcium. Cette hausse de calcium cytoplasmique provient de la relâche des stocks du reticulum endoplasmique dans le cytoplasme et du milieu extracellulaire *via* des canaux stimulés par l'IP3. Elle initie l'étape limitante de la stéroïdogénèse, le transfert du cholestérol à la membrane mitochondriale (8). Le reste de la

voie de synthèse de l'aldostérone suit son cours selon les enzymes exprimées dans la zone glomérulée.

Les niveaux de rénine, produite par les cellules juxtaglomérulaires du cortex rénal, sont le facteur limitant dans le système rénine-angiotensine. L'innervation sympathique rénale, les changements de la pression artérielle rénale ainsi que la mesure des changements en taux de sodium circulant par la macula densa du cortex rénal sont les principaux stimulateurs de la production de rénine. Ainsi, les facteurs menant à une diminution de l'afflux sanguin des reins comme les hémorragies, la déshydratation, la diminution des concentrations en sel, la position debout ou la vasoconstriction rénale, mènent tous à des niveaux élevés de rénine. À l'inverse, les facteurs qui augmentent la pression sanguine tels que les vasoconstricteurs périphériques, la position couchée ou l'augmentation des concentrations de sel, inhibent la production de rénine. L'Ang2 est également en mesure de diminuer la production de rénine, assurant un mécanisme de rétrocontrôle négatif. En effet, l'Ang2 agit directement sur les cellules juxtaglomérulaires dans le rein pour activer la relâche de calcium des réserves intracellulaires dans le cytoplasme. Cette hausse de calcium intracellulaire diminue les niveaux d'AMPC, et donc la relâche de rénine par ces cellules (9).

Plusieurs études ont également détecté la présence d'un système rénine-angiotensine actif dans les glandes surrénales. Les cellules de la zone glomérulée peuvent en effet produire de la rénine et de l'Ang2 et l'expression de rénine et d'angiotensinogène a été mesurée dans les cellules chromaffines dispersées dans le cortex surrénalien, indiquant la présence de mécanismes paracrines et autocrines de contrôle de la sécrétion d'aldostérone. L'importance physiologique de ce mécanisme reste toutefois à être déterminée vis-à-vis du système initié par la production rénale de rénine (10).

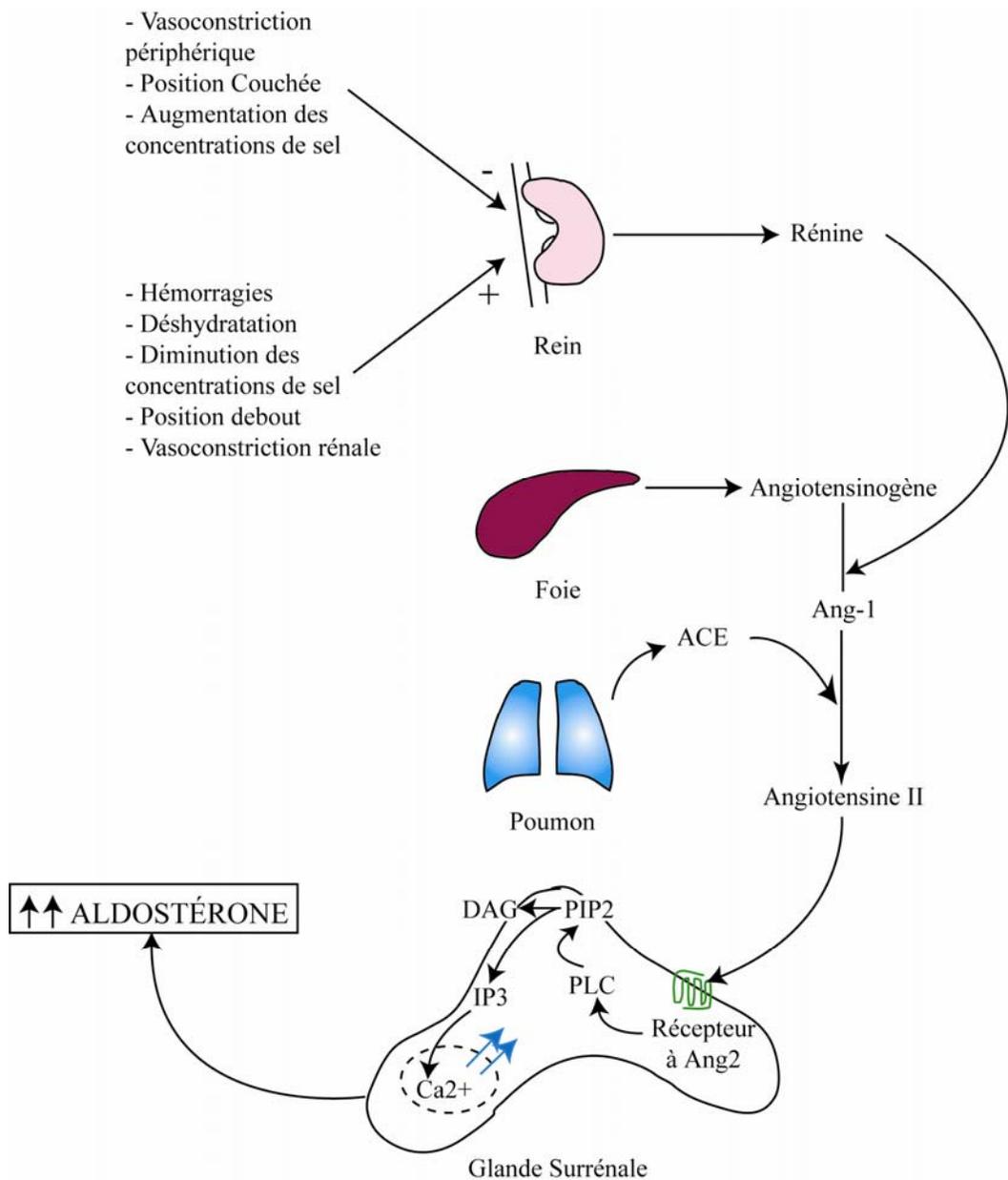


Figure 4 : Le système Rénine-Angiotensine de contrôle de la production d'aldostérone.

Adaptée de différentes sources (7, 8, 10)

- *Le potassium*

Les cellules de la zone glomérulée possèdent une sensibilité remarquable pour la concentration en potassium circulant. Des changements minimes de l'ordre de 0.1mM dans

ce taux peuvent initier une hausse de la production d'aldostérone de 35 %. Bien que cette forte sensibilité ne soit pas encore bien comprise, il est connu qu'une hausse du taux sérique de potassium mène à la dépolarisation de la membrane cytoplasmique des cellules de la zone glomérulée, ce qui entraîne l'activation de canaux calciques voltage-dépendant de type T. L'influx de calcium intracellulaire induit ensuite la production de stéroïdes tel que présenté dans le point précédent. Les cellules des autres zones du cortex ne sont pas sensibles au potassium. Cette stimulation de la production d'aldostérone par le potassium est en fait un état d'équilibre, l'aldostérone stimulant la réabsorption rénale de potassium, menant éventuellement à la diminution des taux sanguins de potassium (10).

- *L'ACTH, la sérotonine et les mécanismes dépendant de l'AMP cyclique*

La zone glomérulée exprime également des récepteurs fonctionnels couplés à la production d'AMPc tels que ceux pour l'ACTH et la sérotonine. Les processus de contrôle de la sécrétion de stéroïdes par l'ACTH seront traités en détail dans le point I.3.b. Il faut noter cependant que les mécanismes importants pour le contrôle de la synthèse de cortisol dans la zone fasciculée par l'ACTH (Activation de StAR, mobilisation du cholestérol intracellulaire...) sont également actifs dans la zone glomérulée. L'importance physiologique de l'ACTH dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone est minoritaire en comparaison aux mécanismes dépendant de l'ANG2 et du potassium (10). L'AMPc peut également activer des canaux calciques de type L ainsi que les calmoduline kinase (CaMK). La CaMK, comme PKA, pourrait aussi activer la protéine StAR à travers un intermédiaire encore inconnu, en activant probablement sa transcription (11). De plus, la CaMK pourrait être impliquée dans le contrôle de la production de l'aldostérone synthétase (CYP11B2) en

modulant l'activité des facteurs de transcription NGFIB et Nurr1 (12, 13). La protéine kinase A (PKA), sensible à l'AMPc, peut également augmenter le taux de calcium intracellulaire par l'inositol triphosphate (IP3) en activant les canaux calciques du reticulum endoplasmique (14).

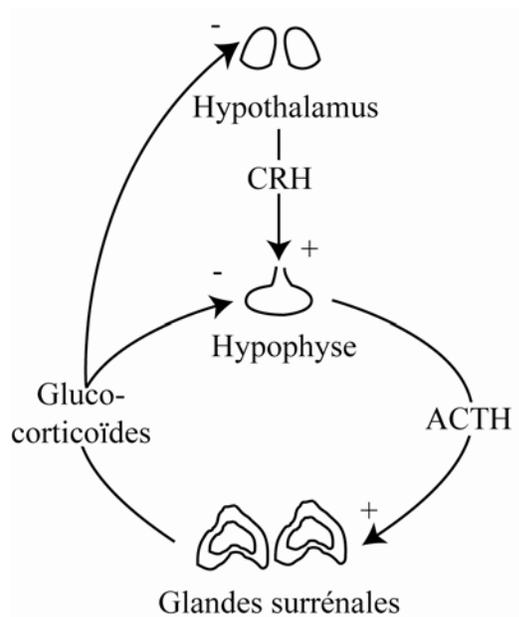
- *Mécanismes de régulation négative de la production d'aldostérone*

Plusieurs mécanismes existent également pour diminuer la concentration d'aldostérone circulante. Le peptide natriurétique auriculaire (ANP) et la dopamine sont les deux principaux facteurs actifs sur la zone glomérulée. L'ANP agit en inhibant l'influx de calcium intracellulaire induit par l'Ang2, l'ACTH et le potassium. Il a également une fonction rénale, inhibant la production de rénine. La répression chronique par l'ANP de la signalisation de l'Ang2 et d'ACTH mène également à une atrophie de la zone glomérulée. C'est un peptide sécrété par le cœur et sa production est sensible à la teneur en sodium et au volume sanguin. La dopamine est un autre régulateur négatif de la production d'aldostérone. Elle agit directement sur les cellules de la zone glomérulée en se liant à son récepteur de type D1. La répression par la dopamine est indépendante de la stimulation par l'Ang2, l'ACTH et le potassium, activant des voies de signalisation différentes. Les endothélines sont une autre famille de protéines pouvant inhiber la production d'aldostérone (10, 15-17).

## b. Contrôle de la synthèse des glucocorticoïdes

- *L'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien*

Le contrôle de la synthèse de glucocorticoïdes est assuré en très grande partie par des interactions entre l'hypothalamus, l'hypophyse et le cortex surrénalien : l'axe endocrinien hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS, voir Figure 5). Brièvement, l'hormone de relâche de la corticotropine (CRH) et l'arginine vasopressine (AVP), produites par l'hypothalamus, stimulent la production de l'hormone adrenocorticotropique (ACTH). L'ACTH est le principal régulateur de la production de glucocorticoïdes dans le cortex surrénalien. La hausse de stéroïdes qui s'en suit a un effet de rétrocontrôle négatif sur la production de CRH et d'ACTH. La sécrétion d'ACTH se fait de façon pulsatile. Les hausses brèves et accrues d'ACTH produisent une hausse de cortisol plasmatique qui exerce alors une rétroaction négative sur le CRH et sur la concentration d'ACTH circulant.



*Figure 5 : Axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien du contrôle de la synthèse des glucocorticoïdes*

La clairance du cortisol plasmatique se fait quant à elle plus lentement. L'activité de l'axe suit un rythme circadien en réponse aux changements de périodes de sommeil et de réveil. Les pics d'ACTH augmentent en amplitude et non en fréquence après trois à cinq heures de sommeil. Ils atteignent une amplitude maximale aux moments entourant le réveil. Les niveaux d'ACTH et de cortisol circulants sont donc à leur pic au réveil et diminuent au cours de la journée pour être très bas en soirée et à leur nadir deux heures après le sommeil. Les mécanismes contrôlant le maintien de ce rythme sont peu connus, bien que des neurones et fibres nerveuses du noyau supra-chiasmatique et de l'hypothalamus soient capitaux pour le contrôle circadien. Au delà du cycle circadien, la première fonction de l'axe HHS est de contrôler la réponse au stress, qui inclut les traumatismes sévères, les brûlures, les chirurgies, l'hypoglycémie, la fièvre, l'exercice et l'exposition au froid. Le stress agit sur l'hypothalamus de différentes façons. Par exemple, l'hypoglycémie a un effet direct sur l'hypothalamus médian et stimule la sécrétion de CRH, la fièvre et les infections pourraient augmenter la sécrétion de CRH *via* les interleukines relâchées par le système immunitaire (1).

- *Mécanismes moléculaires de l'ACTH sur le cortex surrénalien*

Le premier effet de l'ACTH sur le cortex surrénalien est d'augmenter la production et la relâche de cortisol. Cette action est médiée par le récepteur à ACTH (récepteur à mélanocortine 2, MC2R), un récepteur à sept passages transmembranaires, couplé aux protéines G. Cette activation du récepteur mène à l'accumulation d'AMPc dans la cellule qui ensuite active la protéine kinase A (PKA) (18). Cette kinase phosphoryle de nombreuses cibles, en particulier la protéine de régulation aiguë de la stéroïdogénèse (StAR). Cette

protéine active la translocation du cholestérol à la membrane mitochondriale pour être converti en  $\Delta^5$ -pregnénolone, l'étape limitante de la biosynthèse du cortisol (19). Ce mécanisme d'activation est rapide et puissant, observable quelques minutes après stimulation par l'ACTH (20) (voir Figure 6)

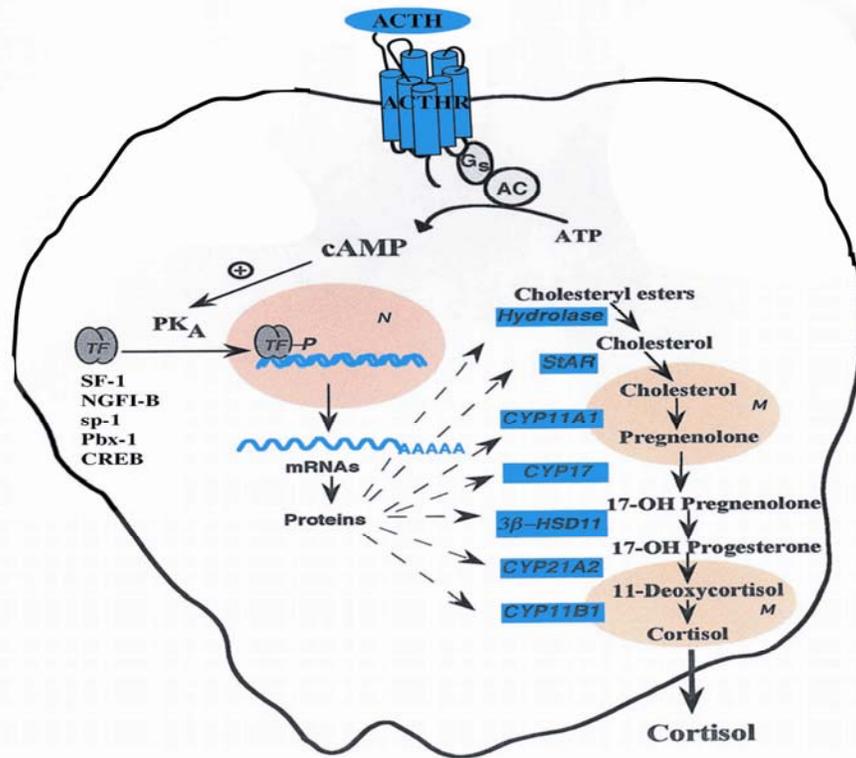
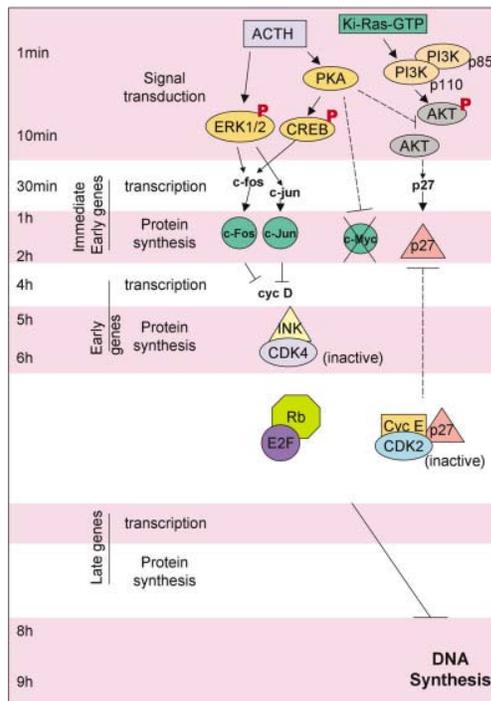


Figure 6 : Mécanisme de régulation de la stéroïdogénèse par l'ACTH

(Adapté de Lacroix et al., 2001 (21))

À plus long terme, l'ACTH peut également stimuler l'expression d'ARN messagers codant pour les protéines essentielles de la biosynthèse de cortisol, notamment les enzymes CYP11A1, CYP17, CYP21A2 et CYP11B1. Ces effets sont également dépendant de l'AMPc mais relativement peu connus (22) et impliquent différentes voies de signalisation (voir Figure 7). Ils impliquent la phosphorylation de nombreuses protéines, notamment la phosphatase activée par les mitogènes (MKP-1) qui régule l'activité du facteur de

transcription stéroïdogénique 1 (SF1), principal coordonnateur de l'expression des enzymes de stéroïdogénèse. De plus, l'inhibition de la synthèse de protéines par la cycloheximide empêche l'ACTH d'augmenter les niveaux d'expression de ces enzymes. La production d'une protéine intermédiaire activant l'expression des différents gènes mentionnés est donc nécessaire (23). En plus de ses effets sur la stéroïdogénèse, l'ACTH est le principal facteur trophique du cortex surrénalien. Il assure la prolifération cellulaire et le maintien de la survie cellulaire. En absence d'ACTH, le cortex surrénalien s'atrophie par mort cellulaire. En excès d'ACTH, le cortex devient diffusément hyperplasique et peut éventuellement mener à la formation d'hyperplasies nodulaire (24).



*Figure 7 : Séquence des mécanismes moléculaires induits par l'ACTH dans le cortex surrénalien*

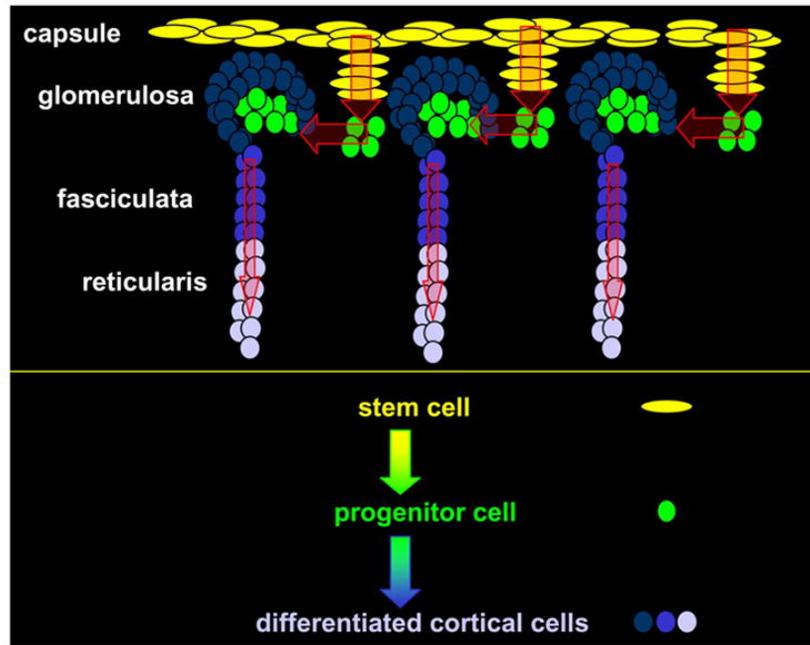
*(Tiré de Rocha et al, 2003 (25))*

### c. Contrôle de la synthèse des stéroïdes sexuels

Les mécanismes de contrôle de la synthèse des stéroïdes sexuels produits par la glande surrénale sont beaucoup moins étudiés que ceux pour la synthèse de glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. L'ACTH est un facteur important dans le contrôle des niveaux d'androgènes produits par le cortex surrénalien (DHEA, DHEA-S, testostérone et androstènedione), tel que le montre le parallélisme entre les concentrations circulantes de DHEA, de testostérone et d'androstènedione et celles de cortisol selon un rythme circadien. Ayant une demie-vie beaucoup plus longue, le DHEA-S ne suit pas le même rythme. La stimulation par l'ACTH est relativement peu efficace alors que seule une stimulation chronique peut influencer les niveaux de ces androgènes. La diminution des niveaux d'ACTH circulant par l'administration de dexaméthasone réprime fortement la production de ces androgènes mais cette répression n'est pas complète. De plus, la stimulation par l'ACTH chez des rats sans hypophyse rétablit des niveaux normaux de cortisol mais pas de DHEA. Suite à ces observations, l'existence d'un facteur hypophysaire de stimulation des androgènes a été suggérée mais pas encore démontrée chez l'humain (26, 27). Au niveau du cortex surrénalien, la protéine Seladin-1, une enzyme catalysant la production de cholestérol à partir du desmostérol (28), a été suggérée comme étant un facteur important dans la production de DHEA dépendante de l'ACTH (29). Exprimée fortement dans tout le cortex surrénalien, cette protéine est induite par l'ACTH. L'inhibition de cette protéine n'a aucun effet sur la production de cortisol ACTH-dépendante mais abolie la production de DHEA induite par l'ACTH (29).

#### d. Contrôle de la prolifération cellulaire dans le cortex surrénalien

Il a été mentionné au point I.1 l'existence d'un foyer de cellules possédant un fort potentiel prolifératif. Chez l'humain, de plus en plus de données suggèrent que des niches de cellules précurseurs existent au sein ou en périphérie de la capsule. Ces cellules, sous l'influence de facteurs trophiques comme l'ACTH, pourraient se différencier en cellules de la zone glomérulée et, par migration centripète, se différencieraient par la suite en cellules de la zone fasciculée puis réticulée (voir Figure 8). C'est à l'interface réticulée-medulla qu'on retrouverait les foyers d'apoptose et de sénescence. Au niveau moléculaire, cet effet est initié principalement par la stimulation de l' $\alpha$ -inhibin par l'ACTH *via* les facteurs de transcription SF-1 et Dax1 et la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténin (30, 31). L'ACTH exerce ces fonctions principalement à travers l'AMPC et la stimulation subséquente de la PKA. La suite de la voie de signalisation serait à travers les MAP kinases P42/44, les kinases N-terminal c-Jun et les kinases de protéines activées par le stress (SAPK) (32-34) et nécessiterait l'apport de protéines de la matrice cellulaire et d'intégrines (35). Ces MAP kinases sont responsables de la stimulation, de la prolifération, de l'hypertrophie et de la différenciation des cellules.



*Figure 8 : Modèle de différenciation et de migration centripète de cellules souches/progénitrices en cellules compétentes dans le cortex surrénalien.*

*(Tiré de Kim et al, 2007 (30))*

Les cellules de la zone glomérulée ont elles aussi un fort potentiel prolifératif. En plus de l'ACTH, l'Ang2 constitue pour ces cellules un autre facteur de croissance. Pour ce faire, l'Ang2 stimule également le récepteur AT-1, mais emprunte une autre voie de signalisation que la PLC, celle des MAP kinase ERK1 et ERK2. Toutefois, l'action prolifératrice induite par Ang2 nécessite la participation de protéines du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, notamment de la famille des Rho-GTPase et de celles des intégrines (36).

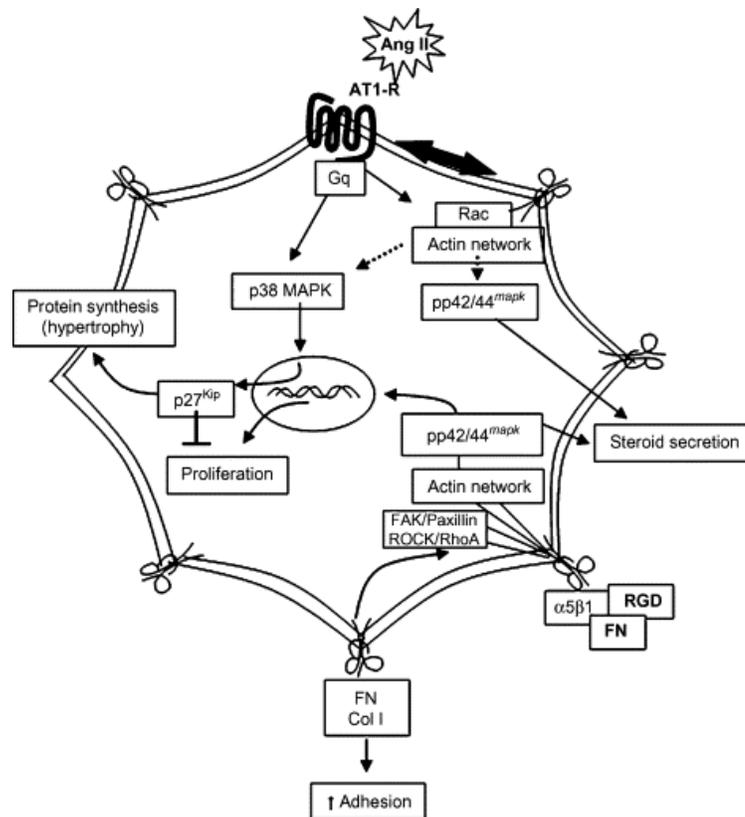


Figure 9 : Stimulation de la prolifération cellulaire par l'angiotensine 2

(Tirée de Otis et al, 2007 (36))

En plus des cellules stéroïdogéniques, la glande surrénale possède un réseau vasculaire dense qui facilite la relâche rapide des hormones stéroïdiennes dans la circulation sanguine. Le sang arrive dans les glandes surrénales par l'aorte ventrale et l'artère rénale. Ces artères se ramifient ensuite en capillaires qui restent en contact serré avec les cellules stéroïdogéniques (37). Le maintien de ce réseau très dense est assuré par de hauts niveaux du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (38). Les niveaux élevés de VEGF persistent à travers l'âge adulte et sont inducibles par l'ACTH via un mécanisme post traductionnel (39). La répression de l'ACTH *in vivo* par de la dexaméthasone diminue dramatiquement la quantité de VEGF produite par la surrénale. Il en résulte une désorganisation et une déstabilisation du réseau vasculaire, qui entraîne une

involution rapide de la zone fasciculée par des mécanismes apoptotiques (40). Ainsi, il est proposé que l'ACTH puisse également contrôler la viabilité des cellules stéroïdiennes du cortex surrénalien par un mécanisme indirect impliquant VEGF et la vascularisation (37).

#### 4. Rôles des stéroïdes surrénaliens dans la physiologie humaine

##### a. Rôle des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes tiennent leur nom de l'effet qu'ils ont sur le métabolisme des glucides. Ils exercent toutefois un effet sur presque tous les processus d'homéostasie et il est difficile de définir en un seul thème quel est le rôle physiologique des glucocorticoïdes. Ces hormones sont largement utilisées en clinique, en particulier pour leurs effets anti-inflammatoires et sur le système immunitaire.

- *Effets immunologiques*

Utilisés pour traiter un large éventail de maladies liées à des problèmes d'auto-immunité, les glucocorticoïdes ont globalement un effet immunosuppresseur. Ils agissent par différents moyens sur le système immunitaire et il est difficile de déterminer lequel est le plus important à la modulation immunitaire. Un effet primordial de cette action est de diminuer le nombre de cellules immunitaires actives (monocytes, macrophages, lymphocyte T, granulocytes et fibroblastes). Les glucocorticoïdes peuvent en effet redistribuer ces cellules dans le corps, en dirigeant par exemple les lymphocytes T des compartiments intra-vasculaires vers les nodules lymphatiques, la rate et la moelle osseuse.

Ils redistribuent également les cellules polynucléaires neutrophiles en diminuant leur nombre au niveau des sites d'inflammation. Les glucocorticoïdes peuvent de plus activer les programmes de mort cellulaire dans les lymphocytes et diminuent la prolifération cellulaire des fibroblastes. Les autres effets des glucocorticoïdes consistent surtout à diminuer la production et l'activité de nombreuses cytokines et autres messagers pro-inflammatoires tels que les interleukines 1, 2 et 6, les prostaglandines et la fibronectine (1).

- *Effets métaboliques*

En plus de leurs effets sur le système immunitaire, les glucocorticoïdes agissent sur les processus métaboliques à presque tous les niveaux : métabolisme du glycogène, gluconéogenèse, métabolisme des lipides ainsi qu'au niveau de l'utilisation périphérique du glucose. Les rôles des stéroïdes au niveau métabolique ont été mis en évidence par l'incapacité de souris surrénalectomisées à maintenir des taux de glycogène hépatique normaux. Les glucocorticoïdes activent la glycogène synthétase en stimulant sa déphosphorylation et inactivent l'enzyme de dégradation du glycogène : la glycogène phosphorylase. Au niveau de la gluconéogenèse, les glucocorticoïdes activent directement la production de glucose hépatique en stimulant les niveaux d'expression des enzymes clés de cette voie métabolique : la glucose-6-phosphatase (G6P) et la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Ils stimulent également la gluconéogenèse indirectement en augmentant la disponibilité des substrats, activant la relâche d'acides aminés gluconogéniques par les organes périphériques. Dans ces organes périphériques (en particulier les muscles squelettiques), les glucocorticoïdes diminuent également la quantité de glucose internalisé en diminuant l'efficacité du transport actif de glucose *via* la répression de l'expression des transporteurs de glucose. Les glucocorticoïdes sont en plus

de puissants activateurs de la lipolyse dans le tissu adipeux. Ils agissent sur ce tissu en augmentant la sensibilité des adipocytes à d'autres agents lipolytiques tels que les catécholamines et l'hormone de croissance. Un autre effet de ces stéroïdes sur le tissu adipeux est au niveau de la répartition des dépôts lipidiques dans le corps, particulièrement observable dans les cas de stimulation chronique par les glucocorticoïdes (syndrome de Cushing, voir point II.1), bien que le mécanisme exact de cet effet ne soit pas encore connu (1). Les glucocorticoïdes peuvent également mobiliser des acides aminés extrahépatiques pour stimuler la gluconéogenèse. En diminuant la synthèse de protéine, ces stéroïdes peuvent avoir un effet néfaste sur les muscles squelettiques et cardiaque s'ils se trouvent en excès.

- *Autres effets*

Les glucocorticoïdes agissent également sur plusieurs autres tissus tels que le tissu conjonctif, diminuant entre autres la production de composantes de la matrice extracellulaire et la capacité de réparation des plaies. Ils ont également un effet marqué au niveau du système nerveux central. Ces effets ont été découverts majoritairement à la suite d'observations cliniques chez des patients présentant des excès de glucocorticoïdes et développant dépressions, psychoses et autres syndromes psychologiques. Les effecteurs des glucocorticoïdes sur la cognition et l'humeur sont encore inconnus. On retrouve toutefois des récepteurs aux glucocorticoïdes (effecteurs des glucocorticoïdes, voir plus bas) dans plusieurs parties du système nerveux central. Notons finalement que les glucocorticoïdes ont un potentiel hypertensif, pouvant lier les récepteurs aux minéralocorticoïdes (1).

- *Mécanismes d'action moléculaire*

Comme la majorité des stéroïdes, les glucocorticoïdes exercent leurs fonctions en interagissant avec des récepteurs nucléaires, famille de protéines récepteurs solubles commune à plusieurs stéroïdes, acides rétinoïques et autres (41). Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) est une protéine d'environ 94kDa se retrouvant, à l'état inactif, séquestré dans le cytoplasme par différentes protéines chaperonnes telles que HSP90, HSP70, HSP56 ou HSP40. Le GR possède une architecture commune aux récepteurs de stéroïdes avec trois domaines fonctionnels : un domaine de liaison au stéroïde, un domaine aux motifs à doigt de zinc pour la liaison à l'ADN et un domaine de transactivation N-terminal. Les corticostéroïdes peuvent diffuser librement à travers les membranes cytoplasmiques grâce à leur structure lipophile. Le lien d'un stéroïde à son récepteur permet à ce dernier de se libérer de ses chaperonnes, de se diriger vers le noyau et d'adopter la conformation nécessaire pour lier l'ADN. Il lie sous forme d'homodimère une séquence d'ADN spécifique, l'élément de réponse aux glucocorticoïdes (GRE, voir Figure 10). La liaison d'un GR actif à un GRE mène ensuite à l'augmentation ou à la répression du gène qu'il a lié, selon que le GRE soit un régulateur positif (trans-activation) ou négatif (trans-répression) de la transcription (42). La transition du GR du cytoplasme au noyau est relativement lente. On observe toutefois des effets instantanés des glucocorticoïdes lors de leur administration chez l'humain. Trois mécanismes d'actions non génomiques ont été proposés pour expliquer les effets instantanés du GR (43, 44) (Flèches rouges, Figure 10). Un premier mécanisme suggère que l'insertion des glucocorticoïdes dans les membranes cellulaires, un peu comme le fait le cholestérol. Cette insertion modifierait les propriétés physico-chimiques des membranes et diminuerait ainsi l'influx intracellulaire de calcium et de sodium dans la cellule. Un deuxième mécanisme propose un relâchement des protéines

inclus dans le complexe protéique contenant le GR suite à la liaison de glucocorticoïdes au GR. Ces protéines pourraient par la suite activer diverses voies de signalisation. Finalement, il a été proposé par un troisième mécanisme que des GR puissent être présents et actifs au niveau de la membrane cytoplasmique. Bien que leur présence dans ce compartiment cellulaire ait été bien démontré, il n'est pas encore connu comment la signalisation de ces récepteurs serait pratiquée.

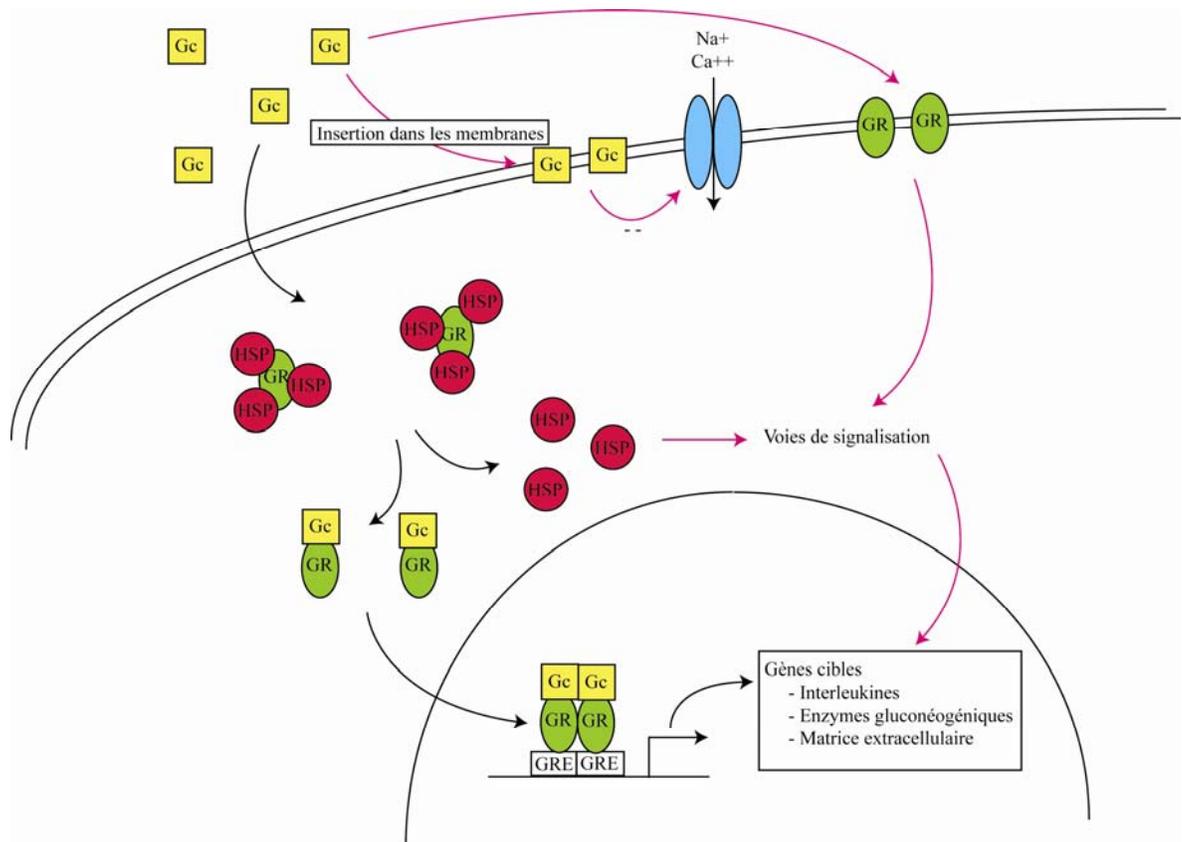


Figure 10 : Mécanismes d'action moléculaire des glucocorticoïdes. Les flèches noires représentent les mécanismes classiques d'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes. Les flèches rouges représentent les mécanismes d'activation alternatifs proposés pour expliquer les effets immédiats des glucocorticoïdes. Gc : glucocorticoïde, GR : récepteur aux glucocorticoïdes, HSP : protéines chaperones, GRE : Élément de réponse aux Gc.

## b. Rôle des minéralocorticoïdes

Les minéralocorticoïdes sont les stéroïdes contrôlant le transport d'électrolytes à travers les membranes épithéliales. Le principal minéralocorticoïde est l'aldostérone, qui agit en modulant l'expression de différents gènes cibles au niveau génomique et en altérant la signalisation intracellulaire par des mécanismes non génomiques. L'organe cible majeur de ces hormones est le rein, bien que de nombreuses études démontrent que l'aldostérone possède un rôle important dans plusieurs autres tissus comme le coeur, les poumons et le système nerveux central.

- *Fonction rénale*

Les cellules cibles classiques de l'aldostérone sont une fine couche unicellulaire de l'épithélium du tubule collecteur rénal. Ces cellules sont la barrière entre l'environnement interne et externe au niveau du rein. Elles contrôlent les concentrations d'électrolytes de part et d'autre de leurs membranes. La réabsorption du sodium et de l'eau de l'urine vers la cellule se fait de façon passive *via* un canal sodique épithélial (ENaC) situé à la membrane apicale. De la cellule à l'espace interstitiel, les électrolytes sont transportés de façon active par des transporteurs Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase qui excluent le sodium et font entrer du potassium. L'eau suit les mouvements du sodium à travers la cellule. L'aldostérone agit directement sur ces deux transporteurs au niveau génomique, activant l'expression de différents gènes impliqués dans l'activation de ce processus de réabsorption rénal. Les principales cibles sont la sérine de type 1 activée par les glucocorticoïdes (SGK1) et l'ubiquitine ligase

NEDD4-2. Cette dernière est une protéine activant la destruction des canaux ENaC par le processus d'ubiquitination. SGK1 est une protéine inactivant NEDD4-2 par phosphorylation. L'expression de plusieurs autres gènes, tels que 14-3-3 et Usp2-45 sont également induits par l'aldostérone et agissent de la même sorte, inactivant NEDD4-2. L'aldostérone agit également sur la voie de signalisation ERK/MEK/RAF *via* l'induction de GILZ (Motif de tirette à leucine induit par les glucocorticoïdes), une protéine empêchant l'action inhibitrice de ERK1/2 sur ENaC. Il est proposé que la phosphorylation du canal par ERK1/2 augmente l'affinité d'ENaC pour NEDD4-2. Il est également suggéré que l'aldostérone induit l'expression de K-Ras2, protéine activant SGK1, *via* la phosphoinositol 3 kinase (PI3K). Ainsi, l'augmentation des niveaux de SGK1 et la diminution concomitante de l'activité de NEDD4-2 par l'aldostérone ont pour but final d'augmenter la densité et la stabilité des canaux ENaC à la membrane cellulaire, favorisant de la sorte le transport du sodium à travers la membrane (voir Figure 11) (45).

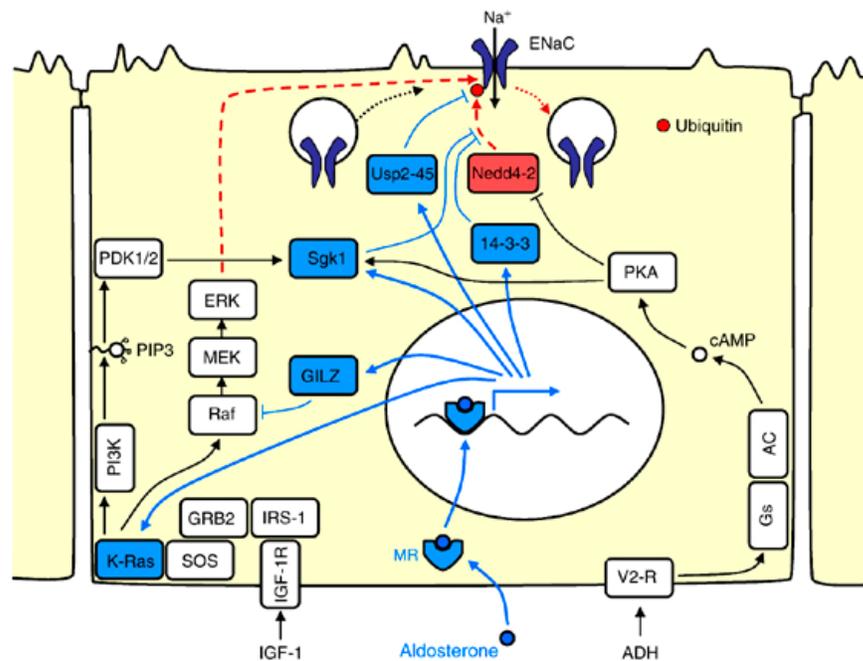


Figure 11 : Modèle des mécanismes d'activation transcriptionnelle de l'aldostérone sur la fonction des canaux ENaC (Tiré de Verrey et al. *Kidney int.* 2008 (45))

- *Fonctions non rénales*

De larges études cliniques sur l'effet d'antagonistes du MR, le spironolactone (étude RALES, (46)) et l'éplérénone (étude EPHEsus, (47)), ont démontré qu'en plus de diminuer les taux de mortalité et de morbidité associés aux insuffisances cardiaques, le blocage des sites d'action de l'aldostérone conférait une protection des organes cardiovasculaires, diminuant entre autres l'hypertrophie du ventricule gauche. Plusieurs études ont été faites chez les rats de type SHRSP (spontanément hypertensifs prédisposés aux accidents cérébraux-vasculaires), dont le système rénine-angiotensine est activé de façon constitutive. Sous une diète riche en NaCl, il a été démontré que l'administration d'antagonistes du MR ainsi que la surrénalectomie diminuent fortement le nombre d'accidents cardiovasculaires (ACV). Le nombre de lésions microvasculaires et cérébrovasculaires diminuent également dans ces conditions. Ces études ont donc permis de définir un rôle pour l'aldostérone au niveau des systèmes nerveux central et cardiaque (48). L'aldostérone agit directement sur le cœur dont plusieurs parties expriment le MR. Chez les souris SHRSP, il a été démontré que l'aldostérone inhibe la production d'oxydes nitreux (NO) par les tissus épithéliaux qui contrôlent le tonus musculaire. La spironolactone s'est avérée également protectrice à ce niveau, normalisant les phénomènes dépendant de NO. De plus, l'aldostérone, conjointement à une diète riche en NaCl, augmente directement l'activité de l'enzyme NADPH, responsable de la formation de radicaux libres. Ces superoxydes sont à la base du stress oxydatif dans les pathophysiologies cardiovasculaires. D'autre part, l'aldostérone peut augmenter les niveaux de l'inhibiteur d'activateur plasminogénique (PAI1), entraînant une hausse de la production de collagène et de fibrinogène. Cette activité est importante dans le maintien de la matrice extracellulaire myocardique mais également à la formation de fibrose. Ceci contribue à la

pathophysiologie cardiovasculaire, les fibroses et les collagènes ainsi formés exerçant une pression mécanique sur les tissus. Bien que ces études aient démontré l'impact de hauts niveaux d'aldostérone sur la physiologie cardiovasculaire, elles ont révélé que l'aldostérone contrôle la pression artérielle par des mécanismes qui dépassent largement l'action classique de l'aldostérone sur la réabsorption rénale de sodium (17, 49).

- *Mécanisme d'action moléculaire*

L'aldostérone, comme les glucocorticoïdes, diffusent librement à travers les membranes cellulaires. Le mécanisme d'action de cette hormone est similaire à celui des glucocorticoïdes, alors que la liaison de l'aldostérone à son récepteur, le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) restreint au niveau cytoplasmique, libère les protéines de type chaperonnes et permet la translocation du complexe au noyau, où il lie les séquences génomiques possédant un ou des éléments de réponse aux hormones (HRE), commun à la majorité des hormones. Le MR possède toutefois un manque flagrant de spécificité pour la liaison de l'aldostérone, alors que des concentrations équimolaire de cortisol peuvent déplacer entièrement l'aldostérone liée à son récepteur. Le cortisol étant dans des concentrations largement supérieures à celles d'aldostérone dans la circulation, tous les sites de liaison des MR devraient donc être occupés par le cortisol. Pour palier à ce manque de spécificité, les tissus cibles de l'aldostérone expriment l'enzyme 11 $\beta$ -HSD2 qui convertit le cortisol en son analogue inactif face aux MR, la cortisone (50). Cette enzyme protège donc les sites de liaison à l'aldostérone dans ces tissus. Cependant, la présence de réponses spécifiques à l'aldostérone dans des tissus exprimant le MR mais pas 11 $\beta$ -HSD2 soulève la possibilité que des co-régulateurs spécifiques existent, bien qu'ils ne soient pas encore décrits (51).

### c. Rôles des androgènes surrénaliens

Les androgènes surrénaliens (DHEA, DHEA-S et androstènedione) ne sont pas des androgènes biologiquement actifs en soi et n'ont qu'une fonction de précurseurs chez l'humain. Ils sont convertis par des tissus périphériques tels que les tissus adipeux et osseux en des androgènes puissants : la testostérone et la 5 $\alpha$ -déhydrotestostérone. Les androgènes surrénaliens sont en fait la source principale de testostérone chez les femmes et marginale chez les hommes : les testicules produisant la grande majorité de la testostérone. La principale fonction des androgènes surrénaliens est observée au cours de l'embryogenèse et de la vie fœtale. Les surrénales fœtales produisent exclusivement du DHEA qui est converti dans le placenta en œstrogène par aromatisation. Chez l'humain, le DHEA est la principale source d'œstrogène dans la vie placentaire. Les insuffisances surrénaliennes diminuant la production de ce stéroïde dans la surrénale fœtale, elles empêchent la complétion du développement du fœtus. Tel que décrit au point I.1, les glandes surrénales connaissent un réarrangement profond lors de la première année de vie au cours de laquelle la zone fœtale régresse fortement pour mener à la zonation normale qui persiste au cours de la vie. Il s'ensuit un déclin de la production de DHEA qui remontera au cours de la puberté et diminuera ensuite après 40 ans de vie. Bien que les fonctions du DHEA chez l'humain adulte ne soient pas encore claires, le profil de sécrétion des androgènes surrénaliens suggère un rôle pour ces hormones dans les processus de vieillissement (52).

## **II. Conditions pathologiques du cortex surrénalien**

Au reflet de la diversité des fonctions du cortex surrénalien et des cibles de ses hormones, les conditions pathologiques associées au cortex surrénalien sont nombreuses et diversifiées. Celles-ci sont observées cliniquement surtout par l'excès ou l'insuffisance des stéroïdes produits par le cortex. La présente étude se concentre exclusivement sur la formation de tumeurs cortico-surréaliennes et sur les conditions pathologiques associées aux excès de stéroïdes surréaliens.

### **1. Excès chronique de glucocorticoïdes: le syndrome de Cushing**

#### **a. Pathophysiologie**

En 1912, Harvey Cushing décrit pour la première fois un syndrome endocrinien d'origine hypophysaire chez une patiente de 23 ans présentant obésité, hypertrichose et aménorrhée. Il décrira 20 ans plus tard que ce « syndrome polyglandulaire » était dû à une dysfonction primaire de la glande hypophysaire. Il postula alors qu'un facteur hypophysaire contrôlait la fonction surrénalienne, bien que l'ACTH et les stéroïdes surréaliens n'aient pas encore été identifiés. Cette découverte mènera d'ailleurs à la description de la glande surrénale et de l'axe HHS. À la base, le syndrome de Cushing est causé par l'exposition chronique de tissus à des concentrations supraphysiologiques de glucocorticoïdes. Les symptômes de ce syndrome incluent l'obésité centrale, l'ostéoporose, l'hypertension, l'intolérance au glucose, l'hyperinsulinémie, l'hyperlipidémie, la myopathie proximale, l'atrophie de la peau, une susceptibilité accrue aux ecchymoses, des stries abdominales

pourpres, de l'hyperpigmentation (dans les cas ACTH-dépendants) ainsi que des troubles neuropsychiatriques (1, 53).

Plusieurs cas de syndrome de Cushing sont d'origine exogène, c'est-à-dire causés par la prise de glucocorticoïdes pour un traitement clinique, par exemple pour le traitement de l'asthme. Le syndrome de Cushing endogène touche environ dix nouveaux patients par million d'habitants chaque année. Ce nombre peut ne pas refléter la réalité puisqu'une grande partie des cas peuvent être sous-cliniques ou non détectés à cause de la difficulté de diagnostic face aux symptômes souvent associés à d'autres problèmes de santé (obésité, dépression...). Les étiologies des syndromes de Cushing endogènes sont résumées dans le Tableau 1. Les syndromes de Cushing peuvent être séparés en deux classes majeures qui se distinguent par leur dépendance à l'ACTH. La majorité (environ 80 %) sont ACTH-dépendant. Pour la plupart, il s'agit de la maladie de Cushing. Dans ces cas, les niveaux élevés d'ACTH circulant stimulent la glande surrénale de façon chronique ce qui entraîne une production excessive de glucocorticoïdes. Dans les cas ACTH-indépendants (environ 20% des cas), on assiste également à une production excessive de glucocorticoïdes suite à une production indépendante de l'ACTH par des tumeurs du cortex surrénalien. L'un des meilleurs indicateurs cliniques de ce type de syndrome de Cushing est que les niveaux d'ACTH sont très abaissés ou sous le seuil de détection, puisque le rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes entraîne la suppression du CRH et de l'ACTH (54).

Tableau 1 : Étiologies du syndrome de Cushing

Étiologie	Fréquence
<u>ACTH-dépendant</u>	<u>80 %</u>
- Adénome hypophysaire (maladie de Cushing)	80 %
- ACTH ectopique	20 %
- CRH ectopique	Très rare
- Hyperplasie corticotrope diffuse de l'hypophyse	Très rare
<u>ACTH-indépendant</u>	<u>20 %</u>
- Adénome surrénalien	70 %
- Carcinome surrénalien	10 % à 20 %
- Hyperplasie bilatérale	Rare
- Dysplasie micronodulaire (PPNAD)	Rare
Hypersensibilité aux glucocorticoïdes	Très rare
Sécrétion ectopique de glucocorticoïdes	Très rare

b. Syndrome de Cushing ACTH-dépendant

Tel que mentionné plus haut, le syndrome de Cushing ACTH-dépendant découle d'une production inappropriée d'ACTH. Environ 80 % de ces cas sont dus à des adénomes corticotropes hypophysaires. On parle dans ce cas de maladie de Cushing, ce dont souffrait la première patiente décrite par Harvey Cushing. Il existe aussi des cas d'hyperplasie corticotropes diffuses de l'hypophyse, mais ces cas sont extrêmement rares. Dans la maladie de Cushing, l'amplitude et la durée sont augmentées mais pas la fréquence des épisodes de sécrétion d'ACTH. L'augmentation chronique de l'ACTH plasmatique entraîne une hyperplasie bilatérale des glandes surrénales et le rythme circadien de sécrétion d'ACTH et de glucocorticoïdes est aboli. Le rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur l'ACTH est réduit mais s'exerce à un point de régulation plus élevé, celui-ci est encore actif au

niveau du CRH. Les niveaux de CRH sont donc très faibles. Dans ces cas, le traitement initial recommandé est la résection sélective de l'adénome corticotrope (55).

Les syndromes de Cushing ACTH-dépendant peuvent également être causés par des productions d'ACTH ou de CRH dans d'autres tissus que l'hypophyse ou l'hypothalamus. On parle dans ces cas de syndrome de sécrétion ectopique d'ACTH (ou de CRH). Les tumeurs sécrétant de l'ACTH ou du CRH peuvent être variées et incluent les cancers pulmonaires à petites cellules, les tumeurs carcinoïdes du thymus, des poumons, de l'appendice et du pancréas, les gastrinomes, les phéochromocytomes, les cancers médullaires de la thyroïde et d'autres tumeurs neuroendocriniennes (56). Le diagnostic de ces cas est plus difficile, puisque le rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur l'axe HHS peut être soit absent, soit encore fonctionnel. Pour cela, un dosage des niveaux d'ACTH des sinus pétreux est suggéré. Le traitement suggéré pour ces cas est généralement la résection chirurgicale des tumeurs productrices d'ACTH(55).

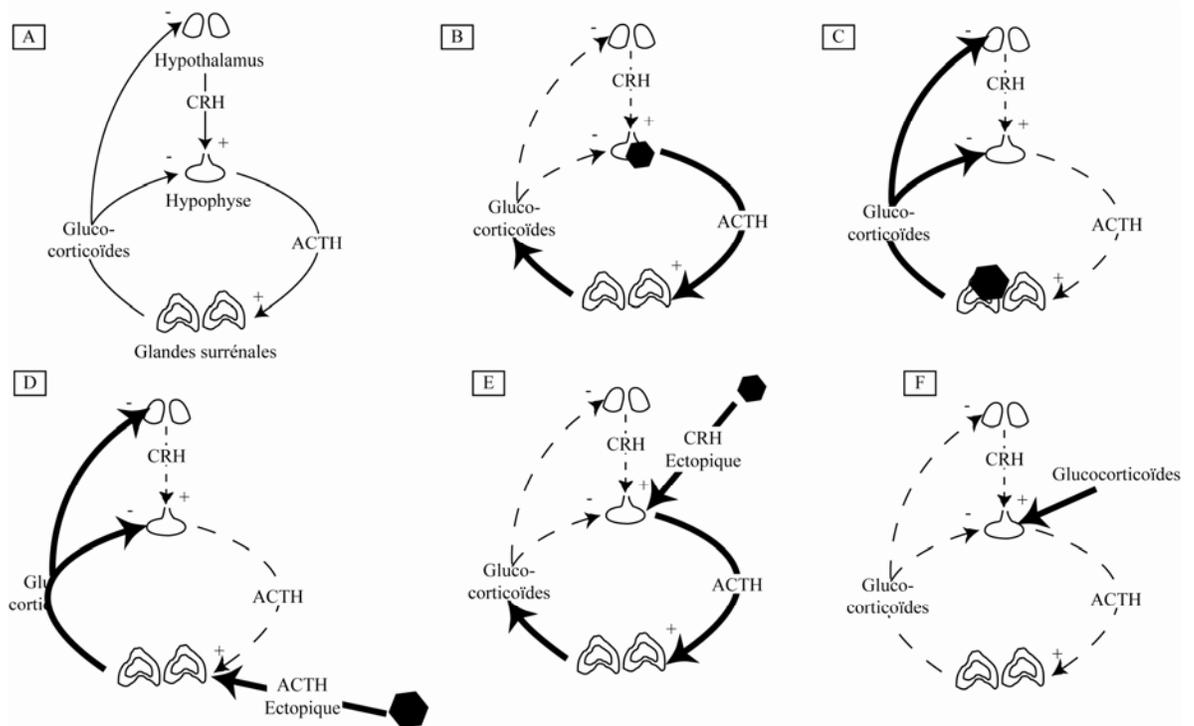


Figure 12 : Différentes étiologies du syndrome de Cushing. A : Axe HHS chez les individus normaux. B : Chez les patients atteints de maladie de Cushing. C : Syndrome de Cushing surrénalien primaire. D : Syndrome de sécrétion ectopique d'ACTH. E : syndrome de sécrétion ectopique de CRH. F : Syndrome de Cushing causé par l'administration externe de glucocorticoïdes. Adapté de Wilson et al, Williams textbook of endocrinology (1)

### c. Syndrome de Cushing ACTH-indépendant

La majorité des cas de syndrome de Cushing ACTH-indépendant sont dus à la présence d'une tumeur corticosurrénalienne produisant une trop grande quantité de glucocorticoïdes. Celles-ci incluent les adénomes et les carcinomes surrénaux, les dysplasies micronodulaires et les hyperplasies macronodulaires bilatérales (AIMAH). La production de glucocorticoïdes est ici indépendante de l'ACTH et du CRH qui sont

supprimés. On parle ici de syndrome de Cushing primaire ou surrénalien. Selon les cas, la stéroïdogénèse dans les adénomes est très active, menant à de hauts niveaux de glucocorticoïdes. Notons toutefois que ces adénomes peuvent également être non sécrétant (adénomes non fonctionnels). Dans les carcinomes et AIMAH toutefois, la stéroïdogénèse est relativement inefficace et les niveaux élevés de glucocorticoïdes proviennent davantage de la grande taille des tumeurs que de leur efficacité à convertir le cholestérol en cortisol (ou corticostérone, selon l'espèce). On peut ainsi retrouver une accumulation de précurseurs de cortisol à la suite de déficits de plusieurs enzymes de stéroïdogénèse. Le diagnostic de syndrome de Cushing primaire se fait généralement par la mesure de hauts niveaux de glucocorticoïdes circulants, des niveaux d'ACTH très faibles et par imagerie médicale. La surrénalectomie uni- ou bi-latérale demeure, selon les cas, le traitement de choix, bien que de nouvelles options de traitements pharmacologiques apparaissent dans les cas d'AIMAH (voir point IV). Toutes ces tumeurs peuvent sécréter plusieurs types de stéroïdes (57). Les mécanismes menant à la formation de chaque type de tumeurs seront traités en détail dans le point III.

## 2. Excès chronique de minéralocorticoïdes: l'hyperaldostéronisme primaire

### a. Pathophysiologie

Le premier cas d'hyperaldostéronisme primaire remonte à 1955 dans une présentation par Jerome Conn d'une patiente atteinte d'hypokaliémie spontanée, d'hypertension ainsi qu'un adénome surrénalien. Il est estimé que 5 % à 13 % des cas

d'hypertension chez l'humain sont causés par une sécrétion inappropriée de minéralocorticoïdes, principalement l'aldostérone (58-60). En plus de l'hypertension et de l'hypokaliémie qui peuvent atteindre des niveaux sévères, voire dangereux pour la survie, l'hyperaldostéronisme peut créer une polyurie et une alcalose métabolique. Les grandes quantités d'aldostérone augmentent la réabsorption tubulaire de sodium dans le rein. Accompagné d'eau dans cette réabsorption, le contenu sodique total dans le corps augmente sans que les taux de sodium soient affectés. L'expansion volémique qui s'en suit est la cause principale de l'hypertension associée ainsi que la suppression de la rénine. La rétention chronique de sodium peut entraîner une perte d'ions H<sup>+</sup> dans le tubule distal et l'ammonium créé dans ces conditions au niveau de rein peut mener à une alcalose métabolique. L'exposition chronique de l'organisme à de hauts niveaux de minéralocorticoïdes crée également un événement de perte du potassium au niveau du tubule distal rénal, ce qui crée l'hypokaliémie associée. Celle-ci pourra en outre affecter la réabsorption rénale menant à la polyurie. En plus de cas rares d'hyperaldostéronisme familial, l'hyperaldostéronisme primaire (HAP) provient principalement de la présence d'une condition pathologique de la zone glomérulée du cortex surrénalien : une hyperplasie bilatérale idiopathique (IHA) dans environ 60% des cas ou un adénome unilatéral dans 30 % à 40 % des cas. La surrénalectomie unilatérale est le traitement de choix pour les adénomes, avec des taux de correction de l'hypokaliémie de 90% et de normalisation de l'hypertension associée dans 60% des cas. Pour les IHA, une approche thérapeutique peut être utilisée avec des agents tels que la spironolactone qui inhibe le récepteur aux minéralocorticoïdes et peut être joint à d'autres anti-hypertenseurs (61).

## b. Hyperaldostéronisme familial

Une faible proportion des HAP ont une composante familiale autosomale dominante (moins de 1%). Toutefois, l'étude de ces cas a permis d'identifier des mécanismes moléculaires spécifiques à la formation de tumeurs productrices d'aldostérone. Selon les mécanismes impliqués, deux types d'hyperaldostéronismes familiaux (HF) sont décrits. Dans les HF de type 1, les patients possèdent une fusion du gène d'aldostérone synthase (*CYP11B2*) avec le promoteur du gène de la *CYP11B1*. L'ACTH est donc capable de stimuler la production d'aldostérone (*via* le promoteur de *CYP11B1*, maintenant contrôlant *CYP11B2*). Le mécanisme normal de rétrocontrôle du cortisol sur l'ACTH augmente fortement les niveaux d'ACTH suite à une réduction de la production de cortisol, menant à une sécrétion élevée d'aldostérone et aussi mais surtout à une hyperplasie des tissus surrénaliens (62). Ces cas peuvent être traités en supprimant la production d'ACTH par la dexaméthasone sauf dans les cas où une expansion clonale conduit au développement de nodules qui nécessitent alors une surrénalectomie. Dans les HF de type 2, les enzymes de stéroïdogénèse ne sont pas impliqués et l'événement génétique causal reste à être découvert. Plusieurs études sur les HF ont permis d'identifier des candidats, notamment (62, 63).

## c. Tumeurs sporadiques productrices d'aldostérone

- *Adénomes producteurs d'aldostérone : le syndrome de Conn*

Le syndrome de Conn est caractérisé par la présence d'une tumeur bénigne productrice d'aldostérone menant à l'HAP. À cause de variations dans les techniques de

dépistage, la prévalence d'adénomes producteurs d'aldostérone (APA) dans l'HAP varie selon les investigateurs de 24 à 77% (60). Les causes moléculaires de l'apparition d'APA sont similaires à celles menant aux adénomes producteurs de glucocorticoïdes (décrit en détail dans la section III). La formation d'un APA ou d'un adénome producteur de glucocorticoïdes sera en fait décidée par le type de cellule dans laquelle l'événement génétique initiateur a lieu (de la zone glomérulée ou fasciculée). Il est à noter toutefois que les APA gardent en général une sensibilité à l'ACTH, bien que la fusion des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* ait été exclue des cas d'APA. Les mécanismes régulant la sécrétion d'aldostérone dans les APA en absence de rénine sont encore peu connus (64).

- *Hyperplasies bilatérales idiopathiques*

Les hyperplasies bilatérales idiopathiques (IHA) représentent la presque totalité des cas d'HAP en absence d'APA. Il est encore une fois difficile d'estimer la proportion exacte que représente ce type d'HAP. Les IHA sont en effet majoritairement composées de cellules d'apparences normales, dans certains cas avec des micro- ou macro-nodules, et mènent à un hyperaldostéronisme, une hypokaliémie et une suppression de la rénine moins prononcée que dans les APA. Les mécanismes moléculaires conduisant à la formation des IHA ne sont pas encore bien définis. L'événement génétique le plus couramment observé est la surexpression de l'aldostérone synthase qui pourrait expliquer la production accélérée d'aldostérone dans ces cas. Certains polymorphismes ont été identifiés dans les gènes de *CYP11B1* et *CYP11B2*. Bien qu'ils ne puissent par eux-mêmes influencer la production d'aldostérone *in vitro*, certains ont un effet sur la production de précurseurs de glucocorticoïdes et diminuent la production de cortisol. Cette déficience entraîne des hausses légères des niveaux d'ACTH. Ce changement subtil mais chronique pourrait

influencer la quantité d'aldostérone produite et la sensibilité à ses agonistes. Chez un sous-type de patients, ce mécanisme pourrait mener à la formation d'hyperplasies et des symptômes d'HAP (60).

### 3. Excès chronique d'androgènes surrénalien: syndrome de virilisation surrénalien

L'excès d'androgènes, particulièrement chez les femmes, peut engendrer des symptômes très inconfortables, incluant l'hirsutisme, la clitoromégalie, de l'alopecie masculine, des organes génitaux ambigus, une puberté prématurée, des menstruations irrégulières, l'infertilité, de l'acné, une voie grave et une hausse de la masse musculaire (65, 66). L'excès chronique d'androgènes peut également mener au syndrome d'ovaires polykystiques (PCOS). Chez ces patients, l'excès d'androgènes dérègle l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. L'infertilité est présente dans la majorité des cas. Les niveaux d'androgènes inhibent la croissance folliculaire ce qui mène à l'agrégation de plusieurs follicules sous la capsule et à la formation des kystes ovariens (65). Plusieurs cas de virilisation d'origine surrénalienne sont dus à la présence d'une tumeur bénigne ou maligne originaire des cellules de la zone réticulée qui, au cours de la tumorigenèse, perdent leur capacité à contrôler leur production de stéroïdes, un peu comme les syndromes de Cushing primaire et d'hyperaldostéronisme primaire (voir points II.1.c et II.2.c). Il est toutefois relativement fréquent (1 cas sur 5000 à 15000) que la production excessive d'androgène soit due à la présence d'hyperplasies surrénaliennes congénitales (CAH). Ce syndrome est hérité des parents et est causé par la présence d'une mutation inactivatrice dans le gène d'une enzyme de stéroïdogénèse impliquée dans la synthèse de glucocorticoïdes et/ou de

minéralocorticoïde, le plus souvent la 21-hydroxylase (CYP21A2, voir Figure 3). La déplétion de ces stéroïdes mène à une sécrétion accrue de CRH et d'ACTH par un manque de rétrocontrôle positif. Ces niveaux élevés d'ACTH entraînent une sécrétion accrue d'androgènes et une hyperplasie des cellules corticales (66).

### **III. Tumorigenèse corticosurrénalienn**

Le développement de tumeurs du cortex surrénalien mène à un éventail de conditions pathologiques variées. Avec l'avancée des techniques d'imagerie médicale et le développement du dépistage routinier de tumeurs, le nombre de tumeurs bénignes non fonctionnelles corticosurréaliennes découvertes (les incidentalomes) a augmenté et il est maintenant estimé que jusqu'à 4% de la population est porteuse de telles tumeurs (67). Bien que la majorité de ces tumeurs ne soient pas fonctionnelles, l'élucidation des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse du cortex surrénalien est un défi continu dans le traitement des conditions pathologiques liées au cortex surrénalien. On retrouve trois types majeurs de tumeurs cortico-surréaliennes : les hyperplasies, les adénomes et les carcinomes. Plusieurs syndromes familiaux ont permis d'identifier des déterminants moléculaires de la formation spécifique de chaque type de tumeur. Alors que plusieurs déterminants exogènes existent dans les hyperplasies (Tumeurs productrices d'ACTH ou de CRH, surexpression de récepteurs hormonaux dans la tumeur surréalienn...), les adénomes et les carcinomes ont une progression tumorale qui peut être le résultat de certaines mutations dans des oncogènes connus. Bien que la grande majorité des tumeurs cortico-surréaliennes sont bénignes, les carcinomes du cortex sont des tumeurs extrêmement agressives, avec un taux de survie à 5 ans très faible.

## 1. Profil génétique des tumeurs corticosurréaliennes

### a. Principe de clonalité

Afin qu'une cellule entre en état de prolifération incontrôlé et crée ultimement une tumeur, celle-ci subit un ou plusieurs évènements génétiques menant à la perte des points de contrôle de sa prolifération. Selon la théorie des évènements séquentiels (multiple hit (68)) dans le cortex surréalien, l'évènement initial de ce processus serait l'initiation de la croissance d'une tumeur polyclonale maintenant un profil de stéroïdogénèse normal, reflétant l'action de mitogènes et de facteurs de croissance comme l'ACTH ou les facteurs de croissance EGF, FGF ou IGF. Les cellules se retrouvent alors plus sensibles à l'action d'oncogènes et aux mutations de gènes suppresseurs de tumeurs. Une fois qu'un sous-clone de cellules acquiert un avantage prolifératif sur les autres sous-clones, une prolifération sélective peut alors avoir lieu : le sous-clone avantageux remplaçant ultimement toutes les cellules de la tumeur qui devient alors monoclonale. L'étude du profil clonal de tumeur et la détermination de la proportion d'homogénéité génétique dans les tumeurs (i.e. toutes les cellules dans la tumeur ont-elles le même profil génétique?), permettent de déterminer les origines cellulaires ainsi que les mécanismes de formation de ces tumeurs. Les carcinomes cortico-surréaliens sont essentiellement monoclonaux. Représentée par l'agressivité de ces tumeurs, cette observation est une indication que ces tumeurs sont causées par une mutation dans un oncogène ou un gène répresseur puissant. Les adénomes sont en majorité monoclonaux (environ 88%), alors que les hyperplasies nodulaires sont en grande majorité polyclonale (77 à 100% selon les études). Ces observations ont été utilisées comme

argument pour la théorie séquentielle, impliquant que les hyperplasies sont la première étape du processus (69). Une partie de ces cellules hyperplasiques gagneraient un avantage clonal, menant à la formation d'un adénome ou d'un carcinome. Dans les adénomes, les cellules ne sont pas encore en état prolifératif extrême, comme les carcinomes, ce qui laisse la place à l'apparition de nouveaux sous-clones, tel qu'indiqués par la proportion polyclonale de ces tumeurs. En opposition à ces observations, tel qu'avancé dans les points suivants, des mutations ponctuelles peuvent mener directement à la formation d'hyperplasies, spécifiquement, et sont absentes dans les adénomes ou les carcinomes. Ces hypothèses justifient toutefois l'importance d'étudier les mécanismes menant à la formation d'hyperplasies surrénaliennes, potentiellement les initiateurs de la tumorigenèse surrénalienne.

#### b. Cytogénétique des tumeurs cortico-surrénaliennes

La tumorigenèse est un processus essentiellement génétique. Les modifications génétiques incluent les mutations ponctuelles, le gain ou la perte de parties de chromosomes et plusieurs autres. Ces modifications sont reflétées par le gain ou la perte d'hétérozygoté dans une région chromosomique distincte. Les études d'hybridation génomique comparative (CGH) ou de microsatellites sont souvent la première étape pour identifier les zones sensibles dans le génome de tumeurs. Dans le cas des tumeurs corticosurrénaliennes, plusieurs études se sont penchées sur la question dans un nombre variable de tumeur. Dans les hyperplasies, une seule région a été identifiée dans une étude unique : un gain dans la région 17p. Les aberrations génétiques sont beaucoup plus fréquentes dans les adénomes et les carcinomes, les études ayant relevé des gains dans les

régions 1p, 17p, 22, 2q et 11q et des pertes dans les chromosomes 4, 5, 12, 15 et 19. Notons que les gains en 11q et 16p et les pertes en 4 et 5 sont spécifiques aux carcinomes. Une certaine gradation dans l'instabilité génomique est donc observable des hyperplasies aux adénomes et carcinomes. La composante génétique semble en effet être plus présente dans les adénomes et carcinomes que dans les hyperplasies qui sont plus souvent dues à un stimulus externe chronique ou une grande sensibilité à des événements exogènes qu'à des défauts génétiques irréversibles conférant un avantage prolifératif. Le gain de ces défauts génétiques pourrait être l'événement nécessaire à la transition de cellules hyperplasiques à des cellules adénomateuses ou cancéreuses (70).

## 2. **Syndromes de tumeurs héréditaires**

### a. **Le locus 17p13 et le gène TP53 : syndrome de Li-Fraumeni**

La perte d'hétérozygoté (LOH) au locus 17p13 est l'un des meilleurs marqueurs d'agressivité des tumeurs cortico-surréaliennes. C'est également un prédicteur efficace de la récurrence de tumeurs suite à la résection de cancers cortico-surréaliens chez l'adulte. On retrouve ce LOH dans environ 85% des cas de carcinomes et dans environ 30% des adénomes du cortex surrénalien (71). On retrouve dans cette région le gène *TP53*, un suppresseur de tumeur codant pour p53, phosphoprotéine impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Des mutations germinales de ce gène sont la principale cause du syndrome de Li-Fraumeni, associé à la formation de tumeur du cerveau, de cancer du sein, de sarcome des tissus souples, de leucémie et de cancer cortico-surrénalien (72). Chez les patients atteints, ces tumeurs se développent à un jeune âge. La fréquence de cette mutation

dans les cancers corticosurréaliens varie selon les études, variation attribuable à des facteurs environnementaux et géographiques. La présence d'une mutation dans ce gène dans des carcinomes surréaliens est liée à un pronostic très faible de survie, menant à la formation de métastases et de tumeurs récurrentes. *TP53* est donc un gène de prolifération tumorale très agressif. Les mutations somatiques de *TP53* sont rares dans les carcinomes surréaliens, le LOH en 17p13 et son effet sur ce gène sont la principale cause de tumorigenèse (73).

Dans une région du sud du Brésil par exemple, les cancers cortico-surréaliens pédiatriques ont une incidence dix fois supérieure à celle observée en Europe et en Amérique du nord. Une mutation germinale (R337H) a été découverte dans cette région chez 35 des 36 cas étudiés (74). Ces patients ne présentaient aucune autre tumeur associée au syndrome de Li-Fraumeni, soulevant la spécificité de ce polymorphisme à la formation de cancers surréaliens. Cette spécificité pourrait être expliquée par l'identification de duplications du gène codant pour *SF-1* (75) et la surexpression de ce gène (76) dans ces tumeurs. SF-1 est un facteur de transcription contrôlant un grand nombre de gènes spécifiques aux glandes surrénales, notamment les enzymes de stéroïdogénèse et des gènes développementaux (2).

#### b. Le locus 11p15 et *IGF2* : Syndrome de Beckwith-Wiedemann

Le principal résultat des études de profilage génique des différents types de tumeurs cortico-surréaliennes est que la surexpression de *IGF2* est directement associée au niveau d'agressivité d'une tumeur, culminant dans les carcinomes (77). Il s'agit en fait d'un des meilleurs marqueurs histologiques de ce type de tumeur, avec une valeur pronostique

approchant 100%. *IGF2* se retrouve dans le locus 11p15, de même que les gènes *H19* et *CDKN1C*. Les gènes de ce locus n'expriment qu'un des allèles (soit paternel, soit maternel, phénomène d'empreinte génétique parental). Des défauts de l'impression fonctionnelle sont la cause du syndrome de Beckwith-Wiedemann. Dans ces cas, l'expression de l'allèle maternel est perdue, menant à une unidisomie paternelle au locus d'*IGF2*. Ce mécanisme de duplication de l'allèle paternel ou de l'activation de l'allèle maternel sont fréquents dans les carcinomes cortico-surréaliens (78). L'effet final de ces mécanismes est une surexpression du facteur de croissance IGF2 et une répression de H19, un facteur de transcription inhibant IGF2. Les études de profilage de l'expression génique ont noté qu'en plus de surexprimer IGF2, les carcinomes ont des niveaux très élevés du récepteur à IGF de type 1 (IGFR1). Les études *in vitro* dans la lignée cortico-surrénaliennne H295R démontrent qu'IGF2 exerce son action mitogénique *via* le récepteur IGR1. Ainsi, il est proposé que l'action d'IGF2 se fasse de façon autocrine ou paracrine (78). *IGF2* serait donc un gène de progression tumorale et de soutien de la prolifération plutôt qu'un gène initiateur de la tumorigenèse.

### c. Le locus 11q13 et *MEN1* : syndrome de néoplasies endocriniennes multiples

Le gène de la ménine (*MEN1*) a été découvert par son association au syndrome de Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1 (MEN1). Ce syndrome est caractérisé par la formation de tumeurs dans différents organes du système endocrinien, notamment la parathyroïde, le pancréas endocrinien et l'hypophyse. On retrouve également des tumeurs bénignes du cortex surrénalien, principalement des hyperplasies et adénomes non

sécrétants, ou parfois sécrétant de l'aldostérone (79). Certaines hyperplasies sont toutefois dues à la présence d'une tumeur hypophysaire sécrétante d'ACTH (Maladie de Cushing). Bien que l'on retrouve un LOH dans cette région dans presque 90% des carcinomes, les mutations de *MEN1* dans les hyperplasies, les adénomes ou les carcinomes sont extrêmement rares. La majorité du bras long du chromosome 11 est toutefois perdue dans ces tumeurs, suggérant la présence d'un autre gène d'importance dans cette région (80). Cette protéine se localise au noyau et aurait une action sur l'expression de gènes induits par JunD, un facteur de transcription lié à p53 (81).

#### d. Le locus 17q22-24 et *PRKAR1A* : Syndrome du Complexe de Carney

Le syndrome de néoplasies multiples du complexe de Carney (CNC) est associé lui aussi à plusieurs tumeurs du système endocrinien. Au niveau des surrénales, il se caractérise par un sous-type d'hyperplasie micronodulaire relativement rare, communément appelé PPNAD (Maladie surrénalienne de nodules surrénaux primaires pigmentés), caractérisée par des nodules à la couleur très foncée due à la présence accrue du pigment fuscine (82). Ces patients ont communément un LOH en 17q22-24, région chromosomique comprenant le gène de la sous-unité régulatrice 1 $\alpha$  de la protéine kinase A (*PRKAR1A*). L'inactivation de cette sous-unité empêche la répression de la PKA, protéine effectrice de la voie de l'AMPc, activant fortement la prolifération cellulaire (voir point III.4). La majorité de ce type de tumeur possède l'introduction d'un codon d'arrêt dans l'ARN messager de *PRKAR1A* menant à des ARNm tronqués instables. Certains cas n'ont pas une perte allélique complète et conserve un allèle normal et les niveaux d'expression de la protéine

ne sont pas affectés, démontrant que l'haploinsuffisance de *PRKARIA* est suffisante pour la progression de tumeur (83). La mutation de ce gène est très rare dans les cas d'adénome et le LOH à ce locus dans les carcinomes est beaucoup plus large et non spécifique au gène de *PRKARIA*, ce qui indique que ce gène joue un rôle mineur dans la progression tumorale avancée mais plus important dans l'initiation de la formation d'hyperplasies et de tumeurs bénignes.

e. *GNAS* : syndrome de McCune-Albright

Le syndrome de McCune-Albright est un autre syndrome de néoplasies multiples, affectant la peau et le système osseux qui crée des anomalies endocriniennes (puberté précoce, nodules thyroïdiens toxiques, gigantisme hypophysaire et le syndrome de Cushing). Dans la surrénale, on retrouve chez ces patients des hyperplasies ressemblant à celles observées dans le syndrome de Cushing ACTH-dépendant. Le gène responsable de ce syndrome est celui codant pour la sous-unité activatrice  $\alpha$  de la protéine G (*GNAS*). Les mutations de ce gène mènent à une activation constitutive de cette protéine, stimulant de la sorte la voie de l'AMPc et formant les hyperplasies nodulaires surrénaliennes. Des mutations de ce gène ont également été observées dans des hyperplasies macronodulaires ACTH-indépendantes, les patients atteints ne présentent toutefois pas les autres symptômes de McCune-Albright, ce qui indique qu'il s'agit dans ces cas de mutations somatiques. Il n'existe pas de cas rapportés d'adénomes ou de carcinomes avec de telles mutations, indiquant que ce mécanisme est impliqué dans la prolifération d'hyperplasies, sans pour autant affecté l'agressivité d'une tumeur (84).

#### f. CYP21A1 : Hyperplasies Congénitales Surréaliennes (CAH)

La présence d'aberrations dans la séquence d'enzymes stéroïdogéniques a déjà été mentionnée dans les cas d'hyperaldostéronismes familiaux menant à la formation d'hyperplasies (voir point II.2.b). Les hyperplasies congénitales surréaliennes sont causées par une déficience dans la synthèse de cortisol et/ou d'aldostérone ce qui, par rétrocontrôle positif, augmente la quantité d'ACTH et de CRH de façon chronique, menant à la formation d'hyperplasies du cortex surréalien et ce, dès la vie foetale. Les gènes principalement touchés sont la 21-hydroxylase (*CYP21A2*, 90% des cas), la 11 $\beta$ -hydroxylase (*CYP11B1*, 5-8% des cas), la 17 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP17*, rare, perte du cortisol et du DHEA) et la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déhydrogénase (*3 $\beta$ -HSD*, très rare) (voir Figure 3). Ces mutations n'ont donc pas d'effets directs sur la prolifération cellulaire, c'est la hausse de l'ACTH qui initie la prolifération cellulaire (66).

### 3. Mutations somatiques et autres gènes mutés dans les tumeurs du cortex surréalien

#### a. Voie de Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de Wnt/ $\beta$ -caténine est un système de contrôle important de la prolifération cellulaire et de l'embryogenèse (85). En état inactif (Figure 13A), la  $\beta$ -caténine est séquestré dans un complexe protéique qui inclus entre autres APC, l'axin et la kinase GSK3. GSK3 phosphoryle des résidus sérine et thréonine de la  $\beta$ -caténine. Ces phosphorylations dirigent la  $\beta$ -caténine vers des processus de dégradation par l'ubiquitin.

Lors de l'activation de la voie de signalisation par les récepteurs de type frizzled (Figure 13B), le complexe protéique est défait et la  $\beta$ -caténine peut alors se diriger au noyau et activer l'expression des gènes cibles par l'intermédiaire de facteurs de transcription cellulaire de type T (TCF).

Des aberrations génétiques de différents membres de cette voie de signalisation sont à la base de la formation d'un grand nombre de tumeurs chez l'humain, et ce, dans plusieurs organes. Son importance dans les tumeurs cortico-surréaliennes a premièrement été identifiée par des études de profilage d'expression génique (86). Plusieurs études ont depuis révélé la présence de mutations dans la  $\beta$ -caténine, protéine centrale dans l'activation de cette voie de signalisation, dans les adénomes cortico-surréaliens et dans de rares cas de carcinomes (87-89). Ces mutations sont fréquentes dans les adénomes (environ 15% des cas étudiés) et implique généralement la répression des mécanismes de régulation par phosphorylation de la  $\beta$ -caténine (voir Figure 13). La majorité des mutations identifiées dans les tumeurs touchent en effet des résidus phosphorylés par GSK3. Le changement d'un de ces résidus par un acide aminé non phosphorylable empêche la dégradation de la  $\beta$ -caténine qui est donc toujours active. L'activation constitutive de cette voie de signalisation induit normalement l'expression de nombreux gènes tels que *Cyclin D1* ou *cMyc*. Toutefois, ces événements ne sont pas retrouvés dans les tumeurs cortico-surréaliennes, ce qui indiquerait que l'activation constitutive de  $\beta$ -caténine induit une autre voie de signalisation dans le cortex surrénalien. Une récente étude a révélé l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le noyau de plusieurs cas de PPNAD avec mutations de *PRKARIA*, ce qui soulève la possibilité qu'il y ait une relation entre la voie de l'AMPc et celle de Wnt/ $\beta$ -caténine dans le cortex surrénalien (89). L'importance de cette voie est maintenant confirmée dans l'embryogenèse du cortex surrénalien (90). Il est souvent observé que les

voies de signalisation impliquées dans l'embryogenèse d'un organe sont les premières à être dérégulées dans les tumeurs de ces organes. La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est donc prometteuse dans l'élucidation des mécanismes de tumorigenèse cortico-surrénalienne.

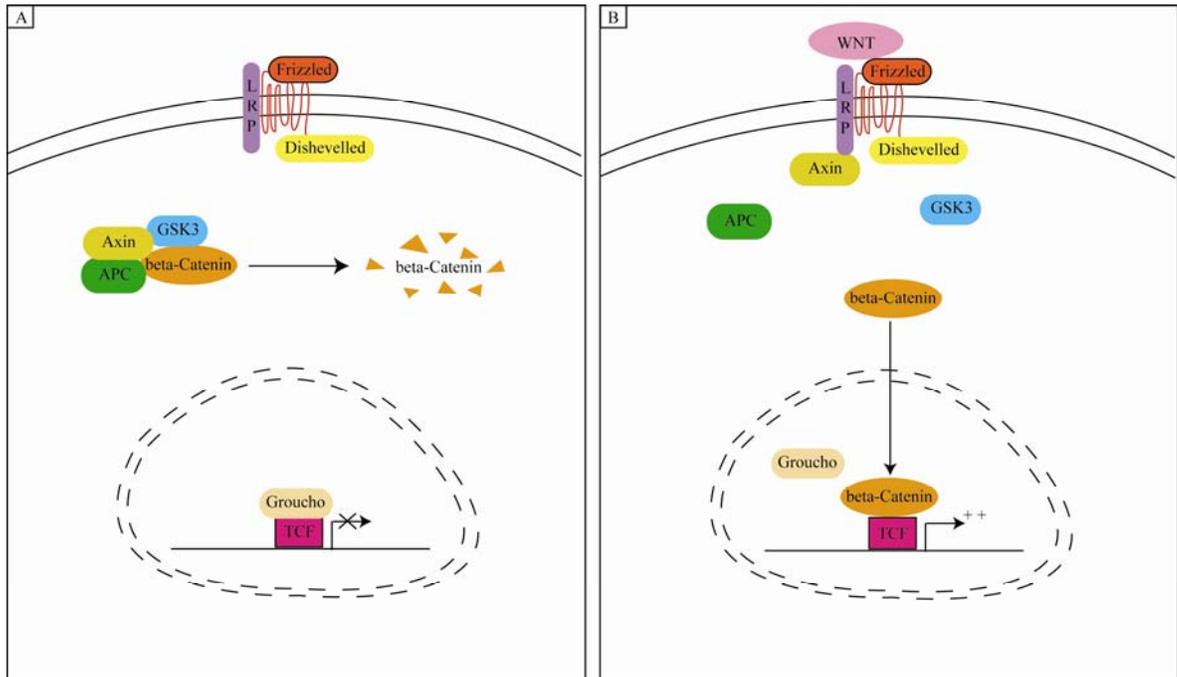


Figure 13 : Voie de signalisation canonique de WNT/ $\beta$ -caténine. En état désactivé (A), la  $\beta$ -caténine est dirigée vers le processus de dégradation ubiquitine-dépendant via sa phosphorylation par GSK3. Ce processus est également maintenu par Axin et APC. En présence du ligand (B), le récepteur de type Frizzled déstabilise le complexe de dégradation de  $\beta$ -caténine qui se dirige vers le noyau pour stimuler l'expression de gènes cibles via les facteurs de transcription de type TCF (facteurs de transcription cellulaires de type T). Pour une revue complète de la voie de signalisation, voir Barkel et al. 2008 (85)

b. Les phosphodiésterases : PDE11A et PDE8B

Il a été mentionné qu'une grande partie des cas de PPNAD sont dus à une mutation dans le gène de *PRKARIA* (voir point III.2.d). Il existe toutefois certaines familles avec PPNAD qui ne possèdent pas de mutation dans ce gène. Il a été récemment décrit qu'une autre partie de la voie de l'AMPc était impliquée dans ces cas. Une fois son action terminée, l'AMPc est dégradé par des phosphodiesterases qui sont les gardiens de l'inactivation de la voie de l'AMPc. Des mutations inactivatrices dans les isoformes 11A et 8B de phosphodiesterase mènent à une accumulation de l'AMPc et à une activation constitutive de la voie de l'AMPc (91).

#### c. Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

La surexpression de GPCR dans les tumeurs cortico-surréaliennes est un événement génétique très courant. Dans ce type de tumeur, un récepteur est exprimé de façon aberrante et contrôle la production de stéroïdes ainsi que la formation de tumeur (21). Ce type de mécanisme sera traité en détail dans le point IV. Plusieurs familles ont été décrites dans lesquelles ce type de syndrome est transmis de façon autosomale dominante. Des études ont démontré que la surexpression de ces récepteurs aberrants est un événement génétique suffisant pour la formation de tumeurs cortico-surréaliennes (92, 93).

#### 4. Importance de l'AMPc dans les hyperplasies surréaliennes : Modèle d'initiation de la tumorigenèse cortico-surréalienn

Tel que présenté dans les points précédents, les aberrations de la voie de l'AMPc

sont un phénomène très courant dans les tumeurs bénignes du cortex surrénalien. Que ce soient les récepteurs, les protéines G, la PKA ou les protéines de dégradation de l'AMPc, il existe des aberrations à tous les niveaux de cette voie de signalisation qui mènent le plus souvent à la formation d'hyperplasies (voir Figure 14). Tel que mentionné au point III.1, les hyperplasies semblent être le point d'entrée dans la série d'événements génétiques conduisant à la formation de tumeur. Les aberrations de cette voie de signalisation ont été majoritairement liées aux hyperplasies et plus rarement aux tumeurs bénignes. C'est pourquoi la voie de l'AMPc est maintenant perçue comme la voie d'entrée à la tumorigenèse cortico-surrénalienne (94).

Il est intéressant de voir que l'AMPc est, dans les cas discutés, un initiateur de la prolifération cellulaire alors qu'il a été démontré que ce messager a plus souvent tendance à inhiber la prolifération cellulaire (95). Même l'ACTH semble inhiber la prolifération cellulaire des cellules surrénaliennes *in vitro* (96), ce qui souligne l'importance de l'environnement cellulaire dans la potentialisation de la prolifération cellulaire par l'ACTH *via* les MAP kinases (35). La formation de tumeur suite à l'activation constitutive de la voie de l'AMPc peut dénoter la mise en place de voies de signalisation spécifiques à un signal chronique et non transitoire (voir Figure 7).

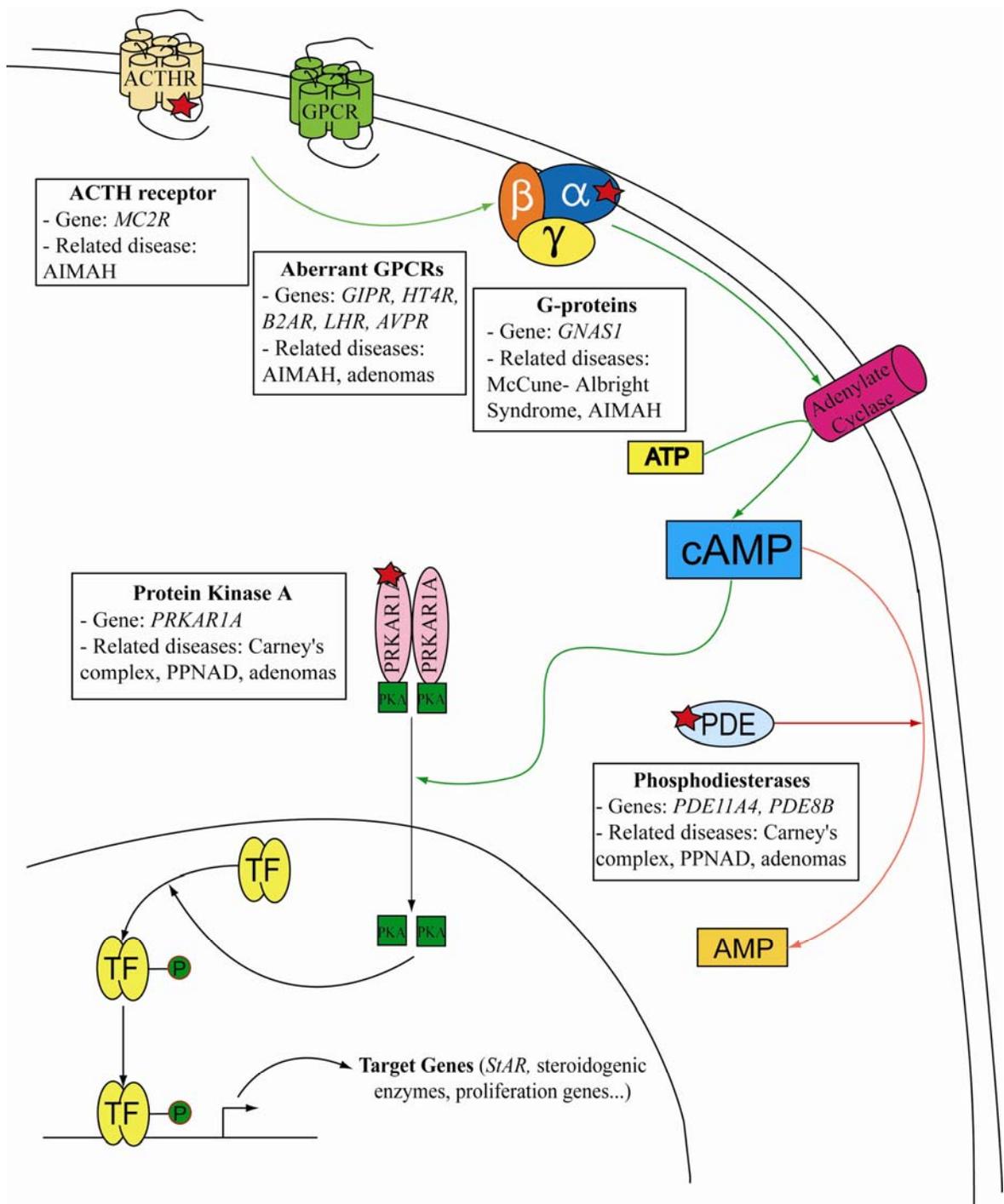


Figure 14 : Aberrations de la voie de signalisation de l'AMPc dans les tumeurs cortico-surréaliennes

Tiré de Lacroix et al, *Clinical Endocrinology*, 2009 (97)

L'état hyperplasique serait un terreau parfait pour l'apparition d'autres défauts génétiques menant à la formation de tumeurs plus agressives telles que les adénomes et les carcinomes. L'expression de facteurs de croissances (*IGF2*), les défauts du cycle cellulaire (*TP53*) et les anomalies de Wnt/ $\beta$ -caténine mènent en grande majorité à la formation d'adénomes et de carcinomes et ne sont que très rarement impliqués dans les hyperplasies. Ce sont ces gènes qui assureraient la transition hyperplasie-adénome ou hyperplasie-carcinome selon le gène impliqué. Toutefois, l'existence d'une transition adénome-carcinome est encore débattue et difficilement observable cliniquement. La majorité des instabilités génétiques observées dans les carcinomes sont également présentes dans les adénomes. Les défauts génétiques affectant les loci d'*IGF2* et *TP53* sont toutefois hautement spécifiques aux carcinomes. Il serait donc attendu qu'un adénome acquérant ces défauts génétiques devienne un carcinome. Quoiqu'il en soit, il semble que l'initiation de la tumorigenèse cortico-surrénalienne passe par la formation d'hyperplasie et que ce phénomène soit dépendant de l'AMPc. L'étude des mécanismes contrôlant cette voie de signalisation est donc particulièrement importante pour comprendre les événements initiateurs de la tumorigenèse surrénalienne.

#### **IV. Expression aberrante de récepteurs hormonaux dans les tumeurs surrénaliennes**

Le syndrome de Cushing est causé en majorité par la présence d'une tumeur hypophysaire produisant de l'ACTH (maladie de Cushing). Un sous-type de ce syndrome est indépendant de l'ACTH et le plus souvent causé par la présence d'une tumeur cortico-surrénalienne. Les hyperplasies de la glande surrénale sont le point d'entrée de la

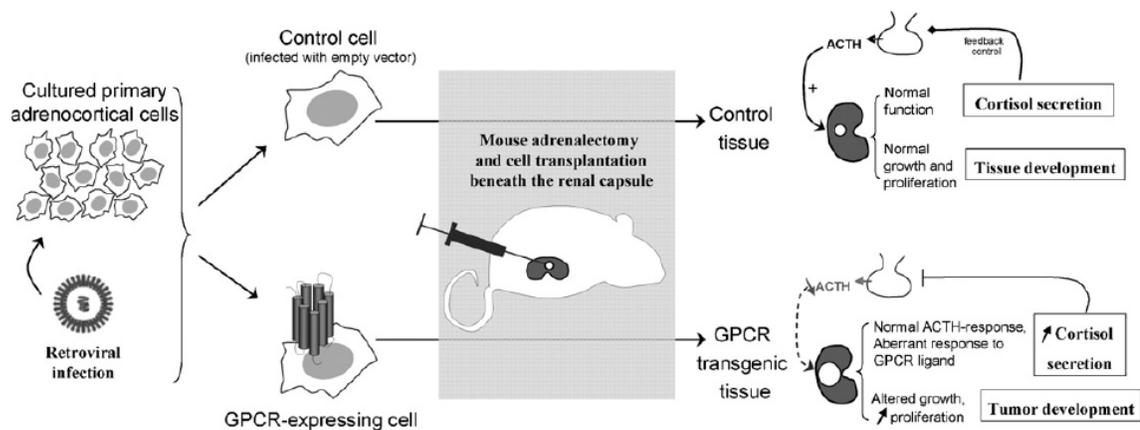
tumorigenèse surrénalienne et la voie de l'AMPC est le mécanisme moléculaire dominant qui conduit à la formation de ce type de tumeur. En plus des gènes impliqués dans les syndromes familiaux, l'expression aberrante de récepteurs couplés aux protéines G est le mécanisme moléculaire le plus souvent observé dans les hyperplasies macronodulaires ou les adénomes cortico-surréaliennes ACTH-indépendants. On retrouve dans ces tumeurs des niveaux d'expression ou des niveaux fonctionnels élevés de un ou plusieurs récepteurs. Ces tumeurs répondent alors à des stimuli qui n'ont qu'une fonction mineure ou absente dans la physiologie surrénalienne normale. De tels stimuli incluent le peptide insulinothropique glucose-dépendant (GIP), les agonistes de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques ( $\beta$ -AR), la vasopressine (AVP), la sérotonine, l'angiotensine II, le glucagon, l'hormone lutéale/gonadotropine chorionique humaine (LH/hCG) et la leptine. Des études moléculaires ont démontré que ces récepteurs régulent la stéroïdogénèse par les mêmes moyens que l'ACTH. Les mécanismes contrôlant la production de cortisol dans les hyperplasies bilatérales ou les adénomes unilatéraux en absence d'ACTH étaient relativement peu connus et classiquement considérés autonomes. L'expression aberrante de récepteurs hormonaux étant présente dans la majorité des AIMAH et dans une large proportion des adénomes unilatéraux, l'élucidation des mécanismes moléculaires à la base de cette expression aberrante pourrait identifier les mécanismes initiateurs de la tumorigenèse cortico-surréaliennes (21).

## 1. Réponses aberrantes retrouvées dans des tumeurs productrices de cortisol

### a. GIP

La surexpression du récepteur au GIP mène à une production de cortisol «alimentation-dépendante». Le syndrome de Cushing GIP-dépendant peut survenir chez des patients atteints d'AIMAH ou d'adénomes unilatéraux. Ces patients ont des niveaux de cortisol faible en période de jeûne qui augmentent suite à la prise de repas, malgré des niveaux d'ACTH supprimés. La première cause moléculaire de ce type de syndrome de Cushing est l'expression élevée d'un récepteur au GIP (GIPR) non muté dans des cellules d'AIMAH ou d'adénomes à l'apparence de cellules de la zone fasciculée. Plus d'une trentaine de cas présentant une production d'hormones surrénaliennes à des niveaux cliniques ou sous-cliniques en corrélation avec les niveaux circulants de GIP ont été décrits dans la littérature. Certains patients présentaient également d'autres réponses aberrantes concomitantes, notamment au LH/hCG (98-100) et au 5-HT4 (100). Cette observation explique que les niveaux de cortisol ne sont pas complètement réprimés en période de jeûne. Dans une étude rétrospective, l'expression génique du GIPR a été observée comme augmentée dans 4 des 8 AIMAH, dans 1 des 16 adénomes et dans aucun des carcinomes (101). Dans une autre étude contenant 55 tumeurs cortico-surrénaliennes (38 adénomes et 17 carcinomes), les niveaux de l'ARNm du GIPR étaient significativement plus élevés dans les carcinomes que les adénomes (102). Dans les tumeurs avec de hauts niveaux de récepteur fonctionnels, le GIPR stimule les processus AMPc-dépendant, tel que démontré dans des cultures primaires de cellules cortico-surrénaliennes (103). Ainsi, en plus de stimuler la production de stéroïdes, il est suggéré que le GIP peut être impliqué dans la

stimulation de la prolifération cellulaire (voir point III.4). Une récente étude a utilisé un modèle élégant pour déterminer si le GIPR peut initier la tumorigenèse cortico-surrénaliennne (voir Figure 15). Pour ce faire, des cellules cortico-surrénaliennes exprimant ou non le GIPR ont été insérées sous la capsule rénale de souris surrénalectomisée. Les souris recevant des cellules normales ont développé un tissu surrénalien relativement normal. Toutefois, les cellules dont l'expression du GIPR a été induite par infection lentivirale ont donné lieu à une formation d'hyperplasies prononcées. Les tissus nouvellement formés se développaient sous la capsule rénale, sans invasion des autres tissus. Cette étude a ainsi démontré que l'expression aberrante du GIPR dans des cellules cortico-surrénaliennes est un événement génétique suffisant pour induire la formation d'hyperplasies surrénaliennes (93) : la surexpression du GIPR peut par elle-même initier la formation d'une tumeur. C'est pourquoi on parle dans ces cas de syndrome de Cushing GIP-dépendant. L'expression aberrante du GIPR dans les tumeurs cortico-surrénaliennes est la mieux caractérisée au plan moléculaire (voir point IV.3).



*Figure 15 : Modèle de transplantation de cellules cortico surrénaliennes menant à la formation de tissus transgéniques ACTH-dépendant et la formation de tumeurs induite par le GIP*

*Tiré de Mazzuco et al, 2007 (104)*

## b. Vasopressine

Certains patients avec AIMAH ou adénomes produisant un syndrome de Cushing en condition d'ACTH supprimé présentent une réponse accrue en cortisol lors de tests de stimulation avec vasopressine exogène ou stimuli physiologique de la sécrétion de vasopressine (posture debout, la charge sodique...). Le sous-type V1 est exprimé normalement dans le cortex surrénalien et possède des effets légers sur la stéroïdogénèse. En étudiant les profils d'expression des trois types de récepteur à vasopressine dans les tumeurs des patients atteints de syndrome de Cushing dont la production de cortisol est stimulée par la vasopressin, les sous-types V2 et V3 sont surexprimés et le sous-type V1 est exprimé à des niveaux comparables à la surrénale normale. Toutefois, la stimulation par un

agoniste spécifique du récepteur V2 (la desmopressine), ne peut stimuler la production de cortisol chez ces patients. De plus, bien que les niveaux des sous-types V2 et V3 soient augmentés dans les tumeurs, ils restent très faibles en absolu lorsque comparés aux niveaux du sous-type V1. Ainsi, il est improbable que le sous-type V2 soit le récepteur impliqué dans ces cas. L'hypothèse majeure est que la réponse stéroïdogénique exagérée est attribuée à une activité accrue d'un récepteur eutopique ou d'une protéine accessoire et non à l'expression élevée d'un récepteur ectopique, comme dans le cas du GIP (97).

### c. Catécholamine

L'expression aberrante des  $\beta$ -AR a été décrite pour la première fois chez un patient avec AIMAH et un syndrome de Cushing clinique. Ce patient avait une réponse en cortisol et aldostérone lors de l'élévation endogène des catécholamines (posture debout, exercice...). Des infusions d'isoprotérénol, un agoniste puissant des  $\beta$ -AR, ont fait élever les concentrations de cortisol et d'aldostérone chez ce patient mais pas chez les sujets normaux testés (105). Ces observations ont été confirmées chez plusieurs autres patients, notamment les membres de mêmes familles (97). Plusieurs réponses aberrantes ont été décrites conjointement à la réponse catécholamine-dépendante, entre autres à la sérotonine 5HT4 et la vasopressine. La surexpression des gènes codant pour les sous-types  $\beta$ 1 et  $\beta$ 2 a été observée spécifiquement dans les tumeurs des patients atteints. Il s'agit donc ici de l'expression d'un récepteur ectopique.

#### d. LH/hCG

En plus de sa fonction ovarienne principale, le récepteur à LH/hCG est également exprimé dans la zone réticulée où il peut stimuler la production de DHEA-S, dans la surrénale fœtale, mais pas adulte (106, 107). La première patiente décrite avec une hypercortisolémie régulée par des récepteurs à LH/hCG aberrants avait développé un syndrome de Cushing transitoire lors de grossesses et un syndrome permanent à sa ménopause. Elle a pu être traitée avec de l'acétate de leuprolide, un agoniste de l'hormone de libération des gonadotropines (GnRH) (108). Plusieurs autres cas ont été décrits, certains avec l'association d'autres récepteurs aberrants, notamment le GIPR et le récepteur à 5HT4. Deux patientes ont présenté, en plus du récepteur aberrant, une mutation dans *GNAS* (voir point III.2.e). La cause moléculaire principale des syndromes de Cushing répondant à LH/hCG reste toutefois l'expression d'un récepteur ectopique (92).

#### e. Sérotonine

La sérotonine est un neurotransmetteur important impliqué dans la médiation d'un grand nombre d'émotions dans le cerveau. Il possède un grand nombre de récepteurs différents, et est impliqué également dans une variété de processus biologiques. Dans la surrénale normale, la sérotonine est un agoniste puissant de la sécrétion de l'aldostérone *via* le récepteur 5-HT4. Il n'a qu'une fonction minime sur la sécrétion de cortisol (109). Une surexpression de ce récepteur a été démontrée dans plusieurs AIMAH et adénomes sécrétants chez des patients dont le cortisol augmentait en réponse aux agonistes du récepteur 5HT4 (cisapride, tégasérode et métoclopramide). Certains tissus avaient toutefois

une réponse positive à ces agonistes *in vivo* mais pas *in vitro*, dans des cultures primaires des tumeurs. Il a été démontré que dans ces cas, c'était le récepteur 5-HT7 qui contrôlait la stéroïdogénèse, tel que démontré *in vitro* par RT-PCR et immunohistochimie (97). Pour expliquer la dichotomie *in vivo* vs. *in vitro*, il est important de se souvenir que dans des modèles de culture primaire, les cellules sont retirées de leur milieu natif. Elles ne reçoivent donc plus de signaux des autres organes ou de la matrice extracellulaire, par exemple. Il est donc envisageable que la sérotonine stimule la sécrétion de facteurs extra surrénaliens (ie. produits par un autre organe que la surrénale) stimulant la production de cortisol. Des mécanismes de stimulation autocrines et paracrines par la sérotonine ont d'ailleurs été décrits (110).

#### f. Angiotensine

Il est suggéré que certains cas de syndrome de Cushing puissent aussi être anormalement sensibles à l'angiotensine II. L'expression du récepteur AT-1 est augmentée dans 5 cas d'adénomes producteurs de cortisol lorsque comparée à des tumeurs non sécrétantes et des surrénales normales (111). De plus, la stimulation de culture primaire d'AIMAH produisant du cortisol par l'ANG2 supporte l'hypothèse que le récepteur peut avoir une fonctionnalité aberrante dans les tumeurs productrices de cortisol (99). Toutefois, très peu de données cliniques existent pour appuyer cette hypothèse. Une seule étude *in vivo* a démontré qu'un antagoniste du récepteur AT-1 peut diminuer la production de cortisol dans un cas d'AIMAH avec syndrome de Cushing (112).

## **2. Réponses aberrantes retrouvées dans d'autres types de tumeurs cortico-surréaliennes**

Les réponses aberrantes décrites jusqu'ici n'incluaient que les tumeurs productrices de cortisol. On en retrouve également dans les tumeurs virilisantes et quelques données semblent indiquer qu'un tel mécanisme existe également dans les tumeurs productrices d'aldostérone.

### **a. Tumeurs productrices d'androgènes**

Des réponses aberrantes ont été démontrées dans plusieurs cas de tumeurs cortico-surréaliennes produisant des androgènes. Un premier cas présentait un adénome sécrétant de l'androstènedione, de la testostérone et du DHEA en réponse au GIP. L'octréotide, un antagoniste du GIPR, pouvait chez la patiente réprimer la hausse d'androgène suite à la prise de repas. De plus, le GIP pouvait stimuler la production de DHEA et de cortisol dans des cultures primaires des cellules de cet adénome (113). Des réponses aberrantes à la LH/hCG ont également été démontrées dans un adénome et dans deux cas avec AIMAH (108, 114, 115).

### **b. Tumeurs productrices d'aldostérone**

Les réponses aberrantes n'ont été que peu étudiées dans les tumeurs productrices d'aldostérone. Certaines données *in vitro* semblent toutefois suggérer qu'un tel mécanisme

existe dans ce type de tumeur. Les niveaux d'expression du récepteur eutopique à ACTH (*MC2R*) sont régulièrement élevés dans les aldostéronomes, ce qui pourrait expliquer potentiellement les changements circadiens d'aldostérone observés chez les patients avec un adénome producteur d'aldostérone (111, 116). Les niveaux des récepteurs à sérotonine 5HT4 ainsi qu'à la LH/hCG ou du GnRH sont régulièrement surexprimés dans les tumeurs productrices d'aldostérone (117, 118). Dans une récente étude *in vivo* où douze patients avec HAP ont été comparés à huit sujets normaux (119), trois ont présenté des réponses positives au GnRH, six ont répondu à la vasopressine, un à TRH et un au glucagon. La surexpression des récepteurs de ces hormones a été confirmée et corrélait avec les observations *in vivo*.

### 3. Le syndrome de Cushing GIP-dépendant

#### a. Fonctions du GIP dans la physiologie normale

Le peptide insulino-tropique glucose-dépendant (également appelé peptide inhibiteur gastrique) est une hormone sécrétée par les cellules K du duodénum suite à la prise de repas. Ces cellules et la sécrétion de GIP sont particulièrement sensibles au glucose et aux lipides. Le GIP ainsi relâché dans la circulation lie son récepteur couplé aux protéines G, le GIPR, dans ses organes cibles. La fonction principalement étudiée du GIP est sa capacité d'augmenter la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques. Cette fonction est dénommée fonction incrétine et est également médiée par un autre peptide, dérivé du gène du proglucagon, soit le peptide glucagon like de type 1 (GLP-1) (120). Une fois le GIP lié à son récepteur, il déclenche une cascade d'événements au niveau génomique et

protéique. En plus de stimuler la relâche d'insuline par un mécanisme calcium-dépendant, le GIPR est un acteur important dans le développement et la prolifération des îlots  $\beta$  du pancréas (121).

Dans le diabète de type 2, la fonction incrétine du GIP est abrogée, ce qui n'est pas le cas pour GLP-1. L'atrophie des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques est un événement important dans le développement de cette condition pathologique. C'est pourquoi le rétablissement et l'accentuation de la fonction incrétine ainsi que la stimulation de la prolifération des cellules  $\beta$  par ces hormones sont devenus des cibles de choix pour le traitement du diabète de type 2 (122). L'enzyme dégradant les incrétones au niveau du pancréas et autres tissus, la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4), est la principale cible pour ce type de traitement, ainsi que l'administration sous-cutanée d'analogues du GLP-1. La signalisation des mécanismes GIP-dépendants dans le diabète de type 2 étant perdue, c'est le GLP-1 qui est surtout ciblé, quoique la perte spécifique de la fonction incrétine GIP-dépendante indique que le GIP est plus important dans le développement de la condition pathologique. Les mécanismes par lequel ces fonctions sont perdues ne sont pas encore bien définis. Des souris déficientes pour le gène du GIPR développent une intolérance au glucose, ce qui vient corroborer les observations chez l'humain.

Ces souris ne développent toutefois pas d'obésité et d'intolérance à l'insuline lorsque nourries avec des diètes riches en lipides. De plus, dans le cas des souris modèles d'obésité (les souris *ob/ob*) nourries avec une diète riche en gras, le traitement par (Pro<sup>3</sup>)GIP, un antagoniste du GIPR, protège contre l'obésité, la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose (123). Ces observations ont mené à la découverte de la fonction du GIPR dans les adipocytes, dans lesquels le GIP stimule directement le stockage de nutriments (124). Une récente étude a de plus démontré que le *GIPR* est exprimé et

fonctionnel dans les stades précoces de différenciation des préadipocytes aux adipocytes, lorsque ceux-ci commencent à accumuler des gouttelettes lipidiques (mais pas dans les adipocytes non différenciés) (125). Le mécanisme par lequel le GIP stimule l'accumulation de lipides dans les adipocytes n'est encore que peu connu, mais il semble que ce soit un mécanisme qui dépende de l'activation de la lipoprotéine lipase (LPL) *via* la protéine kinase B (126).

Le GIPR est également impliqué dans la physiologie osseuse, étant exprimé et fonctionnel dans les cellules produisant la masse osseuse (les ostéoblastes) et celles responsables de la résorption osseuse (ostéoclastes). Par exemple, la masse osseuse est particulièrement élevée chez les souris surexprimant le GIP de façon constitutive (127). Dans les ostéoclastes, une étude a démontré que le GIP inhibe la résorption osseuse dans des cultures primaires d'ostéoclastes dans des essais de disques ostéologiques. L'ARNm et la protéine du GIPR ont également été observés dans les ostéoclastes. Ces observations sont en accord avec la réduction des marqueurs de résorption osseuse observée suite à la prise de repas (128). Dans les ostéoblastes, le GIPR est également exprimé, fonctionnel, et couplé à la formation d'AMPc et d'internalisation de calcium (129). Le GIP stimule la prolifération des ostéoblastes par un mécanisme indépendant de TGF- $\beta$  (130) et agirait au niveau du dépôt du calcium issu de la nutrition dans les os, tel que le démontre le haut niveau d'ostéoporose chez les souris dépourvues du récepteur au GIP (131). Ces souris ont relativement peu d'ostéoblastes et un grand nombre d'ostéoclastes, ce qui renforce le rôle du GIP comme un régulateur de la prolifération de cellules menant à l'augmentation de la masse osseuse.

Le récepteur au GIP est de plus exprimé dans plusieurs parties du système nerveux central. Dans les précurseurs de cellules neurales au niveau de la circonvolution de

l'hippocampe, il serait capable de stimuler la prolifération et la différenciation de ces cellules souches (132). Il existe également une production locale de GIP dans plusieurs parties du cerveau (133). Ces observations, considérées conjointement avec le risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer lorsqu'un patient a un diabète de type 2, soulèvent la possibilité d'utiliser la voie du GIP comme méthode de traitement de la maladie d'Alzheimer (134).

Dans la glande surrénale, le GIPR est, tel que décrit au point IV.1.a, impliqué dans la formation et le développement du syndrome de Cushing GIP-dépendant. Le récepteur est, dans ce cas, fonctionnel et surexprimé fortement comparativement à la surrénale normale. Il n'existe aucune mutation dans le gène du *GIPR* ou dans son promoteur pouvant expliquer son expression aberrante dans les cas de syndrome de Cushing GIP-dépendant (135). En condition physiologique normale, le GIPR n'est exprimé que très faiblement dans le cortex surrénalien humain et ne peut moduler la production de cortisol *in vivo*. Le GIPR est exprimé faiblement dans la surrénale fœtale (136). Chez le rat toutefois, le récepteur est présent dans la zone fasciculée et couplé à la production de corticostérone (137).

Plusieurs autres tissus expriment le GIPR chez l'humain, entres autres la trachée, le cœur, l'estomac, le thymus, les cellules sanguines, les poumons et les reins (136). Aucune fonction n'a toutefois été décrite jusqu'ici pour le GIPR dans ces organes. Le GIP est une hormone impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques, stimulant la fonction, la prolifération et le développement de ses organes cibles (voir Figure 16).

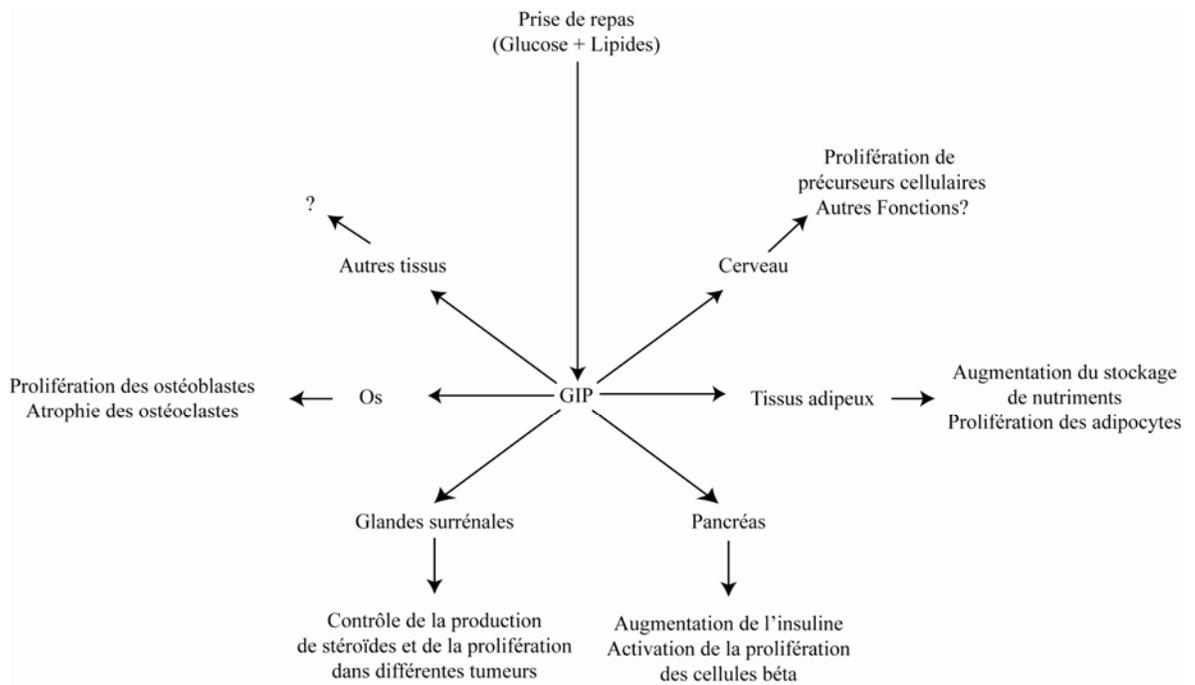


Figure 16 : Différentes fonctions physiologiques du GIP.

Adaptée de plusieurs sources (91-107)

## b. Contrôle de l'expression génique du récepteur au GIP

Le GIPR est exprimé et fonctionnel dans un grand nombre de tissus. Toutefois, les mécanismes contrôlant l'expression de ce gène ne sont que peu connus. L'expression du *GIPR* semble être sensible au glucose et aux triglycérides. Le promoteur du récepteur au GIP ne possède pas de boîtes TATA ou CAAT, éléments communs d'initiation de transcription (138). Des études de délétion partielle de ce promoteur ont identifié plusieurs régions importantes dans la régulation de l'expression du *GIPR* (139, 140). Au niveau du promoteur proximal, les cent premières paires de bases sont hautement conservées entre les espèces. On retrouve dans cette région des séquences riches en GC pouvant lier les facteurs

de transcription Sp1 et Sp3. Ces derniers sont responsables de l'expression tissu-spécifique du *GIPR* (140, 141). Au niveau distal, on retrouve à environ 5kb du site d'initiation de la transcription un élément de réponse à nCARE, un facteur de transcription important dans la régulation de l'expression de gène en réponse aux niveaux de calcium intracellulaire (Baldacchino, Lacroix *et al*, communication personnelle). Comme le GIP stimule l'augmentation du calcium intracellulaire, il a été proposé que ce mécanisme pourrait être impliqué dans la régulation négative de l'expression du *GIPR* observée suite à la stimulation du récepteur par le GIP.

D'une façon plus indirecte, il a également été démontré que les lipides et le glucose pourraient stimuler l'expression du *GIPR*. Dans des cellules issues des ilots  $\beta$  du pancréas, les acides gras libres augmentent l'expression du *GIPR* par un mécanisme dépendant de PPAR $\alpha$  (142). Il n'est pas encore connu si PPAR $\alpha$  agit directement ou indirectement sur le promoteur du *GIPR*. Dans cette étude, de hauts niveaux de glucose abrogeaient cette action des acides gras et réprimaient l'expression du *GIPR*. L'implication du glucose sur l'expression du *GIPR* est encore nébuleuse, alors que certaines études démontrent que le glucose peut stimuler ou réprimer cette expression (143). Toutefois, une récente étude plus exhaustive démontre que dans les cellules INS-1, un modèle cellulaire des cellules des ilots  $\beta$  du pancréas, le glucose avait un effet dose-dépendant de répression accru de l'expression du *GIPR* à partir de six heures d'incubation (144). Bien qu'aucune démonstration expérimentale ne soit fournie, les auteurs de cet article suggère là encore une implication de PPAR $\alpha$ . Ce mécanisme de répression pourrait expliquer physiologiquement la diminution de la production d'insuline en cas d'hyperglycémie. La capacité du glucose de réprimer l'expression du *GIPR* est une observation intéressante pour expliquer la répression de l'action du *GIPR* dans les cas de diabète de type 2. Dans les adipocytes, la capacité des

acides gras libres à stimuler l'expression du *GIPR* est en lien avec son rôle proposé de régulateur du stockage de lipides.

c. Mécanismes moléculaires impliqués dans le syndrome de Cushing GIP-dépendant

Le récepteur du GIP est impliqué dans le développement et la pathophysiologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant. La surexpression de ce récepteur est l'événement génétique dominant dans le développement d'hyperplasies surrénaliennes GIP-dépendantes, il est suffisant pour la formation de la tumeur et le maintien du syndrome de Cushing chez ces patients. Les mécanismes moléculaires menant à cette surexpression ne sont pas encore bien définis. Tel que mentionné plus tôt, on ne retrouve pas de mutation dans la séquence codante ou dans le promoteur du gène du *GIPR* pouvant expliquer la surexpression. Bien que *SP1*, facteur de transcription important dans le contrôle de l'expression du *GIPR*, soit surexprimé dans les cas de syndrome de Cushing GIP-dépendant, une telle surexpression est également parfois observée dans les hyperplasies ACTH-dépendant (maladie de Cushing), sans pour autant retrouver une surexpression du *GIPR* (136). Les séquences de *SP1* et *SP3* sont normales dans les syndromes de Cushing GIP-dépendant. C'est pourquoi il est proposé que des mécanismes épigénétiques soient responsables de la surexpression du *GIPR*, c'est-à-dire des mécanismes menant à l'activation des facteurs de transcription contrôlant l'expression du *GIPR*. Dans les cas d'hyperplasies bilatérales (AIMAH), il est postulé que l'événement génétique menant à la surexpression du *GIPR* a lieu tôt dans la vie embryonnaire, avant la latéralisation des surrénales, puisque les deux surrénales sont affectées. Dans les tumeurs unilatérales, ce serait un événement somatique tardif

apparaissant probablement au cours de la formation de la tumeur unilatérale. Le type cellulaire dans lequel cet événement a lieu (glomérulée, fasciculée ou réticulée) déciderait de la fonctionnalité de la tumeur concomitante (productrice d'aldostérone, de cortisol ou d'androgènes, respectivement). Selon ces observations, un modèle de formation de ces tumeurs peut être mis de l'avant (voir Figure 17).

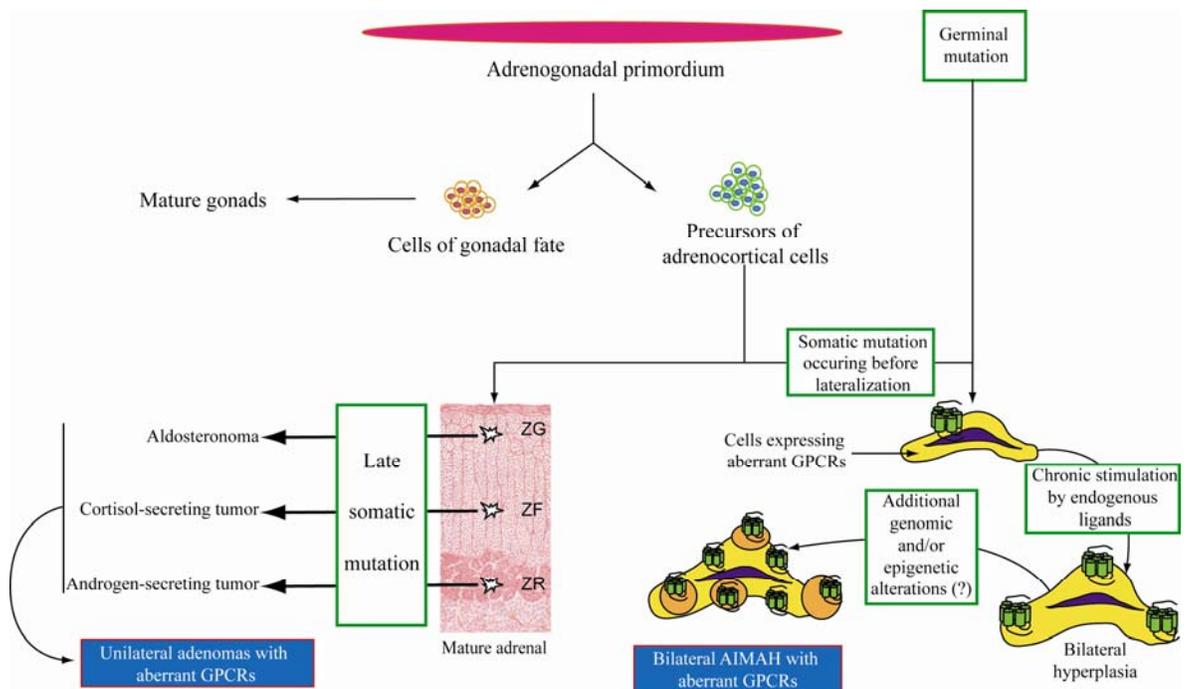


Figure 17 : Modèle de progression des événements génétiques menant à la formation de tumeurs cortico-surréaliennes surexprimant un GPCR.

Tirée de Lacroix et al. 2009 (97)

## v. Conclusions

La glande surrénale est un organe complexe produisant un grand nombre de

stéroïdes aux fonctions variées. La production de ces hormones ainsi que la prolifération cellulaire dans le cortex surrénalien est sous un contrôle strict, empruntant un réseau complexe de voies de signalisation. L'une de ces voies implique l'AMPc et est au centre du contrôle d'un grand nombre de processus physiologiques de la glande surrénale. Des dérégulations de cette voie de signalisation sont d'ailleurs la cause d'un grand nombre de tumeurs du cortex surrénalien menant, entre autres, à la formation d'hyperplasies du cortex surrénalien. Il est postulé que ce type de tumeur est la porte d'entrée de la tumorigenèse surrénalienne. Bien que les mécanismes moléculaires menant à la formation des hyperplasies surrénaliennes ne soient que peu connus, l'expression aberrante de GPCR est l'événement génétique le plus souvent observé. L'un de ceux-ci, le récepteur au GIP est le plus fréquemment observé dans les tumeurs productrices de cortisol.

## **Partie II : ÉNONCÉ DU PROJET DE RECHERCHE**

Les tumeurs du cortex surrénalien sont fréquentes dans la population et généralement bénignes, menant à un éventail de conditions pathologiques plus ou moins sévères selon le cas. Différentes études indiquent que les hyperplasies cortico-surréaliennes sont la porte d'entrée pour la formation de tumeurs du cortex cortico-surrénalien. En dehors des cas d'hyperplasies ACTH-dépendantes dues à une tumeur non surrénalienne sécrétant de l'ACTH, l'événement génétique le plus souvent observé dans les hyperplasies cortico-surréaliennes est la surexpression d'un ou plusieurs récepteur couplé aux protéines G. Les cas les mieux décrits d'hyperplasies répondant à des stimuli aberrants sont ceux où le récepteur au GIP est impliqué. Ainsi, identifier les causes moléculaires de l'expression aberrant du GIPR a le potentiel d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans les toutes premières étapes de tumorigenèse cortico-surrénalienne.

Les objectifs de cette étude sont donc :

- Déterminer la présence de réponse aberrante dans d'autres types de tumeurs cortico-surréaliennes : les tumeurs productrices d'aldostérone
- Identifier les sites d'expression du GIPR dans la surrénale normale et comprendre le rôle que le GIP joue dans la physiologie normale de la glande surrénale.
- Identifier de nouveaux gènes cibles dont les produits pourraient être impliqués dans l'expression aberrante du GIPR.
- Confirmer l'implication fonctionnel des nouvelles cibles identifiées au point

précédent

En identifiant un rôle potentiel du GIP dans la physiologie normale du cortex surrénalien ainsi que dans les tumeurs productrices d'aldostérone, cette étude permettra de mieux comprendre le lien qui existe entre le GIP et les stéroïdes surrénaliens. De plus, comprendre les étapes menant à la formation de tumeurs aux profils d'expression aberrants du *GIPR* pourra améliorer le diagnostic et le traitement des patients atteints de telles conditions pathologiques.

## Partie III : RÉSULTATS

### I. Réponses aberrantes dans les tumeurs productrices d'aldostérone

#### 1. Situation du sujet

Les mécanismes contrôlant la production d'aldostérone dans les aldostéronismes primaires avec des niveaux de rénine et d'angiotensine II réprimés sont encore largement inconnus. La surexpression de plusieurs récepteurs couplés aux protéines G ont été mesurées (MC2R, AT1R, HT4R, LHR, GnRH...). Les études jusqu'ici publiées n'ont toutefois que des données *in vitro*, une démonstration *in vivo* claire de la présence de réponses aberrantes dans les aldostéronismes primaires restant à être réalisée.

En utilisant le protocole de dépistage systématique de récepteurs aberrants préalablement appliqué chez les patients atteints de syndrome de Cushing primaire surrénalien (voir Tableau 2), nous avons identifié un premier cas d'hyperaldostéronisme primaire avec une production d'aldostérone influencée par différents stimuli. En plus de l'investigation *in vivo* complète de ce patient, un protocole de recherche *in vitro* complet a permis de confirmer la présence de réponses aberrantes ainsi qu'une démonstration de la surexpression des récepteurs impliqués.

Tableau 2 : Protocole de dépistage in vivo de récepteurs hormonaux aberrants dans le syndrome de Cushing surrénalien (\* : Prise d'échantillon de sang pour la mesure de cortisol, l'ACTH, les signes vitaux et autres hormones). Tiré de Lacroix et al (97)

Time (min)	Day 1	Day 2	Day 3
-60	Fasting-supine	Fasting-supine	Fasting-supine
-15	*	*	*
0	Upright *	GnRH 100 µg i.v. *	Glucagon 1 mg i.v. *
+30	Upright *	*	*
+60	Upright *	*	*
+90	Upright *	*	*
+120	Upright *	*	*
+150	<u>Supine</u> *	(meal)	
+180	Mixed meal *		Vasopressin 10 IU i.m. *
+210	*		*
+240	*		*
+270	*	*	*
+300	*	TRH 200 µg i.v. *	*
+330		*	
+360	ACTH 250 µg iv* 1-24	*	Metoclopramide 10 mg orally*
+390	*	*	*
+420	*	*	*
+450	*		*
+480	*		*

2. **Article 1**

**Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for glucose-dependent insulinotropic polypeptide in a patient with an aldosteronoma**

Antoine Lampron<sup>1</sup>, Isabelle Bourdeau<sup>1</sup>, Sylvie Oble<sup>1</sup>, Arianne Godbout<sup>1</sup>, Walter Schürch<sup>2</sup>,  
Philippe Arjane<sup>3</sup>, Pavel Hamet<sup>1</sup>, André Lacroix<sup>1</sup>

Article publié dans Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Volume 94, Numéro 3, page 750-756, 2009

<sup>1</sup>Division d'endocrinologie, Département de médecine, <sup>2</sup>Département de pathologie,

<sup>3</sup>Division d'urologie, Département de chirurgie,

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

## **Abstract**

*Context:* Primary adrenal Cushing's syndrome can result from the aberrant adrenal expression of several hormone receptors; this mechanism has not been explored in detail in aldosterone-producing tumors.

*Objective:* To evaluate a 56 year-old male patient with an aldosteronoma for the regulation of aldosterone secretion by aberrant hormone receptors.

*Results:* Renin-independent stimulation of aldosterone secretion was observed *in vivo* following mixed meal, oral glucose, or administration of GIP, vasopressin and tegaserod. The mixed meal-mediated stimulation of aldosterone was not present in five other cases of aldosteronoma. A smaller response of aldosterone following GIP infusion was observed in a normal subject. Aldosterone secretion was stimulated by GIP in primary cultures of this patient's aldosteronoma. Increased expression of GIP receptor (GIPR) was found in this aldosteronoma by real-time RT-PCR and immunohistochemistry. The GIPR protein was also found at lower levels in zona glomerulosa cells of the normal adjacent adrenal gland. Increased expression of 5-HT<sub>4</sub> and ACTH receptors was also present in this aldosteronoma.

*Conclusions:* This case report provides new evidence of the implication of aberrant hormone receptors in the regulation of this aldosteronoma and suggests that further detailed studies of the role of aberrant hormone receptors in this frequent pathology should be undertaken.

## **Introduction**

Aberrant expression of several G-Protein Coupled Receptors (GPCR) frequently regulates the production of cortisol in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasias (AIMAH) and adrenocortical adenomas causing Cushing's syndrome or androgen excess (1,2). In primary aldosteronism, the mechanisms regulating aldosterone production, while renin and angiotensin II are suppressed, are largely unknown. In vitro studies suggest that some GPCRs are abnormally expressed in aldosteronomas. Levels of the eutopic serotonin 5-HT<sub>4</sub> receptor were increased in aldosteronomas (3). V<sub>1</sub>-vasopressin receptor was expressed in aldosteronomas, but at levels similar to normal adrenal (4,5); administration of V<sub>1</sub>-receptor antagonist to 8 patients with primary aldosteronism did not reduce aldosterone levels (5). Increased expression of LH/hCG receptor mRNA was found in 9 of 18 aldosteronomas (6), but its effects on aldosterone secretion *in vivo* was not studied.

In this report, we present the results of combined *in vivo* and *in vitro* studies of the regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors in a case of aldosteronoma.

## **Clinical case**

A 56 year-old Caucasian male with a two-year history of high blood pressure and hypokalemia of 2.9-3.1 mmol/L was evaluated for primary aldosteronism. Plasma renin activity was reproducibly suppressed in sitting position at < 0.2 ng/ml/h (normal: 0.9 to 2.5), plasma aldosterone collected without notion of prandial status was initially 11.5-15.5 ng/dL (320-430 pmol/L; normal: 10-28 ng/dL or 277-776 pmol/L), while plasma potassium was corrected. Infusion of 2 liter 0.9% saline failed to suppress plasma aldosterone levels:

time 0: 8.2 ng/dL (228 pmol/L), time 4 hours: 11.7 ng/dL (324 pmol/L). Abdominal CT scan revealed a right 2-cm adrenal adenoma (density <10 Hounsfield units). Adrenal vein sampling with ACTH stimulation revealed an average aldosterone/cortisol ratio of 32 in the right compared to the left adrenal vein. A right laparoscopic adrenalectomy was performed and two months later blood pressure was 135/84 mm Hg and plasma potassium was 4.1 mmol/L without any medication. Unfortunately, the patient died shortly after in a car accident.

## **Methods**

### *In vivo studies*

The institutional ethics committee approved the investigation protocol and every participant provided an informed consent. Plasma levels of aldosterone, renin, cortisol and ACTH were measured at 30-60 min intervals for 2-3 h during tests that transiently modulate the levels of ligands for potential aberrant receptors (1,7). All tests were done fasting with the patient in supine posture for at least 60 minutes prior to the tests. A schematic view of the screening protocol is provided in Fig 1A. On day 1 an upright posture test during 2 hours was followed by a standard mixed meal, and by 1-24 ACTH, 250 µg iv (Cortrosyn®, Organon Canada, Scarborough, ON). On a second day, the administration of 100 µg GnRH iv (Factrel®, Wyeth-Ayerst, Montréal, QC) was followed by 200 µg TRH iv (Relefact®, Hoechst-Roussel, Montréal, QC). Stimulation by 6 mg tegaserod orally (Zelnorm®, Novartis Pharma Canada, Dorval, QC) and 10 IU arginine vasopressin im (Pitressin®, Parke-Davis, Scarborough, ON) were performed on a third day. Vasopressin test was performed during intravenous infusion of 4 mg dexamethasone (1 mg/h starting 3 h before

vasopressin injection). Further confirmation tests included the response to 2.5 µg sc of V2-vasopressin receptor agonist desmopressin (dDAVP, Ferring Inc, North York, ON), to 75 g oral glucose, and to human GIP (Bachem Fine Chemicals, Torrance, Ca) infused at a rate of 0.6 µg/kg over 60 min while the patient was receiving 150 mL/hr of 10% glucose (8). Prior to desmopressin stimulation and GIP infusion, subjects received dexamethasone 1 mg orally every 6 hours for 24 hours. A change of plasma aldosterone or cortisol levels of less than 25% was arbitrarily defined as no response, a 25 to 49% change, as a partial response, and a change  $\geq$  50%, as a positive response.

#### *Assays*

Plasma aldosterone and renin activity were measured by RIA kits (DSL, Webster, TX); cortisol, FSH, LH, TSH and prolactin by immunofluorometric assay (Bayer Immuno I system, Tarrytown, NY), and ACTH by immunoradiometric assay (Allegro, Nichols Diagnostics, San Juan Capistrano, CA).

#### *Adrenal cell dispersion studies*

A portion of the aldosteronoma and the adjacent adrenal were digested with 2mg/ml collagenase and cultured in DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% fetal bovine serum (Invitrogen), 500µM of ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), a 1% dilution of a mix of insulin, transferrin and selenium (Invitrogen) and 6% of a mix of penicillin, streptomycin and neomycin (Invitrogen). Following 24hr of culture, culture media were replaced by media containing either ACTH (1-24), angiotensin II (Sigma (St Louis, MO) or GIP (Bachem ,Torrance, CA). The media were collected 24 hr later and the concentrations of cortisol and aldosterone were quantified.

### *Real-time RT-PCR quantification*

mRNA was obtained from frozen tissues using TriZOL reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. cDNA was generated using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers (Invitrogen). We used the Quantitect SYBR green RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA) and a Rotor Gene 3000 cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) to perform the reactions following the manufacturer's protocols. We used QuantumRNA 18S Internal Standards (Ambion, Austin, TX) as internal controls. Results were normalized to a commercially available pool of normal adrenal glands (Clontech, Mountain View, CA). Primer sequences were as follow: GGGACAGGCCTGATCGCCCCT (forward) and TGTAGCCGCCTGAACAAACTC (reverse) for the GIPR, CAGCGTGAAGTCCATTTCCC (forward) and GTTTTCCGATTCGGTCCAGAC (reverse) for the V1-vasopressin receptor, CAAGGTGGAGATCGGAGTCCT (forward) and CAGGTCTGTCAGGGCTAAGTG (reverse) for the V2-vasopressin receptor, GGGCACCCATACACGTCTTC (forward) and GGATCATGTAGGAGGAGGCATA (reverse) for the V3-vasopressin receptor, GAGCACCTTTGTTACGTTATCT (forward) and CCATGAGTATCAGAAGAGCTGC (reverse) for the serotonin 5HT4 receptor and GACTGTCCTCGTGTGGTTTTG (forward) and TAGGCTGCCAGCATATCAGA (reverse) for the ACTH receptor. We used the same protocol for these primer pairs: 15 min. denaturation at 95C followed by 40 cycles of 15s. at 95C, 30s. at 59C, 45s at 72C, finished by a 7 min. elongation at 72C. Specificity of the reaction was assessed for each run by running a melting curve analysis of the PCR products. Efficiency of the reaction was routinely measured with dilution curve of the RT reactions. Efficiencies of at least 90% were obtained for every primer pairs and the

expression ratios were determined with these efficiencies using the Pfaffle method (9).

#### *GIP receptor immunohistochemistry*

A commercially available polyclonal antibody to the GIPR (LS-A3840, Lifespan Biosciences, Seattle, WA) was diluted 1/80 in 2% BSA (Invitrogen) and hybridized 1hr at room temperature after a citrate treatment for 40min in boiling water. Revelation was done using the SuperPicture HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum kit (Zymed Laboratoris Inc., San Francisco, CA).

## **Results**

#### *In vivo studies of aberrant regulation of aldosterone secretion*

The results of the *in vivo* tests in this patient with aldosteronoma are presented in Fig I. Increases in plasma aldosterone were observed following ingestion of a mixed meal (68%) and 75g of oral glucose (115%) (Fig 1B). GIP infusion increased aldosterone levels by 221% in this patient as compared to 77% in a normal healthy subject (Fig 1C), while it was without effect on plasma cortisol in either subject. Aldosterone levels were not modified by a mixed meal in 5 other patients with unilateral aldosteronoma (not shown). In this patient, aldosterone also increased following administration of 6 mg of tegaserod orally (557%, Fig 1D) and 10 IU vasopressin im (228%, Fig 1E), while his plasma renin activity levels remained  $\leq 0.2$  ng/mL/hour throughout the tests. Plasma ACTH levels remained unchanged or suppressed under dexamethasone. There were no increases of aldosterone in this patient following upright posture, GnRH, TRH (not shown) or desmopressin administration (Fig 1E); ACTH 1-24 provoked a larger increase in plasma levels of aldosterone (492%) than of

cortisol (355%). In three normal subjects, tegaserod administration resulted in a mean increase of 265% of aldosterone (Fig 1D).

#### *In vitro confirmation of the aberrant responses*

Incubation of dispersed aldosteronoma cells with GIP increased aldosterone production by 50%, but was without effect on the normal adjacent adrenal (Fig 2A). ACTH increased aldosterone production in aldosteronoma (46%) and adjacent normal adrenal (53%); angiotensin II did not modify aldosterone levels in either tissue. Cortisol levels increased in response to ACTH and angiotensin II in the adjacent normal adrenal but not the adenoma; cortisol was not modified by GIP (Fig 2B).

#### *Hormone receptor expression by real-time RT-PCR*

Over-expression of the GIPR gene was present in this patient's aldosteronoma when compared to a pool of normal adrenal glands (Fig 3A; ratio = 5.98,  $p=0.003$ ). This overexpression is similar to that observed in five previously reported cases of GIP-dependent AIMAH with Cushing's syndrome (ratio vs. normal adrenals = 6.48,  $p < 0.0001$ ) (10). GIPR levels were not increased in the normal adrenal adjacent to the aldosteronoma, in 5 aldosteronomas without a response of aldosterone to mixed meal, in 8 other aldosteronomas not tested *in vivo* with a mixed meal, or in the adrenals of 5 patients with persistent Cushing's disease. Over-expression of the ACTH receptor (ratio compared to normal adrenal pool = 5.12,  $p = 0.002$ ) and the 5-HT<sub>4</sub> serotonin receptor (ratio = 22.8,  $p = 0.0001$ ) were also found in this patient's aldosteronoma (Fig 3B,C). For the 3 subtypes of vasopressin receptors, over-expression of the V<sub>2</sub> subtype was found in this aldosteronoma (ratio of 16.7 although raw levels were much lower than those of the V<sub>1</sub> receptor), whereas

the V1 and V3 receptors were similar to control normal adrenal pool and adjacent normal adrenal (Fig 3D-F).

#### *Presence of the GIPR protein in the aldosteronoma*

Histology of the aldosteronoma revealed two cell populations: one of zona fasciculata type cells, with prominent cytoplasm, and the other composed of zona glomerulosa-like cells with a granular aspect (Fig 4A). Immunostaining identified the presence of the GIPR protein in clusters of small cells throughout the patient's aldosteronoma (Fig 4B), while it was absent in another aldosteronoma with low levels of GIPR expression by RT-PCR (Fig 4C). In the normal adrenal adjacent to the aldosteronoma (Fig 4D) and in two normal control adrenal glands (not shown), GIPR staining was present mainly in the zona glomerulosa, to a lesser extent in zona reticularis, and in endothelial cells of blood vessels; the capsule, zona fasciculata and medulla were all negative.

## **Discussion**

Primary aldosteronism is responsible for up to 10 % of hypertension (11,12). With the exception of rare genetic forms of glucocorticoid-remediable aldosteronism (familial aldosteronism type 1, FHI), or congenital adrenal hyperplasia due to CYP11B1 or CYP17 deficiencies, the mechanisms controlling aldosterone secretion when renin levels are suppressed in aldosteronomas or idiopathic bilateral aldosteronism are largely unknown (11,12). Based on the role of aberrant hormone receptors in regulating steroidogenesis in adrenal tumors or AIMAH secreting cortisol or androgen (1,2,4,7,8), we adapted the *in vivo* screening protocol to evaluate the presence of aberrant regulation of aldosterone secretion

in this index case with a unilateral aldosteronoma. The stimulation of aldosterone secretion by a mixed meal, but also by oral glucose, a preferential stimulator of GIP release by intestinal K cells, suggested the presence of aberrant GIP receptors in this aldosteronoma. This was supported by the response of aldosterone, but not of cortisol, during GIP infusion in this patient. The overexpression and functionality of GIPR in this aldosteronoma was confirmed *in vitro* by cell dispersal, real-time RT-PCR, and immunohistochemistry studies. Specific staining for the GIPR by immunohistochemistry was also found in the zona glomerulosa cells of the adrenal cortex adjacent to the aldosteronoma and in other normal adrenal glands. The small increase of aldosterone during GIP infusion in only one normal control suggests that GIPR is functional in normal zona glomerulosa, but this requires confirmation by further studies with a larger number of normal subjects. The presence of GIPR in adrenocortical zona glomerulosa and vascular endothelial cells may explain the low amounts of GIPR previously found by RT-PCR in normal adrenal glands (1,10,13). As GIPR is expressed normally in zona glomerulosa in humans, but not in zona fasciculata, its overexpression in aldosteronomas constitutes an increased expression of a eutopic receptor (as for 5-HT<sub>4</sub> receptor), while it is expressed ectopically in zona fasciculata cells in cortisol secreting tumors. We also found that the overexpression of GIPR is not present in the majority of aldosteronomas and probably results from a rare somatic event, as found previously for GIP-dependent cortisol secreting adenomas or macronodular hyperplasia (14). It would have been interesting to investigate the normalization of the GIP responsiveness post-operatively in this patient, but his premature accidental death prevented this study.

Other aberrant responses were also found in the same patient. The overexpression of the 5-HT<sub>4</sub> receptor in this aldosteronoma confirms previous studies in patients with

aldosteronomas (3). We also found a larger increase of aldosterone in this patient compared to three control subjects induced by tegaserod, a specific 5-HT<sub>4</sub> agonist, as reported previously with cisapride or the less specific agonist metoclopramide (15). This aldosteronoma was also found to increase its secretion of aldosterone *in vivo* following vasopressin administration. As reported previously, V<sub>1</sub>-vasopressin receptor levels were not over-expressed by RT-PCR in this aldosteronomas compared to normal adrenals (4,5). Despite relatively increased levels of V<sub>2</sub>-vasopressin receptor in the aldosteronoma compared to normal adrenals, the lack of effect of desmopressin on aldosterone secretion indicates that the V<sub>2</sub>R did not mediate the effect of vasopressin on aldosterone secretion. The aldosterone response to vasopressin despite normal levels of eutopic V<sub>1</sub>R could result from an increased coupling mechanism to the steroidogenic effector system (5). Serotonin and vasopressin have also been demonstrated to be secreted by mast cells or chromaffin cells in normal adrenals and in adrenocortical adenomas and hyperplasias, suggesting paracrine regulation of aldosterone secretion (5,16,17). In accordance with previous study (18), we also found increased ACTH receptor (MC<sub>2</sub>R) levels in the aldosteronoma, and ACTH 1-24 evoked a larger increase of aldosterone than cortisol in this patient. It will thus be important when investigating patients with primary aldosteronism for the presence of aberrant receptors to suppress endogenous ACTH levels with dexamethasone.

The identification of aberrant hormone receptors in aldosterone-secreting tumors should modify significantly its investigation. Variable blood levels of ligands for the aberrant receptors could modify greatly the plasma aldosterone/renin ratios. In contrast to GIP-dependent Cushing's syndrome (7,8), GIPR overexpression in this aldosteronoma did not result in ACTH suppression; fasting aldosterone levels were not suppressed, but fluctuated probably following levels of ACTH, GIP, serotonin or vasopressin.

As demonstrated for cortisol-secreting macronodular hyperplasias or adenomas (1,7,19,20), specific pharmacological blockade of the aberrant receptors could offer new therapeutic approaches in the treatment of primary aldosteronism, particularly secondary to bilateral nodular hyperplasia. Further systematic studies of large series of patients with primary aldosteronism should be conducted to identify the role and diversity of aberrant hormone receptors in this frequent pathology.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge Drs Claudia Gagnon and Jean-Luc Ardilouze from Centre Universitaire de Sherbrooke for initial investigation and patient referral, and the assistance of nurses Shirley Ferguson and Sylvie Blaqui re for the *in vivo* tests. We also wish to dedicate this article to the memory of the patient who contributed with great dedication to the conduct of this investigation.

### **Reference List**

1. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P 2001 Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr. Rev.* 22:75-110
2. Tsagarakis S, Tsigos C, Vassiliou V, Tsiotra P, Pratsinis H, Kletsas D, Trivizas P, Nikou A, Mavromatis T, Sotsiou F, Raptis S, Thalassinou N 2001 Food-dependent androgen and cortisol secretion by a gastric inhibitory polypeptide-receptor expressive adrenocortical adenoma leading to hirsutism and subclinical Cushing's syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Endocrinol Metab* 86:583-589

3. Cartier D, Jegou S, Parmentier F, Lihmann I, Louiset E, Kuhn J M, Bastard C, Plouin P F, Godin M, Vaudry H, Lefebvre H 2005 Expression profile of serotonin4 (5-HT4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *Eur. J Endocrinol* 153:939-947
4. Mune T, Murase H, Yamakita N, Fukuda T, Murayama M, Miura A, Suwa T, Hanafusa J, Daido H, Morita H, Yasuda K 2002 Eutopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5706-5713
5. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1566-1572
6. Saner-Amigh K, Mayhew BA, Mantero F, Schiavi F, White P C, Rao C V, Rainey W E 2006 Elevated expression of luteinizing hormone receptor in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1136-1142
7. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:375-382
8. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, Flanagan R, Hamet P 1992 Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N. Engl. J Med.* 327:974-980
9. Pfaffl M W 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45
10. Lampron A, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. 2006 Whole genome expression profiling of GIP- and ACTH-dependent adrenal hyperplasias reveals novel

targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3611-3618

11. Mulatero P, Dluhy R G, Giacchetti G, Boscaro M, Veglio F, Stewart P M 2005 Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation. *Trends Endocrinol Metab* 16:114-119

12. Fardella C E, Mosso L, Gomez-Sanchez C, Cortes P, Soto J, Gomez L, Pinto M, Huete A, Oestreicher E, Foradori A, Montero J 2000 Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1863-1867

13. N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, de Herder W.W, Lacroix A 1998. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2781-2785.

14. Groussin L, Perlemoine K, Contesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot , Schlienger J L, Luton J P, Bertagna X, Bertherat J 2002 The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1980-1985

15. Lefebvre H, Cartier D, Duparc C, Lihmann I, Contesse V, Delarue C. Godin M, Fischmeister R, Vaudry H, Kuhn J M 2002 Characterization of serotonin(4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: *in vivo* and *in vitro* studies. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1211-1216

16. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Perraudin V, Bertherat J, Lefebvre H. 2008 Expression of vasopressin receptors in ACTH-independent macronodular bilateral adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: molecular, immunohistochemical and pharmacological correlates. *J Endocrinol.* 196:1-9

17. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, Lefebvre H 2006 Expression of serotonin<sub>7</sub> receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4578-4586.
18. Arnaldi G, Mancini V, Costantini C, Giovagnetti M, Petrelli M, Masini A, Bertagna X, Mantero F 1998 ACTH receptor mRNA in human adrenocortical tumors: overexpression in aldosteronomas. *Endocr. Res.* 24:845-849
19. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P. 1997 Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N. Engl. J Med.* 337:1429-1434
20. Lacroix, A, Hamet P, Boutin J M 1999 Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N. Engl. J Med.* 341:1577-1581

### **Figure Legends**

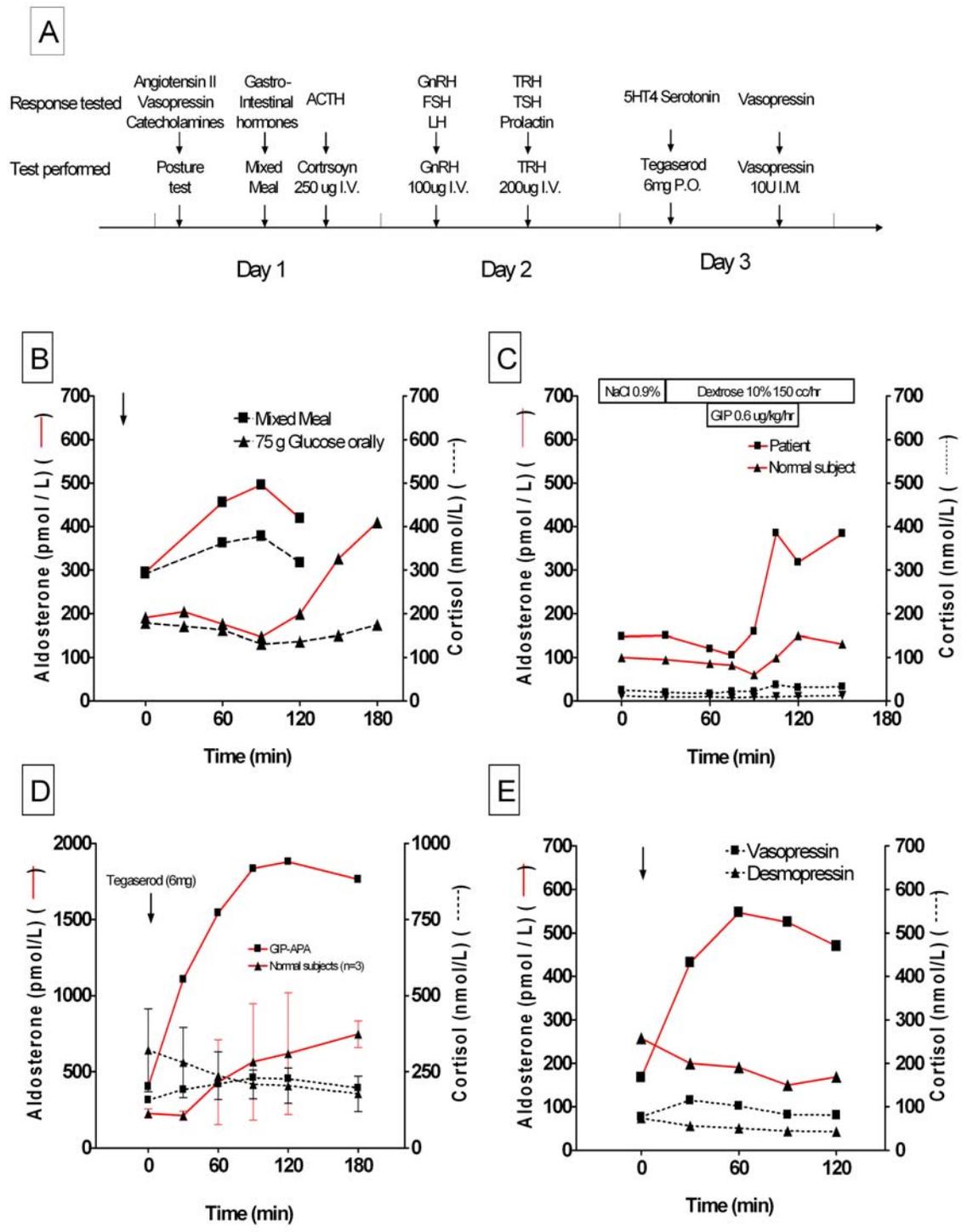
*Figure 1* : *In vivo* investigation in a patient with unilateral aldosteronoma demonstrate regulation of aldosterone production by GIP, vasopressin and serotonin. A : Schematic representation of the investigation protocol workflow. B : Effects of a mixed meal (squares) and 75g of glucose taken orally (triangles) on plasma aldosterone (red full lines) and cortisol (dotted line) levels. C: Infusion of GIP at 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hr}$  resulted in a larger increase in plasma aldosterone in the patient (red lines) as compared to a normal healthy subject (black lines) while cortisol levels remained unchanged. GIP infusions were performed following suppression of ACTH by pretreatment with 1 mg of dexamethasone taken orally

every 6hr for 24hr prior to the tests. D: The oral intake of 6mg of tegaserod resulted in a larger increase in plasma aldosterone levels (red lines) in the patient (squares) than in three healthy subjects (triangles), but had no effect on cortisol levels (dotted lines). E: Injection of 10IU of vasopressin im (squares), but not of 2.5 mcg of desmopressin sc (triangles), resulted in an elevation in plasma aldosterone levels (red lines). The vasopressin and desmopressin tests were performed under suppression of ACTH by dexamethasone and had no effect on cortisol levels (dotted lines). In each figure, the arrows indicate the time of ingestion or injection.

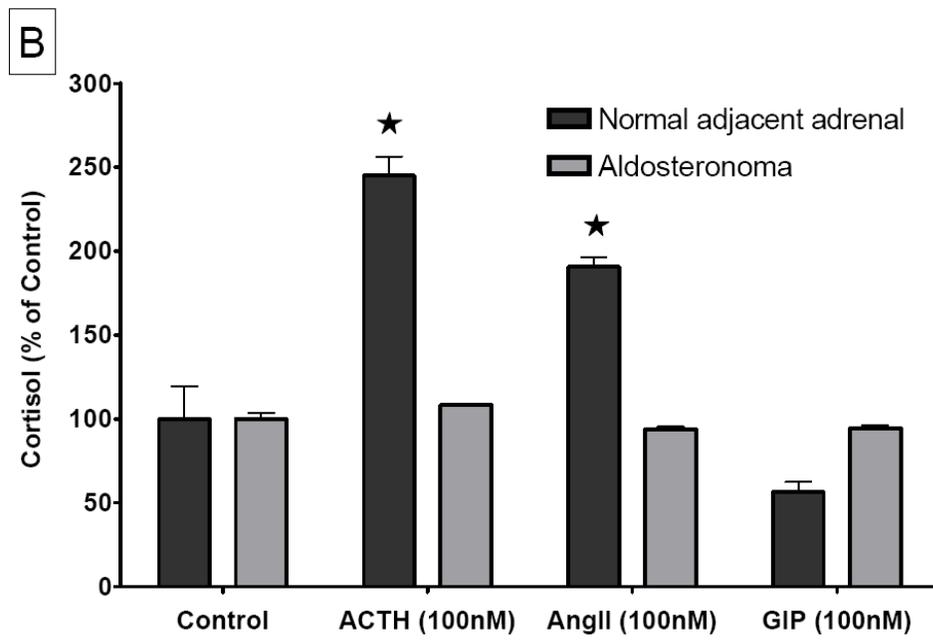
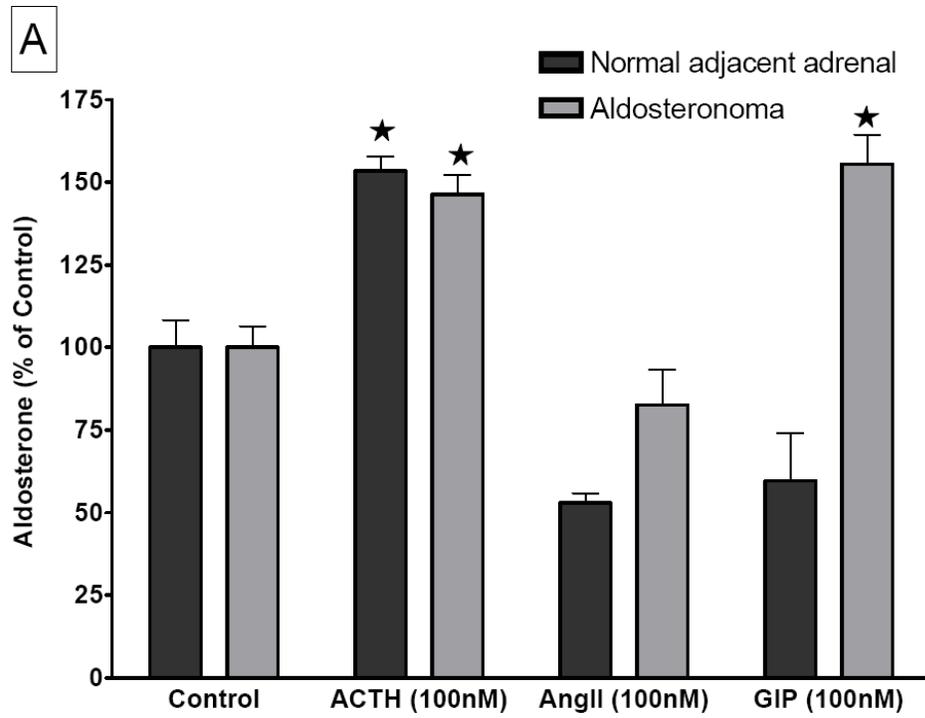
*Figure 2:* Aberrant regulation of aldosterone secretion by GIP was present in cells dispersed from the aldosteronoma of the patient but not from its normal adjacent adrenal. Dispersed cells were incubated in primary cultures as described in methods. After 24hr of incubation, aldosterone (A) and cortisol (B) levels were quantified. Stars: p value < 0.05 when comparing means of duplicates to the control values.

*Figure 3:* Expression levels of various G-protein coupled receptors evaluated by real-time RT-PCR. The expression levels were determined for the GIP-receptor (A), the ACTH receptor (B), the 5-HT4-serotonin receptor (C) and the V1-, V2- and V3-vasopressin receptors (C, D and E, respectively). The results presented are the means of triplicates of experiments performed on two different extractions of each mRNA. Stars: p values < 0.05 when comparing values obtained in each tissue with those in the control. CTL: pool of normal control adrenals from Clontech; APAs: Aldosterone Producing Adenomas; AIMAH: ACTH-independent Macronodular Adrenal Hyperplasia.

*Figure 4:* Distribution of the GIPR protein by immunohistochemistry. A: HPS staining of the index case's aldosteronoma showing two types of cell populations (white and blue arrows). B,C and D: Immunostaining of the index case's aldosteronoma (B), an aldosteronoma from another patient with low levels of GIPR mRNA by RT-PCR (C) and the normal adrenal gland adjacent to the index case's aldosteronoma (D) by a GIPR-specific antibody.

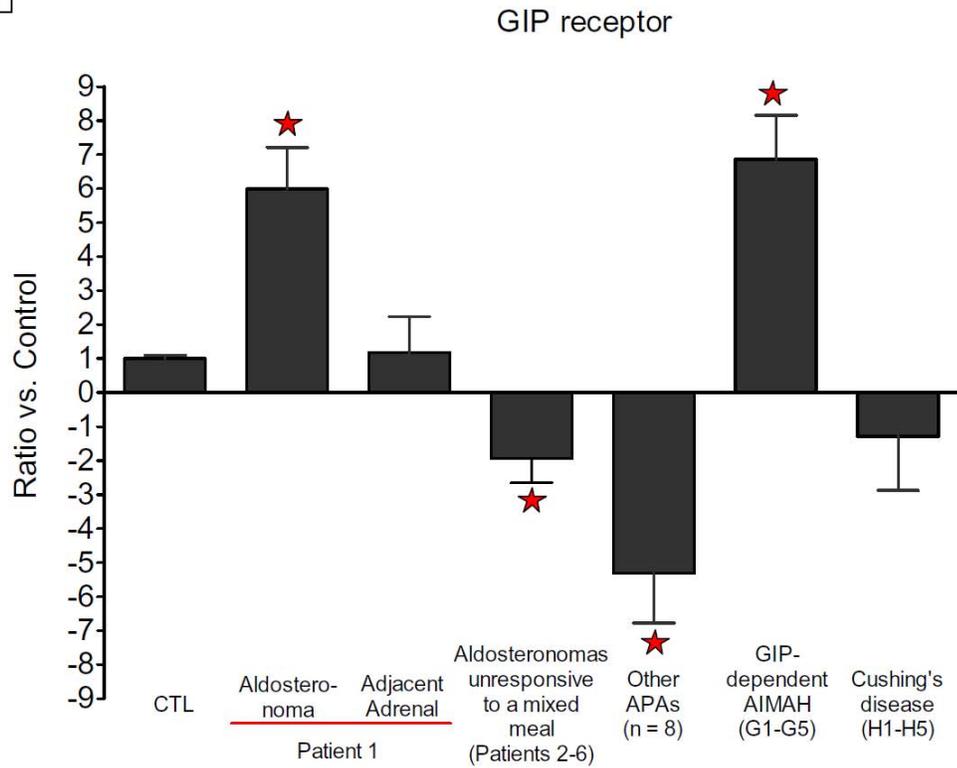


**Figure 1**

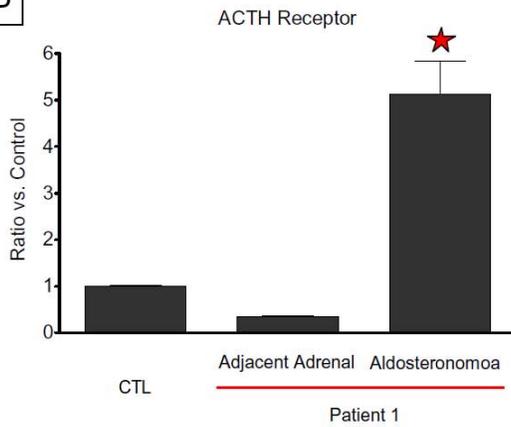


**Figure 2**

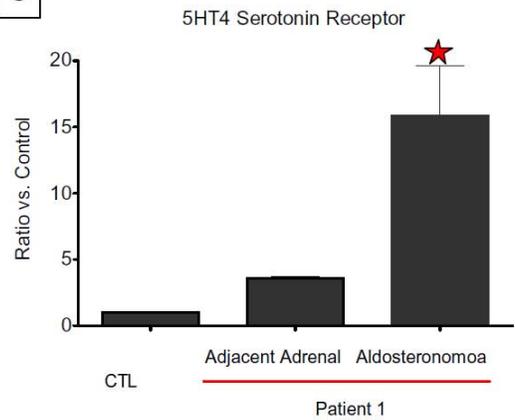
A



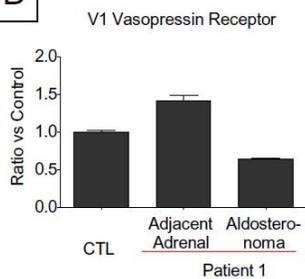
B



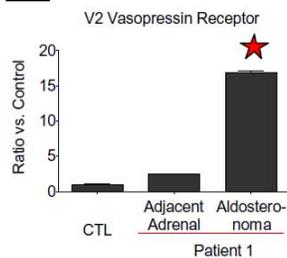
C



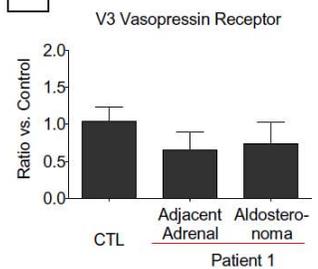
D



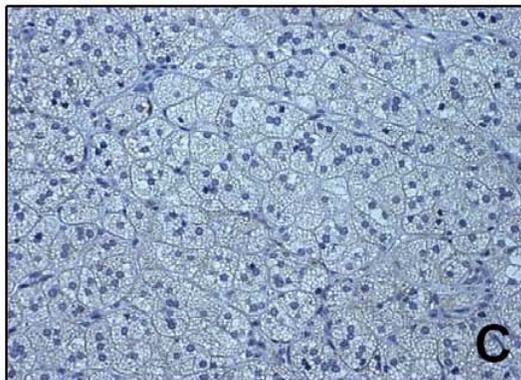
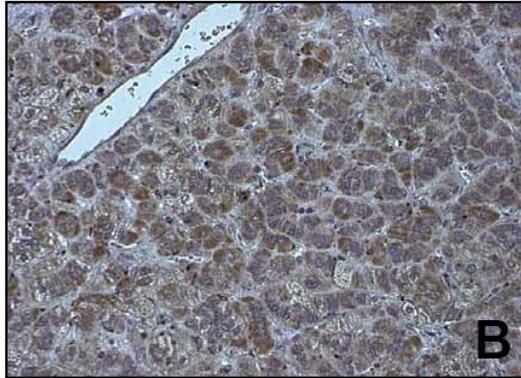
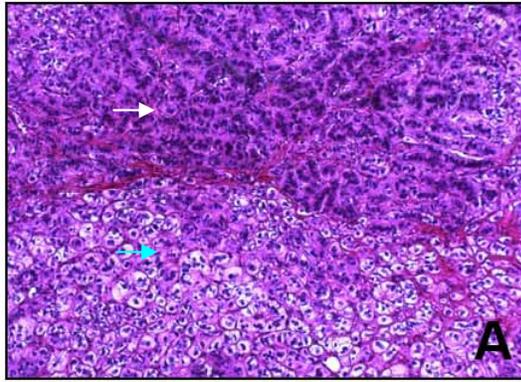
E



F



**Figure 3**



**Figure 4**

### 3. **Discussion**

L'expression aberrante de GPCR dans les tumeurs cortico-surréaliennes est un sujet d'intérêt dans l'investigation clinique et le traitement de patients avec des tumeurs bénignes. La présence d'un tel mécanisme avait auparavant été décrite dans plusieurs patients atteints de syndrome de Cushing et quelques uns avec des tumeurs productrices d'androgènes (21). Des données *in vitro* indiquaient qu'un tel mécanisme peut exister dans les tumeurs productrices d'aldostérone. Afin de démontrer le rôle physiologique de récepteurs aberrants dans la pathophysiologie des tumeurs productrices d'aldostérone, un protocole d'investigation *in vivo* et *in vitro* complet a été appliqué à un premier cas d'hyperaldostéronisme primaire.

Le cas probant était un homme de 52 ans avec un adénome unilatéral produisant de l'aldostérone. Ses niveaux de rénine étaient supprimés en dessous du seuil de détection. Le protocole de recherche *in vivo* a identifié des réponses aberrantes à la posture debout, la prise de repas ainsi qu'aux stimulations par la vasopressine et le tegaserod (agoniste spécifique du récepteur à 5HT4). La réponse au repas a été confirmée par la prise orale de glucose et l'infusion de GIP pour produire des niveaux circulants semblables aux niveaux post-prandiaux physiologiques de GIP. La réponse directe au GIP a été confirmée par la production importante d'aldostérone des cellules de cet adénome mises en culture primaire et stimulée par le GIP. La surexpression du récepteur au GIP au niveau de l'ARNm a été confirmée par RT-PCR. Par immunohistochimie, un marquage intense a été observé ce qui n'était pas le cas pour d'autres hyperaldostéronismes ne répondant pas à la prise de repas. Le récepteur a également été détecté dans la zone glomérulée du cortex surrénalien normal adjacent à l'adénome. De plus, une faible élévation des niveaux circulant d'aldostérone

chez le sujet sain a été observée suite à l'infusion de GIP. Ces résultats suggèrent un rôle du GIP dans la régulation de la production d'aldostérone dans les surrénales normales. Cette hypothèse sera étudiée en détail dans le point suivant.

Ces données ont démontré que la surexpression de GPCRs est un mécanisme également impliqué dans les patients atteints d'hyperaldostéronisme primaire. Suite à la publication de notre étude, une autre équipe a effectué une étude similaire qui a détecté des réponses aberrantes à la TRH chez un patient et au GnRH chez trois patients (119). L'investigation clinique de récepteurs aberrants continue dans notre laboratoire. Neuf patients ont complété le protocole d'investigation (8 adénomes et une hyperplasie idiopathique bilatérale). Tous ont répondu fortement à l'ACTH ainsi qu'au tegaserod, 8 ont présenté une réponse aberrante au test de posture, 7 ont eu une réponse accrue à la vasopressine et, jusqu'ici, uniquement le cas publié a présenté une réponse à la prise de repas. Les confirmations *in vitro* sont en cours pour les autres patients.

Il semble donc que l'expression aberrante de GPCR est un événement présent dans les hyperaldostéronismes primaires qui peut mener au développement de réponses à des stimuli qui n'ont normalement qu'un effet mineur ou nul sur la production d'aldostérone. En prenant en exemple le traitement de patients atteints de syndrome de Cushing dépendant des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques par des bêta bloqueurs, notre étude permet d'envisager de toutes nouvelles voies de traitement pour les patients atteints d'aldostéronisme primaire. Ceci est particulièrement intéressant dans les cas d'hyperplasies idiopathiques bilatérales. Bien que les données ne soient que partielles pour ce type de tumeur, la capacité des récepteurs aberrants d'initier la prolifération d'hyperplasies produisant du cortisol indique qu'un tel mécanisme est possible pour les hyperplasies productrices d'aldostérone et pourrait être enrayé avec des antagonistes spécifiques des récepteurs aberrants.

## **II. Rôle du GIP dans la physiologie normale du cortex surrénalien**

### **1. Situation du sujet**

Le récepteur au GIP est exprimé faiblement dans le cortex surrénalien. Ces faibles niveaux ont été attribués initialement à la présence potentielle du GIPR dans les cellules endothéliales. Toutefois, lors de l'étude de l'implication du GIPR dans les hyperaldostéronismes primaires détaillée au point précédent, un marquage immunohistochimique du GIPR a été relevé dans les cellules de la zone glomérulée de la surrénale normale adjacente à l'adénome. L'infusion de GIP chez un sujet sain a de plus élevé légèrement la production d'aldostérone. Ces résultats initiaux ont relevé la possibilité que le GIP est capable d'initier la production d'aldostérone dans la physiologie normale.

Cette étude vise l'élucidation de cette fonction du GIP dans la surrénale normale ainsi que sur les mécanismes impliqués dans le contrôle de la production d'aldostérone par le GIP. La première partie de l'étude s'est penchée sur les résultats *in vivo* de l'injection de GIP à des niveaux reflétant les niveaux physiologiques de GIP circulant suite à la prise de repas. Les niveaux des hormones stéroïdiennes et d'hormones contrôlant la fonction surrénalienne ont été mesurés à différents intervalles de temps. La deuxième partie s'est concentrée sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la stimulation de la production d'aldostérone stimulée par le GIP.

2. **Article 2**

**Short-term infusion of GIP stimulates renin and aldosterone production in normal subjects**

Antoine Lampron<sup>1</sup>, Isabelle Bourdeau<sup>1</sup>, Sylvie Oble<sup>1</sup>, Walter Schürch<sup>2</sup>, Philippe Arjane<sup>3</sup>,  
Pavel Hamet<sup>1</sup>, André Lacroix<sup>1</sup>

Article soumis dans European Journal of Endocrinology

2009

<sup>1</sup>Division d'endocrinologie, Département de médecine, <sup>2</sup>Département de pathologie,

<sup>3</sup>Division d'urologie, Département de chirurgie,

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

## **Abstract**

*Background:* Whereas GIP receptor (GIPR) is not expressed in human adrenal zona fasciculata cells, we recently unexpectedly found it may be present in zona glomerulosa cells of the adult adrenal cortex.

*Objective:* To examine GIPR distribution in normal adrenal gland and its role in the regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in normal subjects.

*Design:* Distribution of GIPR was examined by immunohistochemistry (IHC) of 5 normal human adrenals and kidneys. Plasma levels of aldosterone and renin were determined in 4 normal subjects during the infusion of GIP (0.6 µg/kg/h during 120 min). GIP effects on aldosterone and its signaling pathways were also studied in dispersed normal adrenal cells.

*Results:* GIPR was detected in zona glomerulosa cells and at lower intensity in zona reticularis, but not in zona fasciculata. GIP infusion produced a mean 78.6% increase of aldosterone and a mean 3.1-fold increase of plasma renin activity in normal subjects, while cortisol, DHEAS and ACTH levels remained unchanged. The incubation of dispersed adrenal cells with GIP increased aldosterone production and this was inhibited by a protein kinase A inhibitor. GIPR was also found by IHC in kidney macula densa and some nephron segments.

*Conclusions:* This study confirms GIPR expression in zona glomerulosa cells as well as in kidney macula densa. Acute GIP infusion can stimulate both plasma renin activity and aldosterone secretion. Further studies will be necessary to understand the longer-term effect of physiological elevations of GIP on the renin-angiotensin system under various physiological conditions.

## **Introduction**

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) has been most extensively studied for its role in increasing insulin release by pancreatic  $\beta$ -cells following oral ingestion of food, particularly glucose and lipids (1). This incretin function is shared with glucagon-like peptide 1 (GLP-1), another gut derived peptide (1). In rat, GIP receptor (GIPR) mRNA is expressed not only in pancreatic  $\beta$ -cells, but also in various other tissues, including the gut, heart, pituitary, and brain (2). In human adult tissues, GIP-R mRNA was found to be expressed in the pancreas, trachea, brain, heart, gut, spleen, thymus, blood cells, lung, and kidney (3); in human fetal tissues, it was found in the lung, heart and kidney (4). In the rat adrenal cortex, GIPR is expressed and coupled to corticosterone secretion (5). However, in human fetal or adult adrenal cortex, GIPR was only faintly expressed but not functionally coupled to cortisol or androgen production (6, 7).

The ectopic expression of GIPR in adrenal adenomas originating from zona glomerulosa, zona fasciculata or zona reticularis cells or in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) was shown to be responsible for GIP-dependent excess production of cortisol, aldosterone or adrenal androgens in several patients (6, 8, 9). In a recently reported case of GIP-responsive aldosteronoma (9), we unexpectedly found by immunohistochemistry the presence of GIPR in the zona glomerulosa of the normal adrenal adjacent to the aldosteronoma. Acute infusion of GIP produced a large increase of aldosterone levels in the patient with the aldosteronoma and a small increase in plasma aldosterone levels in one normal control subject. These preliminary results prompted us to examine the tissue distribution of GIPR in normal human adrenal and to examine if acute administration of GIP can regulate the renin-angiotensin-aldosterone system in normal

subjects.

## **Patients and Methods**

### *Distribution of GIPR by immunohistochemistry (IHC)*

Portions of five normal adrenal glands or kidneys obtained from patients undergoing radical nephrectomy for renal cancers were fixed in paraformaldehyde and embedded in paraffin. In each case, histological examination by an experienced pathologist (WS) confirmed the absence of necrosis or abnormalities in the adrenal glands. 10 µm slides were prepared on a microtome and placed on superfrost glass slides (VWR, West Chester, PA). A commercially available polyclonal antibody to the GIP receptor (LS-A3840, Lifespan Biosciences, Seattle, WA) was diluted 1/70 in 1% BSA (Invitrogen, Carlsbad, CA) and hybridized 1hr at room temperature after a 40min citrate treatment in boiling water. Revelation was done using the SuperPicture HRP Polymer Conjugate Broad Spectrum kit (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). As negative control, the primary antibody was replaced with 1% BSA. Normal pancreas was included as a control in every experiment.

### *In vivo study design*

The institutional ethics committee approved the study protocol and all subjects provided written informed consent. Four healthy subjects (2 males, 2 females, 42-56 y.o.) were pre-treated with 1mg oral dexamethasone every 6 hours for 24hr prior to the tests in order to suppress endogenous ACTH. At 8h00, overnight fasted subjects were placed in supine posture and were administered intravenous NaCl 0.9% at 80 cc/hr during 60 minutes *via* an antecubital vein. This was replaced at zero time point by 10% dextrose infusion at 150cc/hr.

Starting 60 minutes later, GIP was infused at 0.6ug/kg/h during 120 minutes in order to reproduce physiological post-prandial levels of GIP as described previously (7); dextrose 10% infusion was maintained during GIP infusion since its incretin effect requires concomitant glucose infusion. Blood samples were collected from the opposite arm for measurements of aldosterone, renin, cortisol, ACTH and DHEAS concentrations at various time points.

#### *Effects of GIP on normal adrenal cell dispersion*

Adrenal cell dispersions were performed as described previously (9). Briefly, normal adrenal glands were freed from surrounding fat, cut in small pieces with scissors and subjected to an enzymatic digestion in DMEM/F12 with 2mg/mL collagenase (InVitrogen, Carlsbad, CA) and 70ug/mL DNase I (Roche, Indianapolis, IN). Dispersed cells were placed in DMEM/F12 culture media (InVitrogen), supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (InVitrogen), 500uM ascorbic acid (Sigma, St Louis, MO), 1% of a mix of insulin, transferrin and selenium (InVitrogen) and 6% of a mix of penicillin, streptomycin and neomycin (InVitrogen). GIP (Bachem, Torrance, CA) or vehicle was added and the media were collected 7 hr later to measure the concentrations of cortisol and aldosterone in the media. A dose response curve to GIP and co-stimulation of GIP with either H89 or wortmanin, inhibitors of Protein Kinase A and Protein kinase C respectively, were also performed.

#### *Assays*

Plasma or culture media levels of aldosterone, DHEAS and renin activity were measured by commercial RIA kits (DSL, Webster, TX); plasma cortisol was measured by

immunofluorometric assay (Bayer Immuno I system, Tarrytown, NY), and ACTH by immunoradiometric assay (Allegro, Nichols Diagnostics, San Juan Capistrano, CA).

### *Statistical analysis*

Statistical tests were calculated using a heteroschedastic unpaired t-test between maximal value attained during test and the initial value (for the *in vivo* tests) or between treated and untreated conditions (for cell dispersion studies). 0.05 was used as a threshold for the p-value to conclude for significance. For the *in vivo* studies, maximal values attained were compared to the values at t=0. For *in vitro* studies, untreated cells were used as control. Correlations between hormone changes during tests were measured by a Pearson correlation test.

## **Results**

### *Immunohistochemistry of normal adrenals*

Immunohistochemistry study of 5 normal adrenal glands confirmed the presence of specific GIPR staining in zona glomerulosa cells (Fig 1, A-C). Fainter GIPR staining was also found in cells of the zona reticularis (Fig 1, A-B), but cells of the zona fasciculata and of the adrenal medulla showed no signal. GIPR staining was also found in interstitial endothelial cells (Fig 1 D).

### *In vivo investigation*

In order to assess the functional role of GIPR in the normal adrenal cortex, we investigated the response to GIP infusion in four healthy individuals pre-treated with dexamethasone, in

order to suppress the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. Infusion of 0.6ug/kg/hr of GIP led to a modest average increase of plasma aldosterone levels of 78.6% ( $p=0.028$ , Fig 2); the range of increase varied substantially between each subject from: 33.3% to 215%. In contrast, there were no detectable changes in plasma concentrations of cortisol, ACTH (Fig 3A and B), or DHEA-S (not shown) during GIP infusion. There was, however, a significant increase in plasma renin activity levels during GIP infusion (mean increase of 313%, range: 125-600%,  $p=0.021$  Fig 3C) which was correlated to the elevation in aldosterone (Pearson correlation factor of 0.6)

#### *Immunohistochemistry of normal kidneys*

The elevation in renin during GIP infusion suggested the possibility of stimulation of renin by GIP, but the localization of GIPR in human kidney was not known. IHC study of normal human kidneys revealed a strong GIPR signal in cells of the macula densa and proximal tubules (Fig 4); GIPR signal was much fainter or negative in cells of the distal tubule and the glomeruli (Fig 4), and was present only in collecting tubules of the kidney medulla (not shown).

#### *In vitro investigation*

Primary cultures of normal adrenal cells were performed to examine whether GIP can directly stimulate aldosterone production. When normal dispersed adrenal cells were incubated during 7 hr with 100 nM GIP, there was an average elevation in aldosterone production of 119% (range: 59% to 169%;  $p=0.0011$ ) as compared to untreated controls in four experiments (Fig 5). A dose-response curve indicated a  $K_d$  of approximately 50pM (not shown). There was no effect of GIP on either cortisol or DHEA-S production (not

shown). Furthermore, co-incubation of GIP with 10uM of H89, a specific cAMP-dependent protein kinase A inhibitor, completely obliterated the aldosterone response to GIP (Fig 5). Wortmannin, a specific protein kinase C inhibitor, did not have any effect on GIP-dependent aldosterone production (Fig. 5).

## **Discussion**

This study of five normal adrenal glands confirms our preliminary data showing that GIPR is expressed, as assessed by immunohistochemistry, in zona glomerulosa cells of the normal human adrenal cortex (9). It is also expressed at lower levels in zona reticularis cells, but not detectable in zona fasciculata cells in human adrenal cortex. Short-term infusion of GIP at concentrations which reproduce physiological post-prandial GIP levels (7) produced a modest average increase of aldosterone secretion in the four normal individuals tested; the range of increase was variable between the individuals tested. We extended the GIP infusion from 60 minutes in our previous studies to 120 minutes in this study and the mean 78% increase in plasma aldosterone was similar to the 77% increase in the previous study (9). In contrast, GIP infusion had no effect on cortisol, DHEA-S or ACTH levels in these normal subjects and this is consistent with previous *in vivo* or *in vitro* studies in normal subjects or on normal adult or fetal human adrenals which indicated that GIP was not involved in the regulation of glucocorticoid or adrenal androgen production in humans (7, 10). Although aldosterone is mainly regulated by angiotensin II, potassium, ACTH and ANP, we now add GIP to the list of other regulators of aldosterone which also include serotonin, vasopressin, dopamine, and endothelin (11).

This study also found that GIPR is expressed in endothelial blood vessels in the adrenal

cortex, as found in other vascular tissues where GIP can regulate blood flow (12). This distribution of GIPR both in zona glomerulosa cells and in vascular endothelial cells may explain the low amounts of GIPR expression previously found by RT-PCR in normal adrenal tissues (13).

As GIP is able to stimulate aldosterone secretion in dispersed normal adrenal cells, it could be assumed that GIP acts directly *via* its receptor in zona glomerulosa cells. However, we have observed a significant increase of renin activity levels in normal subjects following GIP infusion. The expression of GIPR in macula densa cells and the mild elevation of renin following GIP infusion in normal individuals suggest that the stimulation of aldosterone by GIP may also be mediated by an effect of GIP on macula densa cells which would result in a stimulation of production of active renin by juxtaglomerular cells (14). It is also possible that GIP could activate the renin-angiotensin system directly in the dispersed adrenal cells or *in vivo* in the adrenal gland and that this may also be implicated in the stimulation of aldosterone (11). A potential role of GIP on renal tubule function is currently unknown.

GIPR activity is exerted *via* various signaling pathways to achieve diverse cellular effects ranging from cellular proliferation and differentiation to regulation of intracellular ions (1). We have shown that the GIP-dependent aldosterone secretion appears to be mediated by the cAMP-dependent protein kinase (PKA), which is known to stimulate proliferation in adrenal cells (15), and not by PKC, the kinase implicated in angiotensin II-dependent aldosterone production (11). Transfection of GIPR in bovine adrenal cells is a sufficient genetic event to initiate tumor formation when these cells are inserted under renal capsule of mice (16). The presence of a functional GIP receptor in normal zona glomerulosa cells potentially provides new insights in the pathogenesis of GIP-dependent adrenal tumors. Several experimental evidence suggest a centripetal migration of precursor cells from

adrenal capsule or zona glomerulosa cells as the main differentiation model for adrenal zonation (17). This implies that GIPR expression should be lost when cells migrate from zona glomerulosa to become part of zona fasciculata. The maintenance of GIPR in cortisol or androgen producing tumor cells could be due to the loss of a control mechanism repressing the expression of GIPR in cells of the zonae fasciculata and reticularis. Furthermore, considering the importance of GIPR in the control of cellular proliferation and differentiation in the pancreas and possibly in other tissues (18), we hypothesize that GIP may play a role in the control of normal adrenal cellular proliferation.

More data is needed to understand the importance and the exact mechanisms implicated in the stimulation of aldosterone production by GIP in healthy subjects. These preliminary studies examined only acute effects of GIP infusion; it will be of interest to examine whether chronic and physiological elevations of GIP regulate the renin-angiotensin system under various physiological conditions such as salt intake, blood volume, potassium status or pharmacological modulation of GIP levels with the introduction of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors in the treatment of type-2 diabetes.

## **Reference List**

1. Baggio LL & Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007 132 2131-2157.
2. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ & Bonner TI. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 1993 133 2861-2870.

3. Gremlich S, Porret A, Hani EH, Cherif D, Vionnet N, Froguel P & Thorens B. Cloning, functional expression, and chromosomal localization of the human pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. *Diabetes* 1995 44 1202-1208.
4. Baldacchino V, Oble S, Decarie PO, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J & Lacroix A. The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenals of patients with Cushing's syndrome. *J Mol.Endocrinol* 2005 35 61-71.
5. Mazzocchi G, Rebuffat P, Meneghelli V, Malendowicz LK, Tortorella C, Gottardo G & Nussdorfer GG. Gastric inhibitory polypeptide stimulates glucocorticoid secretion in rats, acting through specific receptors coupled with the adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Peptides* 1999 20 589-594.
6. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P & Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2004 15 375-382.
7. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F & Taillefer R. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N.Engl.J Med.* 1992 327 974-980.
8. Costa MH, Latronico AC, Martin RM, Barbosa AS, Almeida MQ, Lotfi CF, Valassi HP, Nishi MY, Lucon AM, Siqueira SA, Zerbini MC, Carvalho LR, Mendonca BB & Fragoso MC. Expression Profiles of the Glucose-Dependent Insulinotropic Peptide Receptor and Luteinizing Hormone Receptor in Sporadic Adrenocortical Tumors. *J Endocrinol* 2008.
9. Lampron A, Bourdeau I, Oble S, Godbout A, Schurch W, Arjane P, Hamet P & Lacroix A. Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for

GIP in a patient with an aldosteronoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2008.

10. Chabre O, Liakos P, Vivier J, Chaffanjon P, Labat-Moleur F, Martinie M, Bottari SP, Bachelot I, Chambaz EM, Defaye G & Feige JJ. Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1998 83 3134-3143.
11. Spat A & Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev.* 2004 84 489-539.
12. Ding KH, Zhong Q, Xu J & Isales CM. Glucose-dependent insulinotropic peptide: differential effects on hepatic artery vs. portal vein endothelial cells. *Am.J Physiol Endocrinol Metab* 2004 286 E773-E779.
13. N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, de Herder WW & Lacroix A. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 1998 83 2781-2785.
14. Persson AE, Ollerstam A, Liu R & Brown R. Mechanisms for macula densa cell release of renin. *Acta Physiol Scand.* 2004 181 471-474.
15. Stratakis CA. Cushing syndrome caused by adrenocortical tumors and hyperplasias (corticotropin- independent Cushing syndrome). *Endocr.Dev.* 2008 13 117-132.
16. Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ & Thomas M. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology* 2006 147 782-790.
17. Kim AC & Hammer GD. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol.Cell Endocrinol* 2007 265-266 10-16.
18. Wideman RD & Kieffer TJ. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide as a

regulator of beta cell function and fate. *Horm.Metab Res.* 2004 36 782-786.

### **Figure legends**

*Figure 1:* Distribution of GIP receptor by immunohistochemistry in normal adrenals. (A-C) Specific GIPR staining observed in zona glomerulosa cells in normal human adrenal cortex, with fainter signal in zona reticularis cells (20X, 40X and 100X, respectively). (D) Staining of GIPR in interstitial endothelial cells of the adrenal cortex (200X). Each staining was performed at least three times on consecutive slides of the same block, in separate experiments. ZG: Zona Glomerulosa, ZF: Zona Fasciculata, ZR: Zona Reticularis

*Figure 2:* Effects of acute stimulation with GIP on aldosterone secretion in 4 normal healthy subjects. GIP infusion produced a modest and variable elevation in plasma aldosterone concentration in the subjects in which pre-treatment with dexamethasone was administered to suppress ACTH levels.

*Figure 3:* Effects of acute stimulation with GIP on cortisol, ACTH and renin activity levels. No response to GIP infusion was observed when measuring plasma cortisol (A) or ACTH (B). (C) GIP infusion lead to an increase in plasma renin activity levels.

*Figure 4:* Distribution of GIP receptor by immunohistochemistry in normal kidney cortex. GIPR staining was observed in macula densa (red arrow), proximal tubule (black arrow) and distal tubule (green arrow). Each staining was performed at least three times on consecutive slides of the same block, in separate experiments.

*Figure 5* : Effect of GIP stimulation on primary cultures of normal human adrenal cells. (A) Addition of GIP to the culture media stimulated aldosterone production. This stimulation of aldosterone was abrogated by H89, a specific inhibitor of protein kinase A, but not by Wortmannin, a specific protein kinase C inhibitor (n=3). Star:  $p < 0.05$

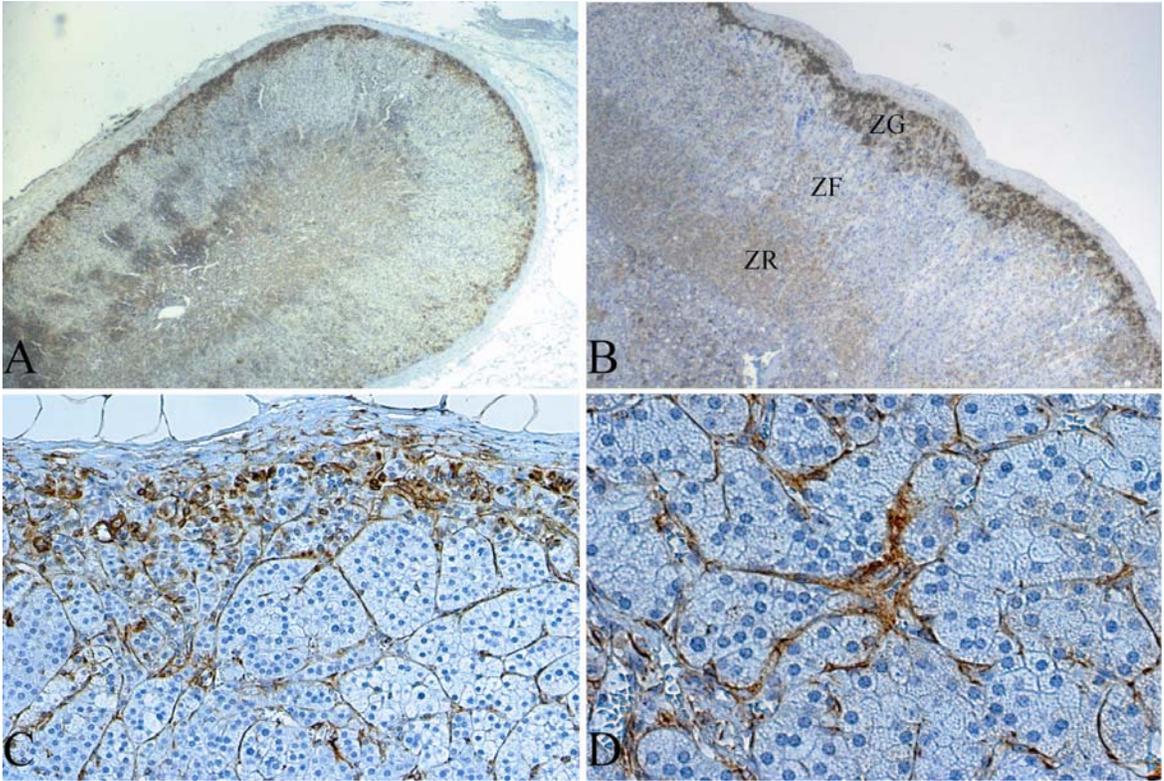


Figure 1

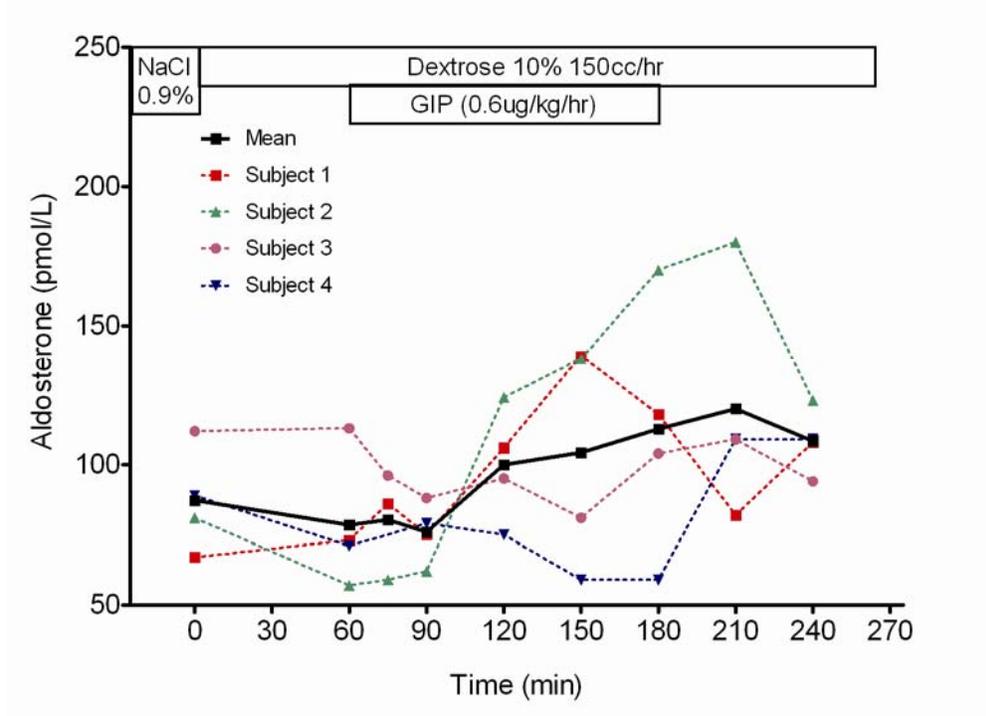


Figure 2

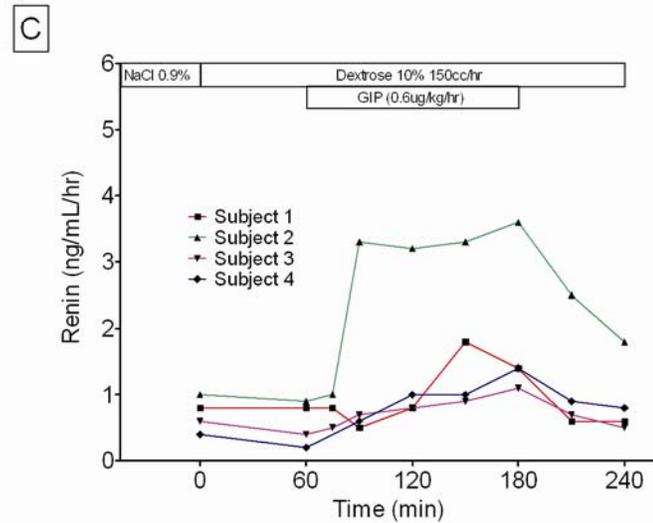
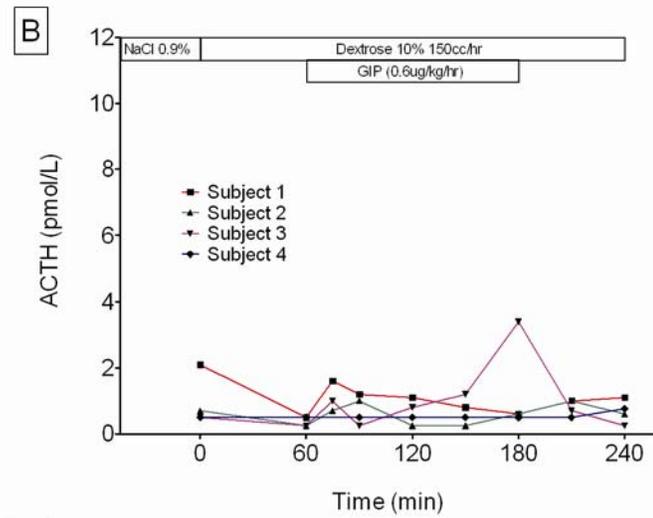
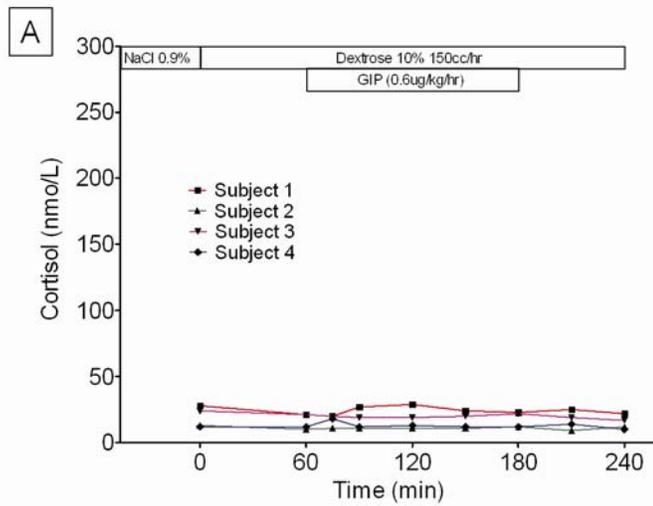


Figure 3

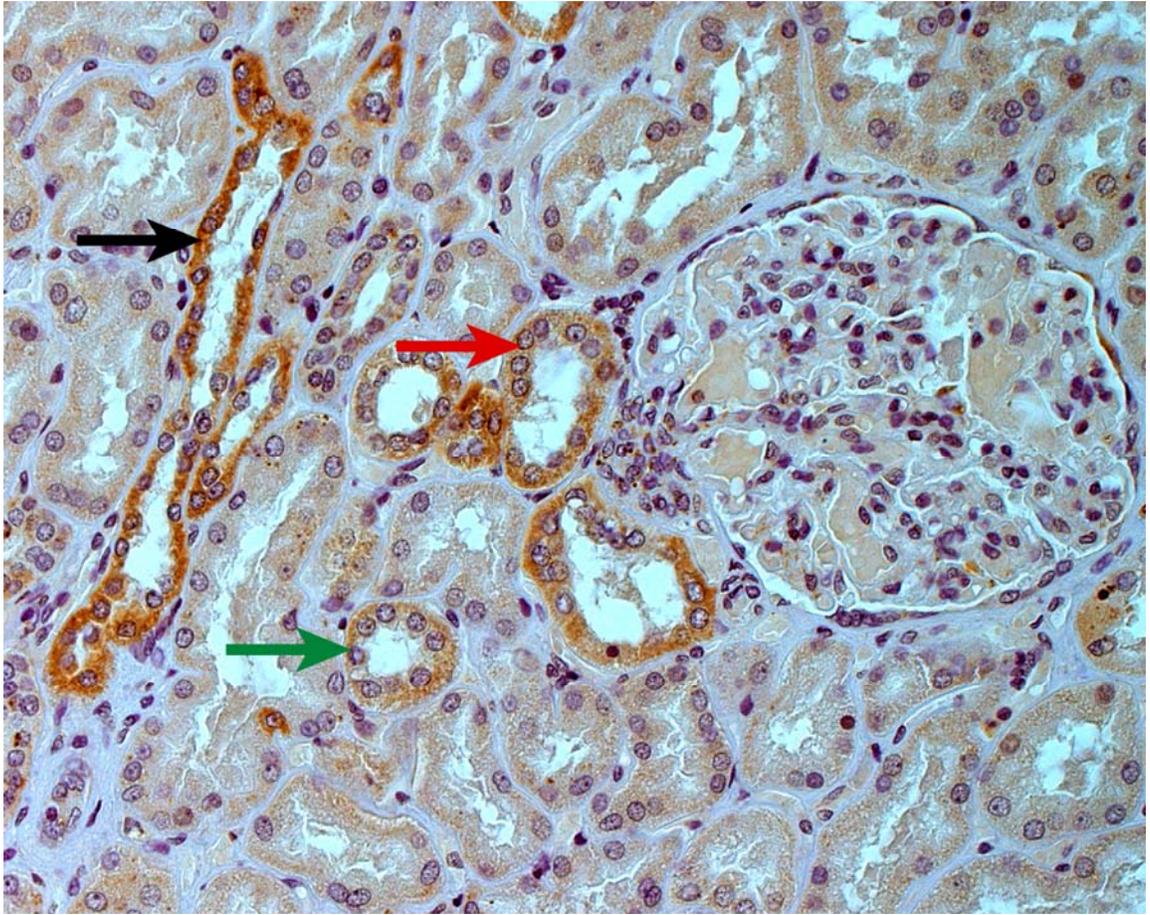


Figure 4

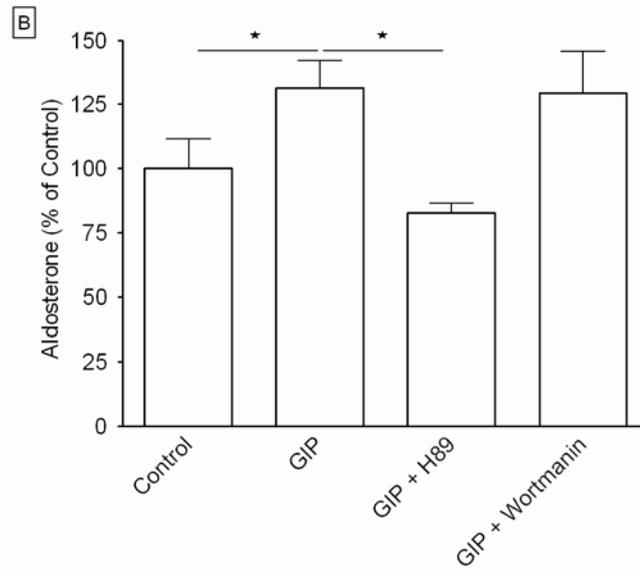
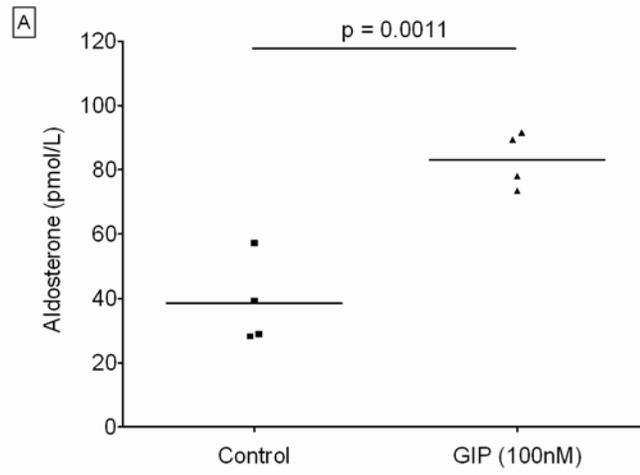


Figure 5

### 3. Discussion

Suite à l'identification d'un patient avec un aldostéronisme répondant au GIP et de la présence du récepteur dans la surrénale normale adjacente à la tumeur, nous nous sommes penchés sur la possibilité que le récepteur au GIP soit fonctionnel dans le cortex surrénalien normal et qu'il puisse stimuler la production d'aldostérone dans la physiologie normale. L'expression spécifique de la protéine du GIPR dans la zone glomérulée a d'abord été confirmée par immunohistochimie dans une série de surrénale normale obtenue lors de néphrectomies radicales. Son expression a également été relevée dans les cellules endothéliales interstitielles, tel qu'avait été initialement suggéré. *In vivo*, l'infusion de GIP dans 4 sujets normaux a mené à une élévation de la production d'aldostérone par plus de 75% et n'a eu aucun effet sur la production de cortisol, de DHEA ou sur les niveaux d'ACTH. Ces résultats initiaux auront avantage à être confirmés chez un plus grand nombre de sujets sains (études en cours). *In vitro*, le GIP a pu stimuler la production d'aldostérone dans des cultures primaires de cellules surrénaliennes normales. Cette stimulation a été abrogée par un inhibiteur de la voie de l'AMPC mais pas par un inhibiteur de PKC. Ces résultats indiquent que le GIPR retrouvé dans la zone glomérulée par immunohistochimie est fonctionnel et peut contrôler directement la production d'aldostérone. Une élévation des niveaux de rénine et la présence du récepteur dans les cellules du rein contrôlant la production de rénine soulèvent toutefois la possibilité que le GIP peut également stimuler la production d'aldostérone indirectement *via* une influence sur la production de rénine.

Ces résultats indiquent pour la première fois que le GIP a une action dans la physiologie normale de la glande surrénale mais aussi dans le rein. Le rôle physiologique de cette capacité du GIP à contrôler la production d'aldostérone est cependant encore

nébuleux et de nombreuses études sont à réaliser, notamment l'injection de GIP sous différentes diètes en sel, la comparaison des effets d'élévations chroniques ou physiologiques du GIP ou la modulation pharmacologique du GIP par des inhibiteurs de dipeptidyl peptidase IV comme dans le diabète de type II. Cette observation est particulièrement intéressante pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la surexpression aberrante du GIPR dans les différentes tumeurs cortico-surréaliennes. Le récepteur retrouvé dans les tumeurs productrices de cortisol (issues de cellules de la zone fasciculée) est bien ectopique, c'est un gain de fonction. Toutefois, le GIPR dans les tumeurs productrices d'aldostérone est eutopique, une exagération de la situation normale, comme pour le récepteur 5-HT4 à sérotonine par exemple.

C'est toutefois en étudiant le modèle de développement du cortex surrénalien que vient l'observation la plus intéressante. Dans ce modèle globalement accepté, des cellules souches se retrouvant dans ou sous la capsule se différencient en cellules de la zone glomérulée. Les cellules migrent par la suite de façon centripète, se différenciant en cellules fasciculées puis réticulée pour mener à une sénescence au niveau de la jonction du cortex avec la médulla. D'importants changements dans l'expression génique ont lieu au cours de cette migration, responsables de la spécificité fonctionnelle de chaque cellule (Voir Introduction, points I.2 et I.3). En suivant ce modèle, il est important de noter que l'expression du *GIPR* est perdue au cours de cette migration. On peut imaginer que la perte de ce mécanisme de contrôle pourrait mener à l'expression du récepteur dans les cellules fasciculées et mener, ultimement, à la formation de tumeurs sécrétant du cortisol de façon GIP-dépendantes.

De plus, en étudiant les fonctions du GIP dans ses différents organes cibles (voir Figure 16), il est apparent que le GIP, en plus de stimuler différentes fonctions

physiologiques de l'organe cible, stimule la prolifération cellulaire et aussi mais surtout la différenciation des cellules souches en cellules matures. Les évidences pour ces fonctions ont d'ailleurs été étudiées en détail dans les îlots  $\beta$  du pancréas. Nous avons de plus noté que la voie de signalisation induite par la stimulation du GIPR semble être celle de l'AMPC et de la PKA, principal contrôleur de la prolifération des cellules cortico-surréaliennes (voir Introduction, partie III.4). La présence du GIPR dans les cellules sous la capsule du cortex surréalien est un argument pour une éventuelle capacité du GIP à initier la différenciation de cellules souches cortico-surréaliennes.

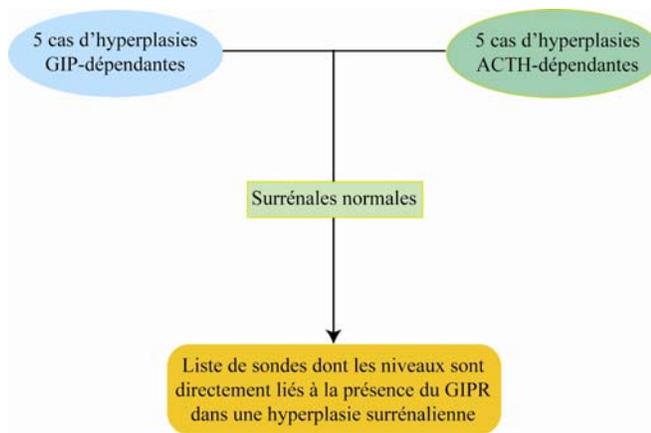
### **III. Profilage à grande échelle de l'expression génique dans les hyperplasies GIP-dépendantes**

#### **1. Situation du sujet**

Les deux premiers volets de cette étude ont identifié un rôle important du GIP dans la production d'aldostérone dans des conditions physiologiques normales ainsi que dans les tumeurs productrices d'aldostérone. Il reste toutefois à identifier des gènes candidats dont la modulation de l'activité ou de l'expression peut mener à l'expression aberrante du *GIPR* dans différentes conditions pathologiques du cortex surrénalien. La séquence du *GIPR* et le niveau d'expression des facteurs de transcription contrôlant son expression étant normales dans les syndromes de Cushing GIP-dépendant, il a été proposé que des mécanismes épigénétiques soient impliqués dans l'expression aberrante du *GIPR*, c'est-à-dire des gènes ou protéines qui ne lient pas forcément le promoteur du *GIPR* mais qui peuvent influencer indirectement l'expression du récepteur, par la modulation de l'activité de facteurs de transcription par exemple.

Les technologies de profilage de l'expression génique à grande échelle se sont grandement développées au cours des dernières années. Il est maintenant possible de mesurer avec précision en une seule expérience le profil d'expression de tous les gènes et séquences dans un génome donné. Ces techniques ont déjà été appliquées dans un grand nombre de conditions pathologiques, notamment dans les tumeurs cortico-surréaliennes. La comparaison des différents types de tumeurs cortico-surréaliennes par ce moyen a d'ailleurs mené à la découverte de l'implication de l'IGF2 dans les carcinomes cortico-

surréaliens (77). Nous avons appliqué ces techniques pour identifier des gènes candidats dont l'expression est modifiée spécifiquement dans les hyperplasies GIP-dépendantes. Les profils d'expression d'hyperplasies GIP-dépendantes ont été comparés à ceux d'hyperplasies ACTH-dépendantes. Ainsi, uniquement les gènes liés à la présence du GIPR dans une hyperplasie cortico-surréaliennes ont été identifiés. Les ratios d'expression ont été mesurés en comparaison à un pool d'ARNm de surrénales normales disponibles commercialement (voir Figure 18).



*Figure 18 : Schéma fonctionnel de l'étude de profilage génique à grande échelle d'hyperplasies GIP-dépendantes*

2. **Article 3**

**Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal hyperplasias reveals novel targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome.**

Antoine Lampron, Isabelle Bourdeau, Pavel Hamet, Johanne Tremblay, André Lacroix

Article publié dans Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Volume 91, Numéro 9, Pages 3611-3618, 2006

Division d'endocrinologie, Département de médecine

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

## **Abstract**

*Context:* The mechanisms responsible for the ectopic adrenal expression of GIP receptor in GIP-dependent Cushing's syndrome (CS) are unknown. Chronic adrenal stimulation by ACTH in Cushing's disease (CD) or by GIP in GIP-dependent ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) both lead to the induction of genes implicated in adrenal proliferation and steroidogenesis.

*Objective:* Identify genes differentially expressed specifically in GIP-dependent CS which could be implicated in the ectopic expression of GIP receptor.

*Methods:* We used the Affymetrix U133 plus 2.0 microarray oligochips to compare the whole genome expression profile of adrenal tissues from five cases of GIP-dependent bilateral AIMAH with CS, one case of GIP-dependent unilateral adenoma with CS, five cases of ACTH-dependant hyperplasias and a pool of adrenals from 62 normal individuals.

*Results:* After data normalization and statistical filtering, 723 genes with differential expression were identified, including 461 genes or sequences with a known functional implication, classified in 8 dominant functional classes. Specific findings include repression of perilipin, the over-expression of 13 GPCRs and the potential involvement of Rho-GTPases. We also isolated 94 probesets potentially linked to the formation of GIP-dependent nodules adjacent to the diffuse hyperplasia. These included probesets related to the linker histone H1 and repression of RXRa and CCND2. The expression profiles for 8 genes were confirmed by real-time RT-PCR.

*Conclusion:* This study identified an extensive series of potentially novel target candidate genes which could be implicated in the molecular mechanisms of ectopic expression of the GIP-receptor as well as in the multistep progression of GIP-dependent CS.



## **Introduction**

Primary Cushing's syndrome (CS) is most frequently secondary to unilateral adrenocortical adenomas and less frequently to carcinomas. Approximately 10% of cases are secondary to bilateral ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasias (AIMAH) and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) (1). Unlike in PPNAD, with or without Carney complex (CNC), no gene mutation has yet been described as the predominant cause of AIMAH, except for rare cases of *GNAS1* mutations without McCune Albright syndrome (2).

Clinical manifestations of CS usually do not occur before the fifth or sixth decade of life in patients with AIMAH (3). Most cases of AIMAH appear to be sporadic, but there are now several reports of familial cases of AIMAH with presentation suggesting an autosomal dominant transmission (3). Analysis of AIMAH tissues showed different clonal patterns between glands and between nodules which suggests that different stages of a common multistep tumoral process are present in different locations in AIMAH at the same time (4-6). As both adrenals are affected either in familial or sporadic cases, AIMAH is likely to be secondary to a germinal mutation or to a somatic mutation occurring at an early stage of embryogenesis in a cell which will give rise to both adrenal glands. This initial genetic event would be responsible for the development of early diffuse hyperplasia. Several secondary clonal events would be responsible for the development of the heterogeneous nodules appearing progressively during the following decades of life (7).

The most frequently observed feature of AIMAH is the adrenal expression of one or several aberrant G-protein coupled receptors (GPCR), regulating steroidogenesis (7, 8). The aberrant GPCRs have included those for Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP),

vasopressin, catecholamines, LH/hCG, serotonin, angiotensin II and, possibly, leptin (3, 7, 8). The GIP receptor (GIPR) gene sequence analysis did not reveal mutations in adrenals of patients with GIP-dependent CS that could account for its ectopic expression (9). Although Sp1 and Sp3 transcription factors are required determinants in GIPR's gene expression, we did not observe any specific changes in the expression levels of these factors in GIP-dependent AIMAH (10). Whether the ectopic expression of the GIPR is a primary event in AIMAH development is still unknown; however, it was recently shown that bovine adrenal cells transfected with the GIPR and implanted under the renal capsule of mice develop adenomatous tissue and mild ACTH-independent CS (11).

The purpose of this study was to identify genes responsible for the ectopic adrenocortical expression of GIPR in GIP-dependent CS and to delineate the molecular mechanisms and signaling pathways potentially implicated in the formation of AIMAH. We investigated the transcriptome profile of six patients with GIP-dependent CS, five from bilateral AIMAH, one from unilateral adenoma and compared it to five patients with ACTH-dependent CS and to a pool of normal adrenal glands. Utilizing the Affymetrix U133 plus 2.0 oligo-chips spanning the entire human genome with more than 56000 probesets per slide, we identified 723 probesets closely related to GIP-dependent AIMAH. Eight selected genes had their expression profile confirmed by real-time RT-PCR.

## **Materials and methods**

### *Subjects*

Adrenal glands were surgically removed from patients and rapidly snap-frozen. We studied adrenal tissues from five patients with Cushing's disease (ACTH-dependent CS, H1 to H5)

and from six patients with GIP-dependent CS. Of the latter, five presented sporadic non familial AIMAH (G1 to G5), and one a unilateral adenoma (A1). In one of the five AIMAH cases (G5), the disease had progressed asynchronously in both adrenals as the right adrenal included two GIP-dependent nodules which developed adjacent to the diffuse GIP-dependent hyperplasia (previously published (12)); each nodule was studied in separate chips (N1 and N2) and compared to the diffuse hyperplasia portion (G5). Clinical details of the patients with GIP-dependent CS have been published previously: A1 in ref. 13, G1 in ref. 14 G2 and G4 in ref. 15 and 16 and G 5 in ref. 12. No other aberrant receptors were identified during this *in vivo* evaluation in addition to GIPR in these patients (17). A pool of commercially available RNA (Clontech, Palo Alto, CA), isolated from normal adrenal glands of 62 Caucasian subjects aged 15 to 61 years, was also included as the normal control. This study was approved by the Institutional Ethical Committee of CHUM and all patients provided written informed consent.

#### *RNA isolation and purification*

Total RNA was isolated using TriZOL reagent (InVitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's recommendations. RNAs with a 260/280nm absorbance ratio between 1.8 and 2.2 were further purified on an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). Quality of total RNA was evaluated on an Agilent 2100 Bioanalyzer system (Agilent, Palo Alto, CA).

#### *Sample labelling and hybridization*

Microarray experiments were performed using the human expression HG-U133 plus 2.0 gene chip arrays (Affymetrix, Santa Clara, CA) following the manufacturer's recommendations. Briefly, 5 µg of total RNA was reverse transcribed with a T7-(dT) 24

oligonucleotide as primer, labelled with biotin and fragmented using Affymetrix's reagents. 10 ug of the resulting cRNA was loaded on each chip. After washing and staining with streptavidin-phycoerythrin (Invitrogen, Carlsbad, CA), the chips were scanned with a Genechip Scanner 3000 workstation (Affymetrix).

### *Statistical analysis*

Probeset intensity levels were extracted from scanned oligo-chips by the Gene Chip Operating System v1.2 (GCOS) (Affymetrix, Santa Clara, CA) and normalized using all probesets and a target value of 500. Two normalization steps were then applied to render the datasets comparable. First, each oligo-chip's dataset was centered on its median intensity. Second, each probeset was normalized to the control RNA. Probesets statistically related to GIP-dependent cases were identified using a student's two tailed heteroskedastic t-test with a  $\alpha$  of 0.05 (18). This cluster of probesets was then filtered based on their flags (present, marginal or absent, determined by GCOS) and levels of expression. We retained only probesets flagged as present in at least two of the five GIP-dependent AIMAH and represented by a minimum of a twofold increase in intensity. For probesets with a mean ratio below -2, a present flag was to be scored in the control tissue. More information on detection calls can be gathered on the Affymetrix's website ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)). The resulting dataset was inserted in the Significance Analysis of Microarrays module (SAM (19)) of TIGR's Multiple Experiment Viewer (20) to determine the false discovery rate of significant genes. Gene function analysis was performed based on information provided by Affymetrix's NetAffx Analysis centre (21) and NCBI's various databases. We used the Gfinder tool (22) to identify predominant gene ontology terms in the dataset. Hierarchical clustering was performed on TMEV using average linkage and Pearson correlation as the

distance metric (23). We also used the class predictor function of Genespring 7.2 that identifies a list of gene whose expression profiles can discriminate tissues along a pre-determined classification.

The data are presented as base 2 logarithm value of the ratio of expression in each tissue versus control. Signal log ratios (SLR) better represents down-regulation data (24).

#### *Real-time PCR quantification*

The expression levels of 8 genes of interest were further confirmed using real-time RT-PCR analysis. cDNA was created using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (M-MLV RT, Invitrogen, Carlsbad, CA) and random primers (Invitrogen, Carlsbad, CA). We used the Quantitect SYBR green RT-PCR kit (Qiagen, Valencia, CA) and a Rotor Gene 3000 cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) to perform the reaction following the manufacturer's protocols. Primers were designed to have a  $T_m$  of 60 and to amplify fragments between 90 and 110 bp long. Sequences for all the primers used are found online in supplement Table 1. After a 15 minutes denaturation at 95C, data was acquired for 50 cycles of 15s at 95C, 30s at 59C and 30s at 72C, followed by 7 minutes at 72C. Melting curve analysis was routinely performed by incrementing the temperature from 60 to 95C. Reaction efficiencies were estimated in a series of dilution curves. We used QuantumRNA 18S Internal Standards (Ambion, Austin, TX) as internal controls.

The entire dataset was submitted to the Gene Omnibus database at the NCBI's website (#GSE4060).

## **Results**

### *Expression profiles of GIP-dependent AIMAH*

In order to identify molecular determinants of the ectopic expression of GIPR in cases of GIP-dependent CS, we compared the gene expression profile of the entire genome of five patients with GIP-dependent AIMAH to those observed in ACTH-dependent CS. It was hypothesized that genes implicated in cell proliferation could be similarly expressed in Cushing's disease and GIP-dependent CS adrenals compared to the normal control. However, genes related to the ectopic expression of GIPR should be only found in GIP-dependent AIMAH. Using a filtering protocol, 723 probesets were identified and further analysed (online Table 2). Using a hierarchical clustering of this dataset, three major clusters of expression profile were identified and discriminated GIP-dependent AIMAH from Cushing's disease (Fig. 1A).

Among the 723 probesets isolated, 461 were related to a gene or a sequence with a known functional implication (online Table 3). The other probesets were mainly expressed sequence tags (ESTs), hypothetical proteins and unidentified transcribed loci. Hierarchical clustering of the tissues using this list as a training set was able to efficiently discriminate pathological groups (Fig. 1B). This observation is another confirmation of the specificity of this gene list to differentiate both pathologies.

### *Validation of microarray data*

The expression profiles for 8 different genes were confirmed by real-time RT-PCR (Fig.2). A strong correlation was found between the expression profiles of the targeted genes in microarray and RT-PCR techniques; a Pearson correlation factor of 0.8 or more was observed for every target when comparing expression profiles obtained by microarray and RT-PCR in each tissue, except for PCK1 and GRM3 whose differential expression levels

were higher in RT-PCR.

Our results were also validated by comparing them with previously reported expression profiles in the literature. The GIPR was overexpressed in GIP-dependent AIMAH but not in ACTH-dependent adrenal hyperplasias (SLR=2.26,  $p=0.001$ ), and confirmed by real-time RT-PCR. Although it did not achieve statistical significance ( $p=0.091$ ), Wnt1-inducible signaling protein 2 (WISP2), previously reported to be over-expressed in GIP-dependent AIMAH by Bourdeau et al. (25), was over-expressed in 4 out of 5 GIP-dependent hyperplasias to achieve a mean SLR of 3.70 compared to control. Similarly, the neuroendocrine protein 1 (SGNE1) was over-expressed in the same number of patients to achieve an SLR of 3.33 and a p-Value of 0.052. We also observed a global repression of the expression level of the steroidogenic enzymes (data not shown), as was previously observed (15, 25).

#### *Functional classification of the data*

Our analysis revealed ten predominant functional classes in which we could classify the 461 probesets with a known function (Table 1). Some pathways and biological processes are found predominantly such as global metabolism, intracellular transport, cell signaling and immunological processes. An eleventh class was assigned to probesets related to genes for which the only information available is that their expression is under the specific control of a known biological pathway (i.e. TNF $\alpha$  induced protein); these probesets are actual markers of the activation of a given pathway.

#### *Cell surface signaling and signal transduction*

Sixty-nine probesets were related to signaling processing, both at the membrane (Table 2)

and intracellular levels. In these 69 probesets, 17 were related to receptors, 13 of which are coupled to G-protein, part of the family of 7 transmembrane domain receptors. Aside from two probesets related to melanocortin receptor (MC2R), all of them including the G-protein coupled receptor 54 (GPR54), the serotonin receptor 2B (HTR2B), the G-Protein-coupled Receptor 4 (GPR4) and the Endothelial Differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor 8 (EDG8) were over-represented in GIP-dependent AIMAH. MC2R-related probesets were all under-represented in GIP-dependent tissues (SLR=-2.35, p=0.009) and normal in ACTH-dependent cases (SLR=-0.2).

Of interest, four probesets related to Regulator of G-Protein Signaling 5 (RGS5) were slightly repressed or normal in GIP-dependent cases (SLR=0.45 for 218353\_at) and more strongly over-expressed in ACTH-dependent cases (SLR=2.33 for the same probeset). Although this expression profile might not be relevant in the pathogenesis of GIP-dependent CS, this key protein in GPCR signaling has one of the highest raw intensity level (>5000) in the control tissue, indicating a possible function of this protein in normal adrenal glands. These observations were confirmed by real-time RT-PCR for 3 of 5 GIP-dependent tissues and 4 of 5 ACTH-dependent tissues (data not shown).

#### *Metabolic, anabolic and protein modification processes*

Accounting for more than 20% of the gene list, the group of metabolic modification is the group with the largest number of probesets, including many related to lipid metabolism (Table 3). We found repression of key genes such as lipoprotein lipase (SLR=-1.73; p=0.02), lipidosin (SLR=-2.96; p=0.02) and perilipin (SLR=-5.26; p=0.03). This last gene was confirmed by RT-PCR (Fig. 2). Perilipin knockout studies have identified metabolic adaptations such as the repression of gluconeogenesis (26). Pyruvate carboxykinase 1

(PCK1) is the main control point of this step, and we found a strong repression of this gene by real-time RT-PCR (SLR=-5.01, p=0.05). This repression goes along with a disruption in perilipin's function.

#### *Tumorigenesis*

In the different lists of probesets related to signal transduction (online supplement Table 3), it is possible to identify key genes that could better define the molecular signaling mechanisms implicated in GIP-dependent AIMAH. One of the main observations is the presence of many members of the Rho/Rac/Cdc42 family of small GTPases. The over-expression of Rac2 (SLR=3.19; p=0.0008) was confirmed by RT-PCR (Fig. 2).

#### *Immunological processes*

We observed the presence of a few probesets related to immunological processes that were highly over-expressed. This functional class was the only one over-represented in one of the three clusters identified in the hierarchical clustering (red cluster, Fig. 1A) with 92% of the related probesets up regulated (Table 1). Over-expression of the Janus kinase 3 (JAK3, SLR=3.48, p=8.4 x 10<sup>-5</sup>), a key molecule in the JAK/STAT signaling pathway, was confirmed by RT-PCR.

#### *Biological markers*

We termed «biological markers» probesets related to sequences whose expression levels are known to be under the influence of specific stimuli. This list includes the specifically androgen regulated gene (SARG, SLR=4.36, p=0.01), confirmed by RT-PCR. This gene is known to respond to stimulation by androgens but not by glucocorticoids (27). Along with

the apparent over-expression of the androgen receptor gene (AR, SLR=1.13, p=0.003) and the repression of an estrogen regulated gene in breast cancer (GREB1, SLR=-3.12, p=0.02), the data suggest a potential activation of the AR-mediated transcription process.

*Gene expression profiling in GIP-dependent adenoma and in GIP-dependent nodules adjacent to GIP-dependent AIMAH*

We studied the expression profiles of two GIP-dependent nodules that had developed adjacent to the G5 hyperplasia (samples N1 and N2) and a case of GIP-dependent adenoma (sample A1). We first performed a hierarchical clustering of different types of tissues using the entire set of genes. AIMAHs and ACTH-dependent tissues were closely clustered, followed by both nodules (Fig. 3), while the GIP-dependent adenoma was segregated (Fig. 3). In order to better understand the mechanisms behind the formation of the different nodules, we used the class prediction tool in Genespring 7.2 to isolate a list of genes whose expression profile is sufficient alone to discriminate tissues following pre-determined criterias as training sets (here, tumour type i.e. GIP-dependent nodules vs hyperplasia). We isolated 200 tumour-type specific genes. 94 had a ratio vs. control of at least 2 in either N1 or N2 (online supplement Table 4), 55 over-represented. Interestingly, 11 of these 55 genes were related to sub-units of the linker histone H1. In the rest of the probesets, we noted the presence of Retinoid X Receptor alpha (RXRa) and Cyclin D2 (CCND2), both repressed in the two nodules and not changed in the normal control tissue.

**Discussion**

Using genome-scaled microarray analysis, we extracted 723 genes, transcripts and expressed sequences with mRNA expression levels specifically modified in GIP-dependent AIMAH. Although it could be argued that some ratios observed were due to heterogeneity in extraction procedures between samples and control RNA, the presence of statistically significant differences between ACTH- and GIP-dependent CS samples indicates a change in gene expression profile truly related to differences between these two etiologies of adrenal hyperplasia and hypercorticism. The comparison with ACTH-dependent hyperplasias in this study was essential to identify genes which could be related to the pathophysiology of GIP-dependent CS and not to non-specific adrenal proliferation. Within this dataset, we identified pathways and biological functions in which the expression of interesting candidate genes rises or falls in GIP-dependent AIMAH. However, microarray analysis has some limitations, the main one being that it identifies modifications at the mRNA level without any confirmation at the protein or functional level. Functional implication of a given protein in the formation of this pathology, based solely on microarray information, can only be at a speculative level. Keeping this in mind, we were able to identify key signaling molecules which will be interesting candidates to be investigated further.

The abnormal expression of several other GPCRs could be secondary to a dysfunction in a common factor regulating the expression for these receptors. One of the only repressed GPCR is the melanocortin 2 receptor (MC2R, SLR=-3.79; p=0.01), already identified by RT-PCR in previous studies (15). Although ACTH's implication in GIPR ectopic expression was suggested in one study (28), this finding, along with the barely detectable levels of ACTH observed in patients with GIP-dependent CS, suggest that a role for ACTH

in GIPR over-expression is most unlikely. The aberrant expression of several receptors was not suspected based on the *in vivo* investigation protocol which certainly underestimates a very wide range of other GPCR. Previous studies have described the combined expression of leptin receptor (29) or LH/hCG receptor (30) along with GIPR. No statistical differences were observed between both groups for these two receptors (SLR= 0.75 and 0.26 with  $p=$  0.85 and 0.64 for the leptin and LH/hCG receptors, respectively).

We also identified the potential implication of key proteins in lipid metabolism and signaling. GIPR is increasingly recognized for its implication in lipid metabolism (31), in particular at the level of lipid storage in adipocytes in response to insulin. Perilipin is a key protein in the availability of triglycerides and cholesterol in adipocytes (32) and in steroidogenic tissues such as Leydig and adrenal cells (33). Coating lipid particles, this protein protects their content from hormone-sensitive lipase (HSL) (34). A repression of this gene could be caused by stimulation of the cell by TNF $\alpha$  (35, 36), leading to depletion of intracellular lipid pools and the necessity to incorporate triglycerides. As GIPR regulates intracellular lipid storage (31), it will be interesting to examine if perilipin can regulate GIPR expression. Lynn et al actually reported that a fatty acid load elevated GIPR's gene expression (37). It is interesting to note that among the eleven GPCRs found to be over-expressed in this study, 5 have a function related to lipid metabolism and/or signaling: GIPR (31), ELongation of Very Long fatty acids-like 4 (ELOVL4) (38), Neuropeptide Y-6 Receptor (NPY6R) (39), G-Protein-coupled Receptor 4 (GPR4) (40) and Endothelial Differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor 8 (EDG8) (41).

Rac2 is one of the most highly over-expressed genes in the entire dataset. Closely related to

Rac1 (42), it functions as a haematopoietic-specific component of the NADPH oxidase complex, mediating cellular motility, intracellular signaling, focal adhesion and cellular growth (43). It is interesting that this gene is strongly expressed in all hyperplasias and nodules but not in the GIP-dependent adenoma. It is also known that Rac2 is implicated in the stimulation of p38-MAPK (44), one of the end-points of GIPR's signaling pathway (45). Over-expression of subunits of the H1 histone, repression of RXRa and the repression of CCND2 in both nodules adjacent to an early GIP-dependent hyperplasia suggest that in addition to the ectopic expression of GIPR, secondary events are implicated in the development of more rapidly growing nodules in AIMAH.

There were many differences between a GIP-dependent adenoma and GIP-dependent AIMAH. Although the pathologies share the stimulation of cortisol production in adrenals by the GIP hormone, the adenoma was the only GIP-dependent tissue that did not share enough similarity with the GIP-dependent AIMAH to be included in the same hierarchical cluster (Fig1A). The same initiating events leading to aberrant receptor expression may be shared between both etiologies. Nevertheless, many secondary events are likely to occur in different cells of the initial diffuse hyperplasia during the long process of AIMAH evolution, leading to the secondary formation of multiple nodules (3, 7). We could argue that an adenoma is more likely to result from a single genetic alteration, whereas hyperplasias are most likely polyclonal and display more differences with ACTH-dependent tissues.

We also identified the modified expression of many other biological processes potentially involved in the formation of GIP-dependent AIMAH such as the over-expression of many genes of the immune system. Knowing that tumour cells can secrete cytokines or other CMH molecules that can stimulate the immune system, the presence of so many probesets

significantly related to GIP-dependent AIMAH could be yet another explanation for this finding.

In conclusion, we used the most stringent statistical protocol with a biological significance (GIPR's specific over-expression in GIP-dependent cases) to extract a list of 723 probesets with intensity levels statistically related to GIP-dependent CS. Of these probesets, we analyzed the 461 related to a gene with a known function in the literature. We were able to highlight key proteins and signaling pathways as potential players in the over-expression of the GIPR in GIP-dependent AIMAH such as perilipin's repression, the over-expression of a series of GPCRs, the over-expression of immunity-related genes and the potential involvement of Rho-GTPases. Those are new targets for the further elucidation of the molecular mechanism responsible for the ectopic expression of the GIP receptor and the multistep progression of GIP-dependent AIMAH.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the technical help of Gilles Corbeil for the microarray hybridization technique and Gregory Voisin for the statistical analysis. We also thank Drs Lynnette K Nieman (Bethesda, USA), Wouter W. de Herder (Rotterdam, The Netherlands), Helga Gerl (Berlin, Germany), Olivier Chabre (Grenoble, France), for providing us with the clinical data and adrenal tissues of some of the GIP-dependent Cushing's syndrome patients.

### **Reference list**

- 1 - Lacroix A, Bourdeau I. 2005 Bilateral adrenal Cushing's syndrome: macronodular adrenal hyperplasia and primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 34(2):441-458,
- 2 - Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira MA, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB. 2003 Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(5):2147-2151.
- 3 - Christopoulos S, Bourdeau I, Lacroix A. 2005 Clinical and Subclinical ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia and Aberrant Hormone Receptors. *Horm Res.* 64: 119-131.
- 4 - Gicquel C, Bertagna X, Le Bouc Y. 1995 Recent advances in the pathogenesis of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol.* 133(2):133-144.
- 5 - Diaz-Cano SJ, de Miguel M, Blanes A, Tashjian R, Galera H, Wolfe HJ. 2000 Clonality as expression of distinctive cell kinetics patterns in nodular hyperplasias and adenomas of the adrenal cortex. *Am J Pathol.* 156(1):311-319.
- 6 - Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis WD, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP, Allolio B. 1994 Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res.* 54:4927-4932.
- 7 - Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 15:375-382.
- 8 - Lacroix A., N'Diaye N., Tremblay J., and Hamet P. 2001 Ectopic and Abnormal Hormone Receptors in Adrenal Cushing's Syndrome. *Endocr. Rev.* 22:75-110.
- 9 - Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. 2004

Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 91(3):171-177.

10 - Baldacchino V, Oble S, Decarie PO, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A. 2005 The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenals of patients with Cushing's syndrome. *J Mol Endocrinol.* 35(1):61-71.

11 - Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ, Thomas M. 2006 Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology.* 147(2):782-90

12 - N'Diaye N, Hamet P, Tremblay J, Boutin JM, Gaboury L, Lacroix A. 1999 Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(8):2616-2622

13 - Chabre O, Liakos P, Vivier J, Chaffanjon P, Labat-Moleur F, Martinie M, Bottari SP, Bachelot I, Chambaz EM, Defaye G, Feige JJ. 1998 Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(9): 3134-43

14 - Doppman JL, Chrousos GP, Papanicolaou DA, Stratakis CA, Alexander HR, Nieman LK. 2000 Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: an uncommon cause of primary adrenal hypercortisolism. *Radiology.* 216(3):797-802.

15 - Antonini SR, Baldacchino V, Tremblay J, Hamet P, and Lacroix A. 2006 Expression of ACTH receptor pathway genes in Glucose-Dependent Insulintropic Peptide (GIP)-Dependent Cushing's Syndrome. *Clinical Endocrinology*, 64 (1):29-36

16 - Gerl H, Rohde W, Biering H, Schulz N, Lochs H. 2000 Food-dependent Cushing syndrome of long standing with mild clinical features *Dtsch Med Wochenschr.* 125(51-

52):1565-8.

17 - Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. 2000 Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab.* 85(10):3531-3536.

18 - Pan, W. 2002 A comparative review of statistical methods for discovering differentially expressed genes in replicated microarray experiments *Bioinformatics.* 18:546-554

19 - Tusher, V.G., R. Tibshirani and G. Chu. 2002 Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *PNAS.* 98: 5116-5121.

20 - Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, Sturn A, Snuffin M, Rezantsev A, Popov D, Ryltsov A, Kostukovich E, Borisovsky I, Liu Z, Vinsavich A, Trush V, Quackenbush J. 2003 TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques.* 34(2):374-378.

21 - Liu G, Loraine AE, Shigeta R, Cline M, Cheng J, Valmeekam V, Sun S, Kulp D, Siani-Rose MA. 2003 NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res.* 31(1):82-86.

22 - Masseroli M, Martucci D, Pinciroli F. 2004 GFINDER: Genome Function INtegrated Discoverer through dynamic annotation, statistical analysis, and mining. *Nucleic Acids Res.* 32:W293-300.

23 - Eisen, M.B., P.T. Spellman, P.O. Brown, and D. Botstein. 1998 Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS.* 95:14863-14868.

24 - Quackenbush J. 2002 Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet.* 32:S496-501

25 - Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, Libutti SK, Stratakis CA. 2004 Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms

clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene*. 23(8):1575-1585.

26 - Saha PK, Kojima H, Martinez-Botas J, Sunehag AL, Chan L. 2004 Metabolic adaptations in the absence of perilipin: increased beta-oxidation and decreased hepatic glucose production associated with peripheral insulin resistance but normal glucose tolerance in perilipin-null mice. *J Biol Chem*. 279(34):35150-35158.

27 - Steketee K, Ziel-van der Made AC, van der Korput HA, Houtsmuller AB, Trapman J. A 2004 bioinformatics-based functional analysis shows that the specifically androgen-regulated gene SARG contains an active direct repeat androgen response element in the first intron. *J Mol Endocrinol*. 33(2):477-491.

28 - Swords FM, Aylwin S, Perry L, Arola J, Grossman AB, Monson JP, Clark AJ. 2005 The aberrant expression of the gastric inhibitory polypeptide (GIP) receptor in adrenal hyperplasia: does chronic adrenocorticotropin exposure stimulate up-regulation of GIP receptors in Cushing's disease? *J Clin Endocrinol Metab*. 90(5):3009-3016

29 - Pralong FP, Gomez F, Guillou L, Mosimann F, Franscella S, Gaillard RC. 1999 Food-dependent Cushing's syndrome: possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 84(10):3817-3822.

30 - Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn JM, Vaudry H, Lefebvre H. 2005 *In vivo* and *in vitro* screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(3):1302-1310

31 - Yip RG, Wolfe MM. 2000 GIP biology and fat metabolism. *Life Sci*. 66(2):91-103

32 - Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. 2000 Intracellular lipid particles of eukaryotic

cells. *Biochim Biophys Acta*. 1469(2):101-120

33 - Servetnick DA, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Wolff J, Londos C. 1995 Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem*. 270(28):16970-16973.

34 - Tansey JT, Sztalryd C, Hlavin EM, Kimmel AR, Londos C. 2004 The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life*. (7):379-385

35 - Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, Greenberg AS. 1998 Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.*; 273(38):24665-24669

36 - Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS. 2002 Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes*. 51(10):2929-2935.

37 - Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, Ehses JA, Hinke SA, Pamir N, McIntosh CH, Pederson RA. 2003 A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *FASEB J*. 17(1):91-93

38 - Zhang K, Kniazeva M, Han M, Li W, Yu Z, Yang Z, Li Y, Metzker ML, Allikmets R, Zack DJ, Kakuk LE, Lagali PS, Wong PW, MacDonald IM, Sieving PA, Figueroa DJ, Austin CP, Gould RJ, Ayyagari R, Petrukhin K. 2001 A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet*. 27(1):89-93.

39 - Herzog H. 2003 Neuropeptide Y and energy homeostasis: insights from Y receptor knockout models. *Eur J Pharmacol*. 480(1-3):21-29

40 - Xu Y. 2002 Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine: G protein-

coupled receptors and receptor-mediated signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 1582(1-3):81-88

41 - Xu CB, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. 2004 Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. 25(7):849-854

42 - Didsbury J, Weber RF, Bokoch GM, Evans T, Snyderman R. 1989 rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J Biol Chem*. 264(28):16378-16382

43 - Roberts AW, Kim C, Zhen L, Lowe JB, Kapur R, Petryniak B, Spaetti A, Pollock JD, Borneo JB, Bradford GB, Atkinson SJ, Dinauer MC, Williams DA. 1999 Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity*. 10(2):183-196

44 - You HJ, Woo CH, Choi EY, Cho SH, Yoo YJ, Kim JH. 2005 Roles of Rac and p38 kinase in the activation of cytosolic phospholipase A2 in response to PMA. *Biochem J*.; 388(Pt 2):527-535.

45 - Ehses JA, Casilla VR, Doty T, Pospisilik JA, Winter KD, Demuth HU, Pederson RA, McIntosh CH. 2003 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes beta-(INS-1) cell survival *via* cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 144(10):4433-4445

Table 1

Summary of the functional classification of the data.

Functional class	Number of probesets	Fraction of probesets	
		up-regulated	down-regulated
Molecular markers	13	76.9%	23.1%
Cell adhesion	17	88.2%	11.8%
DNA and RNA structural organisation	34	64.7%	35.3%
Intracellular signal transduction	35	88.6%	11.4%
Cell-surface linked signaling	39	66.7%	33.3%
Immunological processes	40	92.5%	7.5%
Cell growth, apoptosis, development and oncogenesis	41	68.3%	31.7%
Control of Transcription	45	71.1%	28.9%
Cytoskeleton	46	60.9%	39.1%
Intra- and Extracellular transport	64	79.7%	20.3%
Metabolism, Catabolism and protein modifications	87	74.7%	25.3%
Total	461	74.8%	25.2%

## Table 2

Probesets related to cell surface-linked signaling. For each probeset are presented the gene they are related to, its common name and the base 2 logarithm of the expression levels in cases of GIP- and ACTH-dependent hyperplasias. Also presented is the result of the student's t-test between the GIP-dependent group (G1 to G5) and the ACTH-dependent group (H1 to H5)

AffyID	Gene Title	Gene Symbol	GIP- dependent	ACTH- dependent	Ttest pValue
230464_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 8	EDG8	4.24	1.80	0.03
242517_at	G protein-coupled receptor 54	GPR54	3.44	-1.62	0.002
213506_at	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	F2RL1	3.43	0.42	0.02
206638_at	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B	HTR2B	2.76	1.34	0.04
219532_at	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 4	ELOVL4	2.47	-0.71	0.02
236529_at	scavenger receptor cysteine rich domain containing, group B (4 domains)	SRCRB4D	2.36	-0.04	0.01
231291_at	gastric inhibitory polypeptide receptor	GIPR	2.26	-0.13	0.001
236860_at	neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)	NPY6R	2.11	0.49	0.006
223423_at	G protein-coupled receptor 160	GPR160	1.97	1.02	0.002
205051_s_at	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	KIT	1.83	0.86	0.03
206236_at	G protein-coupled receptor 4	GPR4	1.54	-1.07	0.009
216836_s_at	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (avian)	ERBB2	1.49	0.61	0.01
212070_at	G protein-coupled receptor 56	GPR56	1.39	-0.02	0.04
219145_at	latrophilin 1	LPHN1	1.29	-0.13	0.02
217779_s_at	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	PNRC2	1.26	1.91	0.0006
211320_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, U	PTPRU	1.14	0.15	0.007
229686_at	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 8	P2RY8	1.12	-0.56	0.01
213425_at	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	1.08	0.23	0.02
47560_at	latrophilin 1	LPHN1	1.07	-0.42	0.003
210220_at	frizzled homolog 2 (Drosophila)	FZD2	1.06	-0.15	0.02
203499_at	EphA2	EPHA2	0.98	0.36	0.04
203488_at	latrophilin 1	LPHN1	0.91	-1.52	0.007
206518_s_at	regulator of G-protein signalling 9	RGS9	0.89	-1.39	0.02
203954_x_at	claudin 3	CLDN3	0.70	-2.18	0.02
208433_s_at	low density lipoprotein receptor-related protein 8, apolipoprotein e receptor	LRP8	0.45	-1.06	0.04
218353_at	regulator of G-protein signalling 5	RGS5	0.45	2.33	0.02
1555725_a_at	regulator of G-protein signalling 5	RGS5	-0.68	1.83	0.02
200744_s_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	GNB1	-0.97	0.06	0.005
209070_s_at	regulator of G-protein signalling 5	RGS5	-1.04	1.27	0.02
209071_s_at	regulator of G-protein signalling 5	RGS5	-1.08	0.89	0.03
1555240_s_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12	GNG12	-1.24	0.11	0.010
1555034_at	Usher syndrome 3A	USH3A	-1.38	1.39	0.04
219274_at	transmembrane 4 superfamily member 12	TM4SF12	-1.58	2.18	0.01
1559731_x_at	LRP16 protein	LRP16	-1.61	-3.88	0.03
208568_at	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropin hormone)	MC2R	-2.35	-0.20	0.009
1555695_a_at	Usher syndrome 3A	USH3A	-2.68	1.09	0.02
230625_s_at	transmembrane 4 superfamily member 12	TM4SF12	-2.71	1.29	0.008
230626_at	transmembrane 4 superfamily member 12	TM4SF12	-3.72	1.27	0.003
217425_at	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotropin hormone)	MC2R	-3.79	-1.04	0.01

### Table 3

Probesets related to metabolism, catabolism and protein modification processes. For each probeset are presented the gene they are related to, its common name and the base 2 logarithm of the expression levels in cases of GIP- and ACTH-dependent hyperplasias. Also presented is the result of the student's t-test between the GIP-dependent group (G1 to G5) and the ACTH-dependent group (H1 to H5).

AffyID	Gene Title	Gene Symbol	GIP-dependent	ACTH-dependent	Ttest pValue
208165_s_at	protease, serine, 16 (thymus)	PRSS16	1.22	-3.51	0.001
226517_at	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	BCAT1	1.22	2.51	0.01
225285_at	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	BCAT1	1.14	2.42	0.01
224724_at	sulfatase 2	SULF2	1.14	0.35	0.04
218047_at	oxysterol binding protein-like 9	OSBPL9	1.12	1.97	0.001
228726_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	SERPINB1	1.11	0.18	0.04
201194_at	selenoprotein W, 1	SEPW1	1.09	0.21	0.01
218834_s_at	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa) binding protein 1	HSPA5BP1	1.09	-0.49	0.02
204500_s_at	ATP/GTP binding protein 1	AGTPBP1	1.03	1.79	0.01
201313_at	enolase 2, (gamma, neuronal)	ENO2	1.03	-0.35	0.03
202237_at	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	1.02	-0.54	0.01
227961_at	cathepsin B	CTSB	1.00	0.43	0.02
208498_s_at	amylase, alpha 2A; pancreatic	AMY2B	1.00	1.97	0.005
219597_s_at	dual oxidase 1	DUOX1	0.98	-0.57	0.04
231270_at	similar to carbonic anhydrase 13	CA13	0.93	-0.59	0.007
203768_s_at	steroid sulfatase (microsomal), arylsulfatase C, isozyme S	STS	0.93	0.17	0.05
206046_at	a disintegrin and metalloproteinase domain 23	ADAM23	0.90	0.12	0.05
206871_at	elastase 2, neutrophil	ELA2	0.68	-2.37	0.04
226020_s_at	metalloprotease related protein 1	MPPR-1	0.67	2.03	0.007
207213_s_at	ubiquitin specific protease 2	USP2	0.60	-1.52	0.01
222817_at	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7	HSD3B7	0.29	-1.13	0.02
211653_x_at	aldo-keto reductase family 1, member C2	AKR1C2	-0.94	0.17	0.01
208116_s_at	mannosidase, alpha, class 1A, member 1	MAN1A1	-1.00	0.73	0.02
210685_s_at	ubiquitination factor E4B (UFD2 homolog, yeast)	UBE4B	-1.04	0.31	0.007
225420_at	glycerol 3-phosphate acyltransferase, mitochondrial	GPAM	-1.07	0.40	0.005
208918_s_at	NAD kinase	NADK	-1.09	0.07	0.001
1559094_at	F-box only protein 9	FBXO9	-1.14	-0.30	0.009
204151_x_at	aldo-keto reductase family 1, member C1	AKR1C1	-1.16	0.22	0.01
212293_at	homeodomain interacting protein kinase 1	HIPK1	-1.17	0.09	0.007
230465_at	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	HS2ST1	-1.37	0.53	0.004
204476_s_at	pyruvate carboxylase	PC	-1.39	0.13	0.01
209699_x_at	aldo-keto reductase family 1, member C2	AKR1C2	-1.41	0.20	0.01
212859_x_at	metallothionein 2A	MT2A	-1.42	-0.02	0.04
220078_at	ubiquitin specific protease 31	USP31	-1.54	-0.56	0.004
203549_s_at	lipoprotein lipase	LPL	-1.73	0.20	0.02
1555497_a_at	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1	-2.66	-0.38	0.02
206465_at	lipidosin	BG1	-2.96	-0.51	0.02
1570183_at	F-box only protein 34	FBXO34	-3.30	-0.95	0.02
231678_s_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	ADH4	-3.36	-0.97	0.01
210096_at	cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	CYP4B1	-3.53	-0.27	0.02
213706_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	GPD1	-4.02	-1.59	0.02
228492_at	ubiquitin specific protease 9, Y-linked (fat facets-like, Drosophila)	USP9Y	-4.51	-1.56	0.03
208383_s_at	Pyruvate carbosykinase 1	PCK1	-5.01	-2.31	0.05
205913_at	perilipin	PLIN	-5.26	-2.21	0.03

## Figure legends

*Figure 1:* Hierarchical clustering using Pearson correlation as metrics. The data for 723 probesets selected by an extraction procedure described in methods was submitted to hierarchical clustering of the probesets' intensity levels (A) and of the samples (B). Included in the experiment were 5 GIP-dependent hyperplasias (G1 to G5), 5 ACTH-dependent hyperplasias (H1 to H5), 2 GIP-dependent nodules (N1 and N2) and a GIP-dependent adenoma (A1).

*Figure 2:* Real-time RT-PCR confirmation of the data. Each gene was assayed in triplicate using sets of primer reported in online supplement Table 1. They were normalized using 18S as a housekeeping gene. Presented are also the standard deviation and the result of a student's t-test between GIP-dependent (G1 to G5) and ACTH-dependent (H1 to H5) tissues (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ). Except for GRM3 and PCK1, microarray and RT-PCR data were similar enough in each tissue to observe a Pearson correlation factor of 0.8, indicative of a satisfying reproducibility between both techniques.

*Figure 3:* Hierarchical clustering of tumor types. Each sample was pooled according to their tumor type and submitted to hierarchical clustering with Pearson correlation as distance metrics.

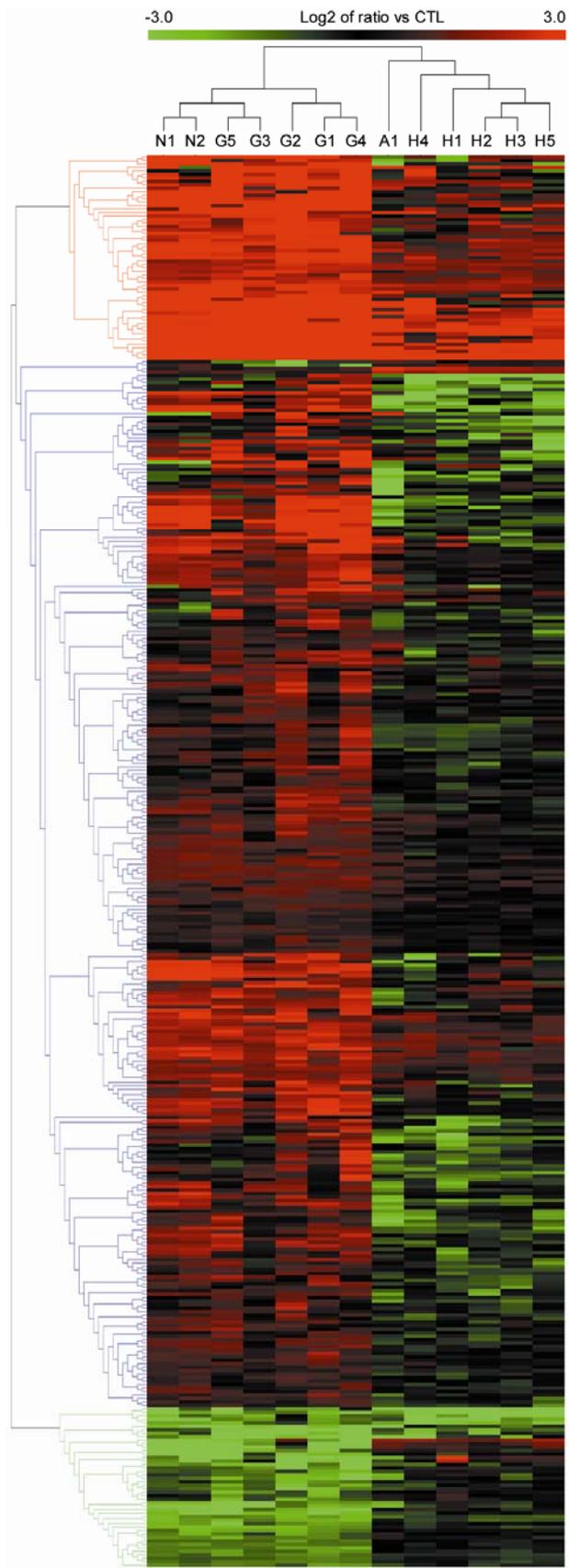


Figure 1

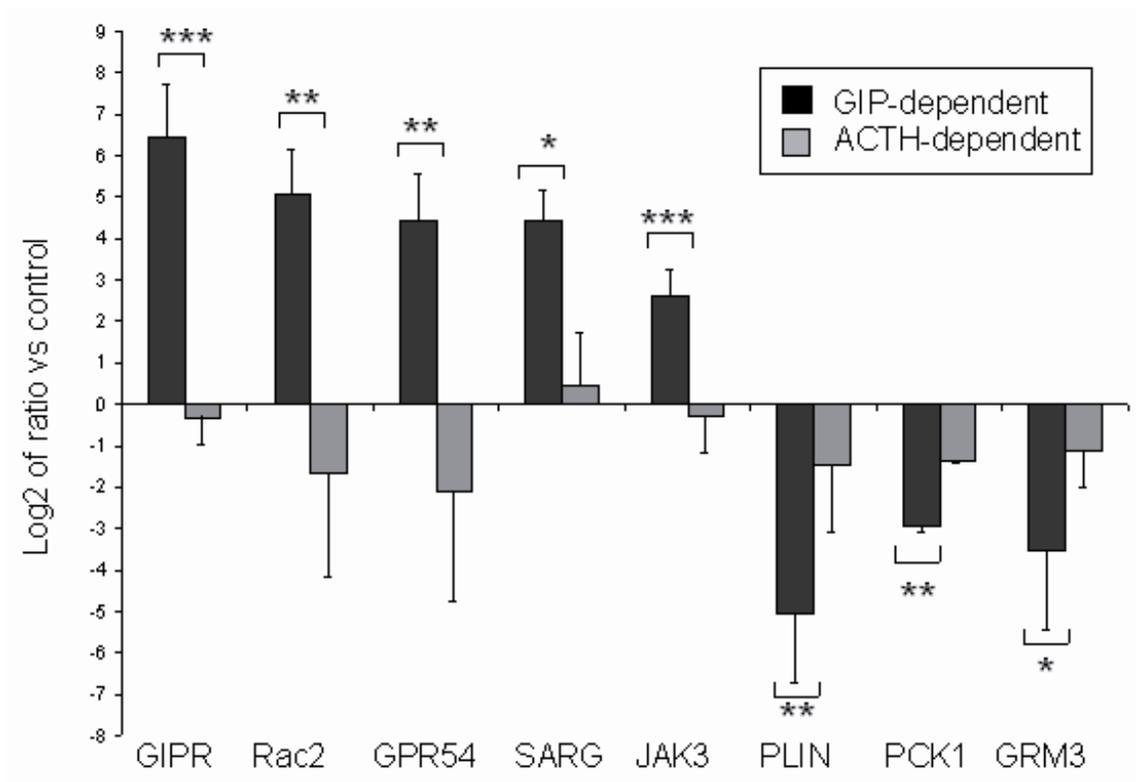


Figure 2

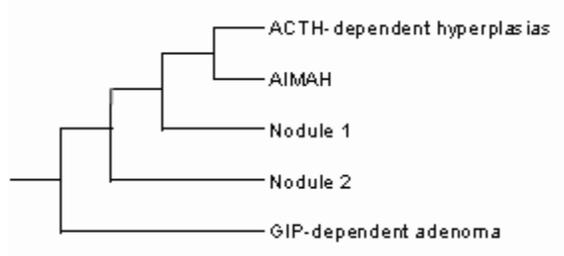


Figure 3

### 3. Discussion

Afin d'identifier des gènes candidats impliqués dans l'expression aberrante du *GIPR* dans les hyperplasies cortico-surréaliennes GIP-dépendantes, nous avons comparé les profils d'expression des génomes d'hyperplasies GIP-dépendantes à ceux d'hyperplasies ACTH-dépendantes. En utilisant un processus stringeant de filtrage statistique, une liste de 723 sondes dont les profils d'expression distinguent ces deux types d'hyperplasie a été recueillie. Le profil d'expression de 8 gènes d'intérêt a été confirmé par RT-PCR en temps réel. La véracité des données recueillies a également été confirmée par la capacité de cette liste de sondes à différencier les types d'hyperplasies par clustering non contrôlé. Cette liste de sondes contient un grand nombre de gènes d'intérêt parmi lesquelles se retrouvent probablement ceux responsables de l'expression aberrante du *GIPR* dans les hyperplasies GIP-dépendantes.

Le classement fonctionnel de ces gènes a permis d'identifier plusieurs classes importantes. Les gènes liés à la signalisation membranaire et intracellulaire étaient particulièrement d'intérêt pour l'étude des hyperplasies GIP-dépendantes. 13 GPCR ont été identifiés comme surexprimés. La majorité de ceux-ci n'ont pas de fonction connue dans les glandes surrénales normales. Bien que ceux-ci n'aient pas été inclus dans l'investigation clinique initiale, il est à envisager que plusieurs réponses aberrantes existent en plus de celle au GIP. L'expression du gène de ces récepteurs n'est pas suffisante pour affirmer que tous ces récepteurs sont physiologiquement actifs. Il est toutefois intéressant d'envisager des mécanismes communs de contrôles pour l'expression de ces gènes. Suite à cette étude, un profilage comparatif des promoteurs de ces gènes par Toucan, un logiciel d'analyse de promoteur (145), a identifié plusieurs facteurs de transcription. Parmi ceux-ci, Ikaros

possède une séquence cible dans les 13 GPCR dans les mêmes régions des promoteurs. Ce gène (*IKZF1*) a des niveaux d'expression plus élevés dans les tumeurs GIP-dépendantes bien qu'ils ne passent pas les filtres statistiques appliqués dans cette étude. Cette partie de l'étude n'a pu identifier la surexpression de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de l'expression du GIPR

La classe fonctionnelle la plus représentée a été celle associée aux processus métaboliques. Plusieurs gènes d'intérêt sont apparus, notamment la pyruvate carboxikynase (PCK1), la lipoprotéine lipase (LPL) et la périlipine (PLIN). La périlipine est une protéine spécifique aux adipocytes et aux cellules stéroïdiennes, contrôlant la disponibilité des stocks intracellulaire de lipides contenus dans les gouttelettes lipidiques aux lipases hormono-sensibles (HSL). Cette action est contrôlée par un mécanisme moléculaire dépendant de l'AMPc. Les cellules du cortex surrénalien, tout comme les adipocytes, possèdent des réserves intracellulaires importantes de lipides et de cholestérol et la périlipine est importante dans le contrôle de ces réserves. La périlipine, fortement exprimée dans les surrénales normales, était réprimée faiblement dans les hyperplasies ACTH-dépendantes et virtuellement absente dans les hyperplasies GIP-dépendantes. C'était en fait l'un des gènes les plus fortement réprimé dans l'ensemble du génome. Tel que discuté au point IV.3.a, le GIPR est impliqué dans le stockage de lipides dans les adipocytes et les acides gras peuvent en stimuler l'expression. Il est envisageable qu'une déplétion des stocks de lipides intracellulaires secondaire à l'absence de périlipine puisse induire l'expression *GIPR*.

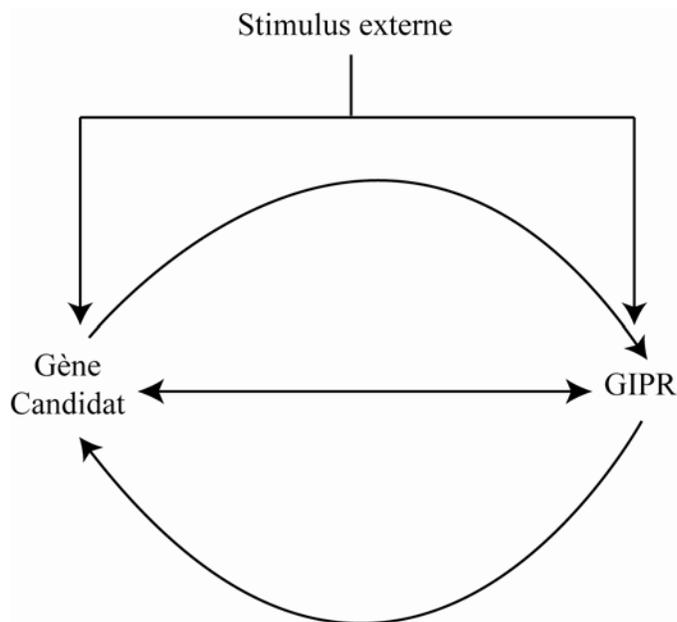
Cette étude a permis d'identifier un grand nombre de gènes cibles potentiellement impliqués dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing surrénalien. L'implication fonctionnelle de ces gènes doit être confirmée pour comprendre comment ils agissent dans

les tumeurs surrenaliennes exprimant de hauts niveaux du *GIPR*.

## **IV. Confirmation de l'importance d'un gene identifié par biopuce à ADN dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant**

### **1. Situation du sujet**

Afin d'identifier des gènes candidats impliqués dans l'expression aberrante du *GIPR* dans les tumeurs corticosurréaliennes de patients avec un syndrome de Cushing GIP-dépendant, le profilage de l'expression génique de ces tumeurs a été réalisé. Les données recueillies sont toutefois descriptives. Rien n'indique que les gènes identifiés sont impliqués dans la surexpression du *GIPR*, que c'est la présence du *GIPR* qui entraîne les profils d'expression du gène cible, qu'il existe une interdépendance entre ce gène et le *GIPR* ou encore que les profils d'expression du gène candidat et du *GIPR* sont les résultats d'un tiers gène ou voie de signalisation (voir Figure 19). C'est pour ces raisons que, bien que les profils d'expression de différents gènes aient été confirmés par RT-PCR, une confirmation fonctionnelle de l'implication des gènes cibles identifiés dans l'étude de biopuces est capitale à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression aberrante du *GIPR* dans les hyperplasies GIP-dépendantes.



*Figure 19 : Relations possibles entre les gènes candidates identifiés par biopuces et l'expression aberrante du GIPR*

L'un des résultats principaux de cette étude a été l'identification d'une répression quasi totale des niveaux d'expression de la périlipine, une protéine centrale dans le contrôle de l'accessibilité des réserves de triglycérides intracellulaires à la lipase hormono-sensible (HSL) dans les adipocytes. La périlipine est exprimé principalement dans les adipocytes dans lesquels sa fonction a été clairement identifiée. Cette protéine se retrouve en abondance autour des gouttelettes lipidiques, empêchant dans son état inactivé la capacité de HSL à extraire le cholestérol et les triglycérides contenus dans ces réserves. Suite à la stimulation des adipocytes par un stimulus extracellulaire, la périlipine peut être phosphorylée en plusieurs sites par PKA, la protéine kinase dépendante de l'AMPc. Cette modification de la périlipine la libère des gouttelettes lipidiques qui deviennent accessibles à l'HSL. L'expression de la périlipine a également été détectée dans différentes cellules stéroïdiennes, particulièrement le cortex surrénalien et les cellules de Leydig dans les

testicules (146). La fonction de la périlipine dans ces organes n'est pas encore connue mais il est proposé qu'elle y joue un rôle dans le contrôle de la disponibilité du cholestérol intracellulaire.

Cette dernière partie de l'étude vise à déterminer le rôle que la périlipine joue dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant. Afin de déterminer le lien entre l'expression de la périlipine et celle du *GIPR*, l'expression de ces gènes sera modulée *in vitro* dans un modèle cellulaire murin, les cellules Y1. Des études seront également poursuivies dans ces cellules pour identifier le rôle fonctionnel de la périlipine dans la fonction du GIPR dans des cellules corticosurréaliennes.

2. **Article 4**

**Regulation of the GIP receptor's function and expression by perilipin in  
adrenocortical cells**

Antoine Lampron, Tania Longo Mazzuco, Isabelle Bourdeau, Sylvie Oble, Pavel Hamet,  
Johanne Tremblay, André Lacroix

Article en préparation pour soumission dans

Journal of Molecular Endocrinology

2009

Division d'endocrinologie, Département de médecine

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

## **Abstract**

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) has been most extensively studied for its regulatory role on insulin release by pancreatic  $\beta$ -cells. In some cases of primary adrenal Cushing's syndrome and aldosterone-producing adenomas, the secretion of cortisol and aldosterone is aberrantly regulated by GIP. This results from the aberrant adrenal over-expression of the GIP receptor (GIPR) induced by a yet unknown molecular mechanism. In a recent microarray study, we found that the expression of perilipin (PLIN) is specifically repressed to barely detectable levels in GIP-dependent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH). The objectives of this study were to characterize the expression of PLIN and to examine whether its regulation can modulate GIPR in adrenal cells. PLIN was repressed both at mRNA and protein levels specifically in GIP-dependent AIMAH. Repression of PLIN expression in Y-1 adrenal cell line by small interfering RNA led to a significant increase in GIPR expression levels; transfection of GIPR had no effect on PLIN expression. Activation of GIPR by GIP increased corticosterone production and the phosphorylation of PLIN-A. This activation also led to an accumulation of two other isoforms of perilipin: PLIN-B and PLIN-C. These results demonstrate that PLIN regulates GIPR expression in murine adrenocortical cells and may be implicated in the pathogenesis of GIP-dependent Cushing's syndrome; further studies will be necessary to clarify which isoforms of PLIN are implicated in the regulation of normal adrenocortical functions.

## Introduction

Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) is a hormone produced mainly by K-cells of the gut. It acts through its specific G-protein coupled receptor, the GIP receptor (GIPR) (1). GIP has mainly been studied for its role in increasing insulin release by pancreatic  $\beta$ -cells following oral ingestion of food; this incretin effect is shared by glucagon-like peptide 1 (GLP-1) (2). A growing number of studies indicate that GIP exerts more diverse activities than its incretin effect. GIP stimulates  $\beta$ -cell maturation and proliferation (3). GIPR is expressed in a number of extra-pancreatic tissues (4, 5) and is implicated in processes as diverse as bone mass turnover (6), dietary fat deposition in adipocytes (7), neural progenitor cells differentiation in the central nervous system (8) and, recently, aldosterone production in normal adrenal glands and renin production in kidneys (9).

In certain human adrenal tumors, GIPR is expressed at much higher levels than in normal adrenals (10). In these tumors, GIP is able to regulate steroid production and cellular proliferation. It has been shown that overexpression of GIPR in adrenal cells is a sufficient genetic event to initiate tumorigenesis (11). However, the molecular mechanisms leading to aberrant expression of the GIPR in adrenal tumors are unknown. GIPR sequencing did not reveal mutations of coding or putative promoters regions in adrenals of patients with GIP-dependent CS (12). The analysis of transcription factors (Sp1 and Sp3) necessary to GIPR expression did not show specific differences to explain ectopic expression of GIPR (5).

In order to identify candidate genes, which are responsible for aberrant GIPR expression in GIP-dependent AIMAH, a large-scale gene expression microarray was

performed (13), comparing AIMAH transcriptomes to those of ACTH-dependent hyperplasias (secondary to ACTH producing pituitary tumors, Cushing's disease). A list of 723 statistically significant probesets was identified. Among them, a majority of probesets were related to mechanisms implicated in metabolism, including perilipin (PLIN). Its expression levels were completely absent in microarray and barely detectable by real-time RT-PCR specifically in GIP-dependent AIMAH (13).

PLIN is a protein-coating lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells, mainly adrenal and Leydig cells (14). In adipocytes, its main PLIN-A isoform, can be phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase A (PKA). This allows the release of PLIN from the lipid droplets which are thus readily available to hormone-sensitive lipase (HSL) that can liberate triglycerides and cholesterol stored in lipid droplets (15). Little is known concerning the role of PLIN in adrenal cells although it was shown to be present around lipid droplets in rat adrenal cells and was responsive to PKA stimulating agents that enhanced the release of PLIN from these droplets (16). In addition to isoforms A and B, it was shown that adrenal cells express isoforms C and D that are not present in adipocytes (16). Whereas PLIN-A functions are well studied, those of the other isoforms are not well understood.

The objective of the present study was to examine whether the regulation of PLIN expression can modulate GIPR in adrenal cells and thus could possibly be responsible for the ectopic expression of GIPR in certain tumors

## **Subjects and methods**

### *Human tissue samples*

Tissues were obtained immediately after surgery and snap frozen in liquid nitrogen then stored at -80C until usage. Every patient provided written informed consent. The samples used in RT-PCR and Western blot were presented in more details in our previous microarray study (13). 5 cases of GIP-dependent AIMAH and 5 cases of ACTH-dependent hyperplasia (Cushing's disease) were included in the study. For real-time RT-PCR studies, a pool of mRNA from normal adrenals were used (Clontech, Palo Alto, CA). For western blot studies, 3 normal adrenals were obtained from radical nephrectomies and confirmed as normal by pathology.

#### *Real-time RT-PCR: Perilipin and GIPR*

Total mRNA were isolated from frozen tissues using the TriZOL reagent (InVitrogen, Carlsbad, CA) following manufacturer's guidelines. Real-time RT-PCR were performed using the Quantitect SYBR green RT-PCR kit (QIAGEN) and a Rotor Gene 3000 cycler (Corbett Research, Sydney, Australia) to perform the reaction following the manufacturer's protocols. as described previously (13). Briefly, cDNAs were generated using a Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (InVitrogen). Reactions were quantified using the Pfaffle method (17) following determination of reaction efficiencies. Quantum RNA 18S (Ambion, Austin, TX) was used as internal standard. Perilipin primers were 5'-GACAACGTGGTGGACACAGT-3' for the forward primer and 5'-CTGGTGGGTTGTTCGATGTC-3' for reverse. GIPR primers were 5'-TGTAGCCGCCTGAACAAACTC-3' for the forward primer and 5'-GGGACAGGCCTGATCGCCCCT-3' for reverse.

#### *Western blot*

Proteins were isolated from mechanically powdered frozen tissues by a 1hr incubation at 4C in the lysis buffer (6M urea, 1% SDS). 30 ug of total proteins were separated on a 10% SDA polyacrylamide gel electrophoresis. These were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Micropore, Madison, NJ). Migration and transfer apparatus were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA). Membranes were then blocked in 1X Triss-glycine (TG) buffer containing 5% nonfat dry milk and 0,02% Tween-20 for an hour and incubated overnight at 4C in 1X TG containing 1% nonfat dry milk, 0.02% Tween-20 and either a 1/1000 dilution of the guinea pig anti-perilipin antibody (Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany) or 1/10000 dilution of the rabbit anti- $\beta$ -actin antibody (Sigma-Aldricht, St-Louis, MO). Following consecutive washes in PBS, membranes were incubated for an hour in 1X TG containing 1% nonfat dry milk, 0.02% Tween-20 at room temperature with the appropriate secondary antibodies: either rabbit anti-guinea pig (Sigma-Aldricht) diluted 1/1000 or mouse anti rabbit diluted 1/20000 (Sigma-Aldricht), both coupled to horseradish peroxydase. Blots were revealed using autoradiographic films (Kodak, Rochester, NY).

*Transient transfections with GIPR or siRNA for perilipin*

Transfections were performed in the murine Y1 adrenocortical cell line using the phosphocalcium method (18).  $2 \times 10^5$  cells were seeded in 6-well plates (Sigma-Aldricht) 24hrs prior to transfection in Dulbeco's modified Eagle medium/F12 (DMEM-F12, Gibco, Carlsbad, CA) containing 5% fetal bovine serum (Gibco) and a mixture penicillin/streptomycin. Fresh media were added prior to the addition of transfection reagents containing either nothing for control, an expression vector containing the full length human GIPR cDNA (GeneCopoeia, Germantown, MD) or 100 nM of a chemically synthesized siRNA (Sigma-Aldricht, SASI\_Mm01\_00179103). Cells were incubated

overnight, washed with sterile PBS and incubated for 48hr in fresh culture media. When cells were stimulated with GIP (Bachem, Torrance, CA) or H89 (Sigma-Aldrich), these were added directly in the culture media 24hr following transfection and incubated for another 48hr. Proteins were extracted as described above and mRNA was extracted using TriZOL reagent (Invitrogen).

#### *Quantification of corticosterone*

Following stimulation, culture media (4mL) were collected, desiccated in a Speedvac system (Thermo Scientific, Waltham, MA) and resuspended in a steroid diluent buffer provided with the corticosterone RIA kit used for quantification (MP Biomedicals, Solon, OH). Quantification was performed following protocol suggested by manufacturer.

#### *Statistical analysis*

Statistical significance was calculated using an unpaired heteroskedastic t-test. 0.05 was determined as a threshold for significant p-values.

## **Results**

#### *Expression of mRNA and protein for Perilipin are repressed in GIP-dependent AIMAH*

Our previous study indicated that mRNA levels of PLIN are repressed specifically in GIP-dependent adrenal tumors (13). In order to confirm these results, mRNA and protein expression levels of PLIN were evaluated in various GIP-dependent and GIP-independent adrenocortical tumors. Repression of mRNA levels were confirmed by real-time RT-PCR

(Fig. 1A). This was also observed in two cases of adenomas responsive to GIP with aberrant GIPR expression (not shown). At the protein level, we observed lower levels or absence of PLIN-A specifically in GIP-dependent AIMAH. Levels were higher in ACTH-dependent hyperplasias compared to GIP-dependent AIMAH, but was lower than control (Fig. 1B), which correlated with the data collected at the mRNA level.

#### *Reduction of perilipin expression by siRNA leads to elevated levels of GIPR mRNA*

In order to test if downregulation of PLIN expression can lead to higher levels of GIPR expression, small inhibitory RNA were inserted in Y1 adrenocortical cells. Repression of perilipin by 56% led to a significant increase in GIPR expression levels by 281%,  $p=0.01$ ,  $n=6$  (Fig. 2A). Although the mechanisms leading to this increase remain to be identified, these results show that repression of perilipin is a sufficient genetic event to induce GIPR expression. On the other hand, a large increase of GIPR expression following transfection with GIPR did not have an effect on perilipin expression levels (Fig. 2A). Expression of the construct was confirmed at the mRNA level by real-time RT-PCR and at the protein level by fluorescence, GIPR being coupled to GFP in our construct (not shown).

#### *GIP can stimulate perilipin phosphorylation through a PKA-dependent mechanism*

Since perilipin is activated by cAMP-dependent PKA, which is also the main effector of GIPR signaling pathway and principal signaling molecule in the adrenal cortex, the impact of GIPR stimulation on perilipin phosphorylation was investigated. The cellular model utilized was the murine Y1 adrenocortical cells. In transfected Y-1 cells, 100nM GIP

was able to stimulate corticosterone production (the main steroid produced by this cell line) by 45% ( $p=0.03$ , Fig. 3), H89, a PKA-specific inhibitor was without effect on corticosterone production by itself, but was able to completely abrogate GIP-dependent corticosterone increase ( $p = 0.008$  vs. GIP alone, Fig. 3). Incubation of Y-1 cells with GIP increased perilipin protein level (Fig. 3, lower panel). Higher resolution of the image showed the appearance of a separate band over the normal 62kDa band (not shown), indicative of a phosphorylated state. Co-addition of H89 with GIP inhibited the accumulation of this putative phosphorylated perilipin. Furthermore, the addition of GIP to the culture medium led to the accumulation of two other bands at 50kDa and 39kDa, corresponding to the expected molecular weight of isoforms B and C of perilipin respectively. No band was observed at 26kDa, the predicted molecular weight of isoform D. H89 was able to inhibit the accumulation of the phosphorylated PLIN-A and of isoforms B and C. These results show that stimulation of corticosterone production by GIP is accompanied by an increase of phosphorylated levels of perilipin A in a PKA-dependent mechanism. This stimulation also leads to the accumulation of two other protein species, compatible with isoforms B and C of perilipin.

## **Discussion**

A microarray investigation of transcriptomes of GIP-dependent AIMAH compared to those of ACTH-dependent adrenal hyperplasias identified a specific repression of expression of perilipin to barely detectable levels (13). In the present study, we confirmed that this observation was significant both at mRNA and protein levels. It was also observed that perilipin repression is a sufficient genetic event to initiate an elevation of GIPR gene

expression. Furthermore, stimulation of Y-1 adrenal cells with GIP was able to initiate the phosphorylation of perilipin in a PKA-dependent manner. This mechanism also led to the accumulation of perilipin isoforms B and C.

The mechanisms linking perilipin repression to GIPR overexpression remain to be identified. It is possible that the absence of perilipin leads to an increase of free triglycerides and cholesterol inside the cells. This increase could recruit secondary signaling molecules, such as PPAR $\gamma$  that has been shown to increase GIPR expression in a cellular model (19). An interesting study would be to evaluate the capacity of transcription factors inhibitors to block the upregulation of GIPR expression secondary to perilipin repression. What could explain the loss of perilipin expression in GIP-dependent adrenal tissues? It will be interesting to identify the presence or absence of somatic mutations in PLIN gene in GIP-dependent adrenal tumor or AIMAH. Presence of germinal mutations would be surprising, as the patients did not display major phenotypic changes similar to those described in PLIN knockout mice (20). Unfortunately, the adrenal phenotype of these mice was not studied. TNF- $\alpha$  is known to significantly repress perilipin expression (21). It was shown in our microarray study that many probesets related to genes implicated in immunological processes had much lower signals in GIP-dependent AIMAH than ACTH-dependent hyperplasias (13). Most interestingly, a probeset related to a sequence specifically regulated by TNF- $\alpha$  (TNFAIP8) was significantly over-represented in GIP-dependent AIMAH indicative that signaling pathways induced by TNF- $\alpha$  are active in these hyperplasias.

The PKA-dependent accumulation of isoforms B and C in our model raised interesting points. First, there is a post-transcriptional mechanism regulating which isoforms of perilipin are translated. Although this would be confirmed by stimulating GIPR-Y1 cells with GIP jointly with cycloheximide, it was shown that stimulation by GIP

did not have an effect on PLIN expression. This indicates the presence of a mechanism stimulating the splicing PLIN mRNA into the forms leading to PLIN-B and PLIN-C production. These isoforms lack most (PLIN-B) if not all (PLIN-C) PKA phosphorylation sites, which lead to a second interesting question on the functions of the other PLIN isoforms. In adipocytes, it was shown that PLIN-B is mainly located at the plasma membrane and translocated to the nucleus following hormonal stimulation (22), suggestive of a role for PLIN-B to protect newly synthesized triacylglycerols at the plasma membrane. The function of PLIN-C other than its specific presence in steroidogenic cells are completely unknown. It shares with PLIN-A and PLIN-B the first 7 exons. It is created by the presence of a stop codon in the eighth intron. Thus, the genetic sequence specific to PLIN-C is located in that intron. Pattern recognition softwares did not identify any homology in this region to known functional domains (personal observation, not shown). Clearly, more studies are needed to understand the role of this isoform in adrenal physiology.

It must be noted that the sequences of the other isoforms of perilipin have not been determined in humans, only in mice. However, both genes share a strong homology, notably in the gene architecture and the presence of intronic stop codons, such as those leading to isoform specificity in mice. The siRNAs and RT-PCR primers used in this study were designed to target the first three exons of perilipin, common to all isoforms. The probeset in the microarray study, however, is specific to a 3' sequence specific to isoform A. The impact of the repression of each isoforms on GIPR expression and function would be an interesting step in understanding the relationship between the two genes.

The rate-limiting step in steroidogenesis is the translocation of cholesterol to mitochondrial membrane. Perilipin could be a key signaling molecule in the rapid release of

intracellular cholesterol following hormonal stimulation, specifically in zona fasciculata, containing lipid rich cells and highly sensitive to cAMP-dependent mechanisms. Interestingly, GIPR was found to be present mostly in zona glomerulosa in normal adrenals, the most lipid-poor layer of adrenocortical cells. It is suggested that adrenal cells mature and migrate in a centripetal fashion (23). This raises the possibility that molecular mechanisms exist that repress GIPR expression when cells differentiate from zona glomerulosa cells to zona fasciculata cells and that such mechanisms are lost in GIP-responsive tumors producing cortisol. Although the zone localization of PLIN in the adrenal cortex remains to be determined, the present study suggests that these mechanisms could be linked to lipid storage mechanisms.

Understanding the steps leading to the loss of perilipin expression in GIP-dependent AIMAH could provide the key to understanding the mechanisms leading to aberrant GIPR expression in adrenocortical tumors.

### **Figure Legends**

*Figure 1:* Perilipin expression is down regulated in GIP-dependent AIMAH. A: Real-time RT PCR levels of perilipin expression in GIP-dependent AIMAH compared to those in ACTH-dependent hyperplasias. B: Perilipin protein expression as determined by Western Blot

*Figure 2:* Repression of perilipin is implicated in the overexpression of GIPR. A: Perilipin and GIPR mRNA expression levels following transfection of anti-PLIN. B: Effect of overexpression of GIPR on perilipin mRNA.

*Figure 3:* GIPR stimulates the phosphorylation of perilipin in a PKA-dependent manner. Upper panel: corticosterone production in Y-1 cells. Lower panel: Phosphorylation state of perilipin and levels of its isoforms as determined by western blot.

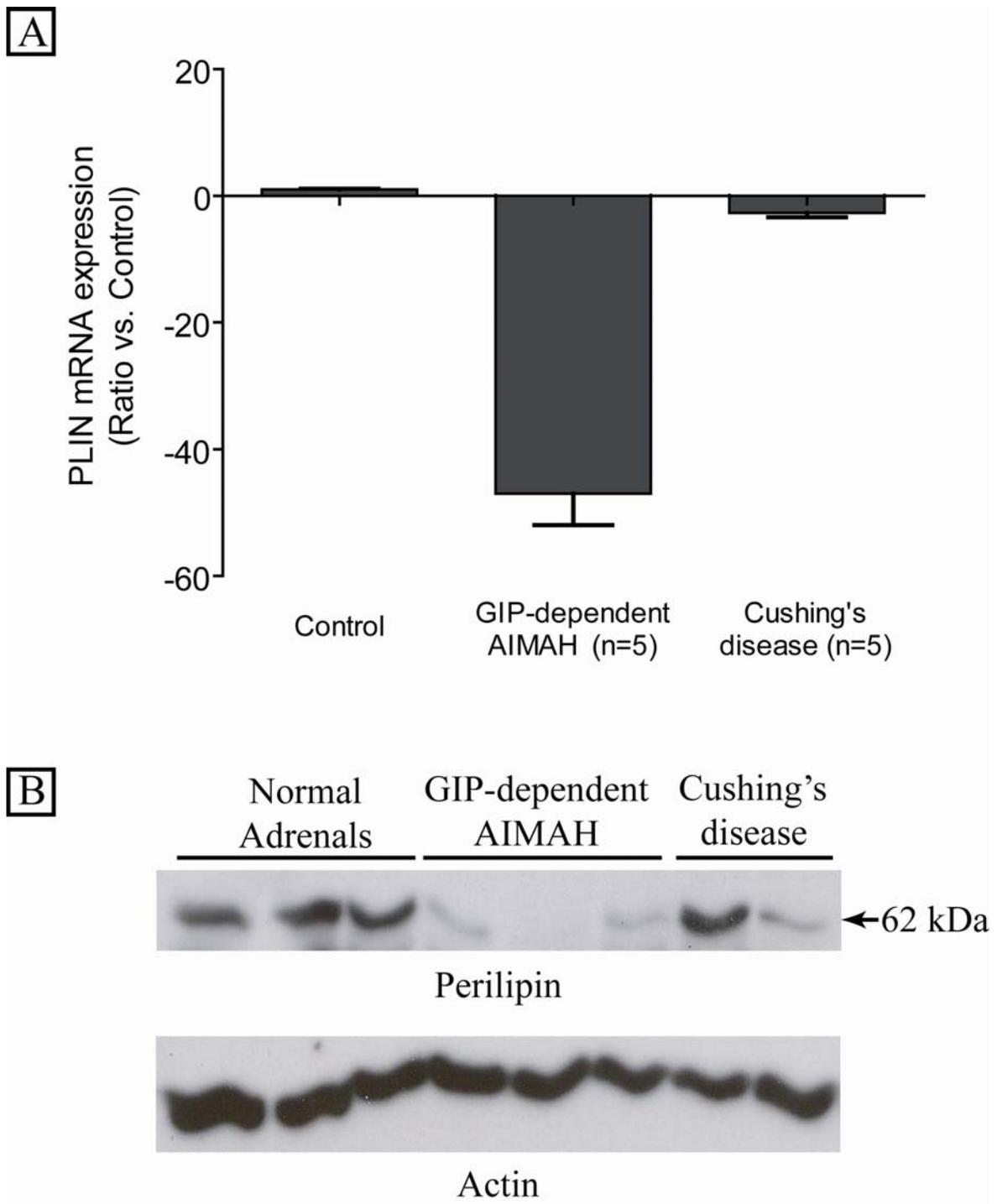


Figure 1

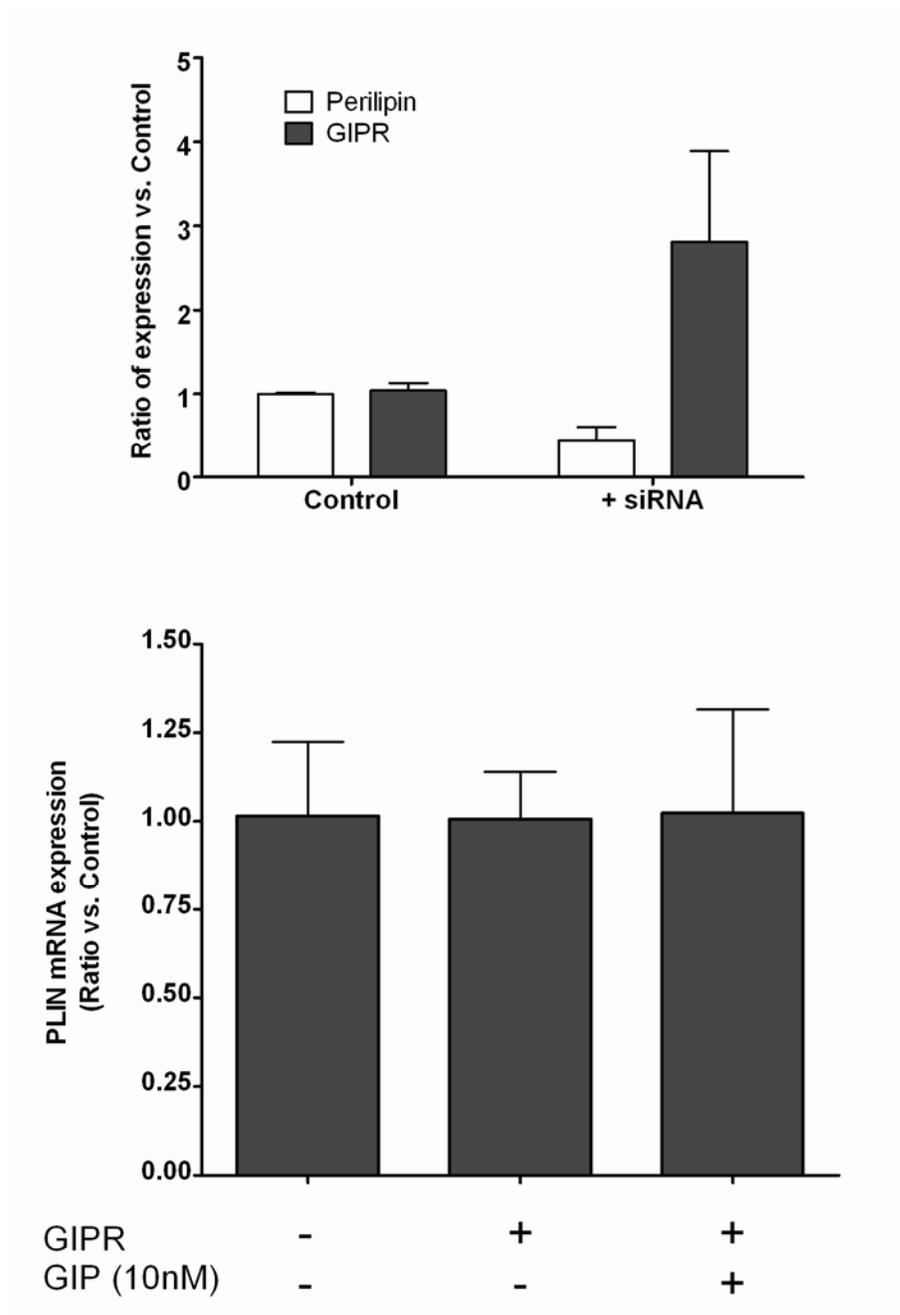


Figure 2

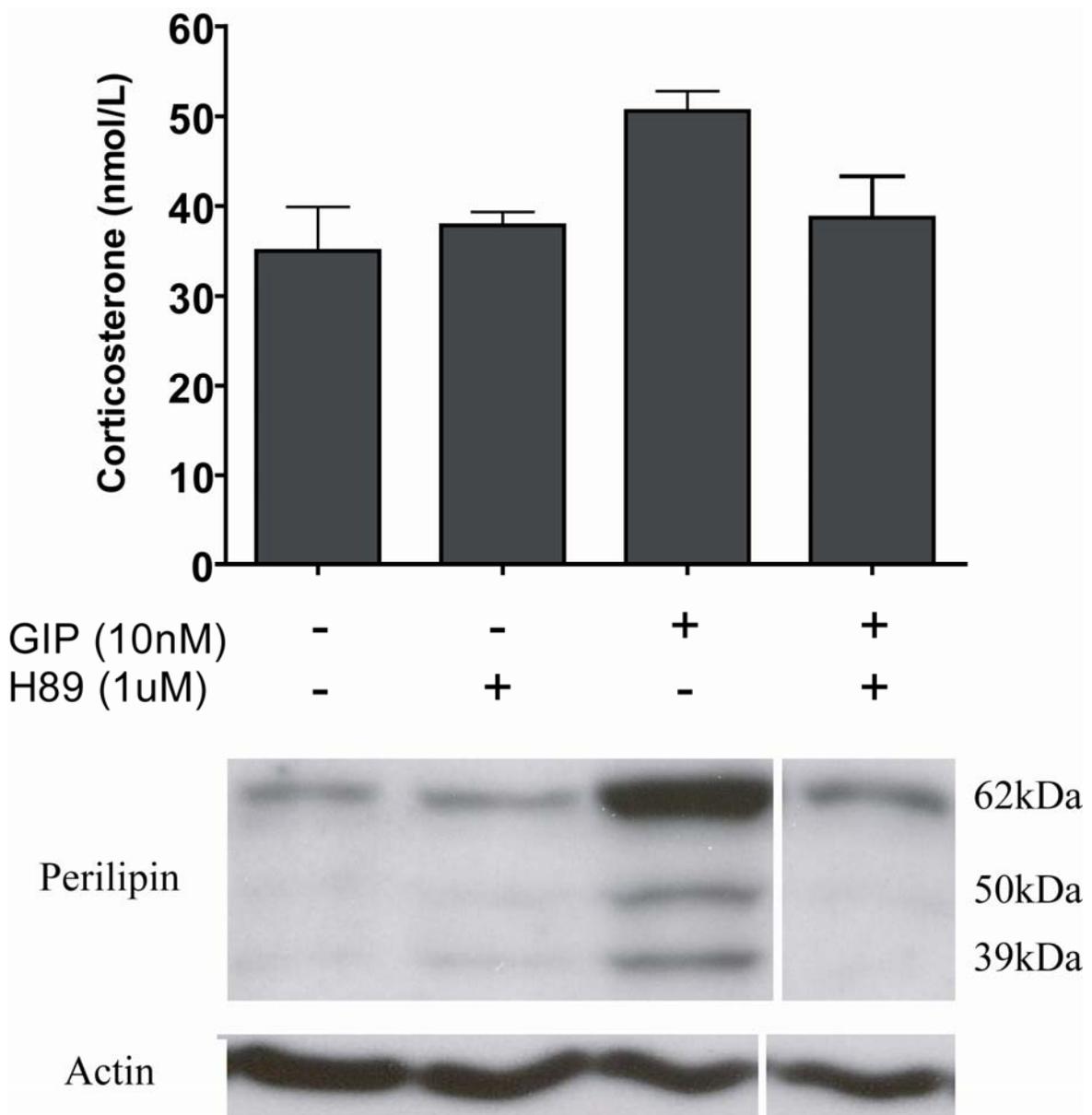


Figure 3

## Reference List

1. Drucker DJ 2006 The biology of incretin hormones. *Cell Metab* 3:153-165
2. Gautier JF, Choukem SP, Girard J 2008 Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2:S65-S72
3. Wideman RD, Kieffer TJ 2004 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide as a regulator of beta cell function and fate. *HormMetab Res* 36:782-786
4. Usdin TB, Mezey E, Button DC, Brownstein MJ, Bonner TI 1993 Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* 133:2861-2870
5. Baldacchino V, Oble S, Decarie PO, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A 2005 The Sp transcription factors are involved in the cellular expression of the human glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene and overexpressed in adrenals of patients with Cushing's syndrome. *J MolEndocrinol* 35:61-71
6. Baggio LL, Drucker DJ 2007 Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157
7. Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM 2006 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity(SilverSpring)* 14:1124-1131
8. Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn AM, Strom AK, Brederlau A, Illerskog AC, Nilsson O, Kieffer TJ, Hietala MA, Ricksten A, Eriksson PS 2005 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 25:1816-1825
9. Lampron A, Bourdeau I, Oble S, Godbout A, Schurch W, Arjane P, Hamet P,

- Lacroix A 2008 Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for GIP in a patient with an aldosteronoma. *J Clin Endocrinol Metab*
10. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:375-382
  11. Mazzuco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M 2007 Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *MolCell Endocrinol* 265-266:23-28
  12. Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A 2004 Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J Steroid BiochemMolBiol* 91:171-177
  13. Lampron A, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A 2006 Whole genome expression profiling of glucose-dependent insulintropic peptide (GIP)- and adrenocorticotropin-dependent adrenal hyperplasias reveals novel targets for the study of GIP-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3611-3618
  14. Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Servetnick DA, Schultz CJ, Levin DM, Kimmel AR 1995 Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans* 23:611-615
  15. Brasaemle DL 2007 Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48:2547-2559
  16. Brasaemle DL, Barber T, Kimmel AR, Londos C 1997 Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. *J Biol Chem* 272:9378-9387

17. Pfaffl MW 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45
18. J. Sambrook EFF, T. Maniatis 1989 DNA transfection by calcium precipitation. In: *Molecular cloning: A laboratory manual 2nd edition*: Cold Spring Harbor laboratory press; 30
19. Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, Ehses JA, Hinke SA, Pamir N, McIntosh CH, Pederson RA 2003 A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *FASEB J* 17:91-93
20. Saha PK, Kojima H, Martinez-Botas J, Sunehag AL, Chan L 2004 Metabolic adaptations in the absence of perilipin: increased beta-oxidation and decreased hepatic glucose production associated with peripheral insulin resistance but normal glucose tolerance in perilipin-null mice. *J Biol Chem* 279:35150-35158
21. Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P 2004 Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 318:168-175
22. Aboulaich N, Vener AV, Stralfors P 2006 Hormonal control of reversible translocation of perilipin B to the plasma membrane in primary human adipocytes. *J Biol Chem* 281:11446-11449
23. Kim AC, Hammer GD 2007 Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *MolCell Endocrinol* 265-266:10-16

### 3. Discussion

L'étude de profilage de l'expression génique d'hyperplasies GIP-dépendantes a permis d'identifier la perte d'expression du gène codant pour la périlipine, protéine importante dans le contrôle du stockage intracellulaire de triglycérides. Afin de confirmer l'importance de cette perte d'expression dans la pathophysiologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant, des études fonctionnelles ont été réalisées dans un modèle cellulaire du cortex surrénalien, les cellules Y1. La répression de périlipine a été confirmée au niveau de l'ARNm par RT-PCR ainsi qu'au niveau protéique par Western Blot. La protéine étant presque indétectable dans les cas d'hyperplasies GIP-dépendantes. La répression spécifique de l'expression de *PLIN* par interférence par petits ARN (siRNA) a induit une surexpression significative du *GIPR*, démontrant que la répression de *PLIN* est un événement génétique suffisant pour induire la surexpression du *GIPR*. À l'inverse, la surexpression de *GIPR* par un vecteur d'expression n'a eu aucun effet sur la quantité de *PLIN* exprimé. La stimulation du récepteur, toutefois, a entraîné l'accumulation de la forme phosphorylée de la périlipine ainsi que deux autres isoformes de périlipine, les isoformes B et C.

Cette étude identifie pour la première fois un gène modulé dans les hyperplasies GIP-dépendantes qui a un effet direct sur l'expression de *GIPR*. La question est maintenant de savoir ce qui cause la répression de *PLIN* dans les hyperplasies GIP-dépendantes. Le séquençage de ce gène et de son promoteur est en cours pour déterminer la présence de mutations pouvant mener à ces niveaux d'expression. La présence d'une mutation somatique dans ce gène n'a pas encore été rapportée dans d'autres conditions pathologiques bien que certaines études associent des polymorphismes dans le gène de *PLIN* au

développement de l'obésité et de ses traitements (147-152). Il est cependant connu que le facteur  $\alpha$  de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) est capable d'abolir l'expression de *PLIN* (153). Il a été observé dans l'étude de biopuces que l'expression de plusieurs gènes de la classe fonctionnelle des processus lié à l'immunité est modifiée (voir point précédent) et qu'une séquence induite par TNF $\alpha$  était spécifiquement surexprimée dans les hyperplasies GIP-dépendantes. Il est donc possible qu'une stimulation chronique par TNF $\alpha$  puisse être impliquée dans l'expression aberrante du *GIPR* dans le syndrome de Cushing GIP-dépendante.

Nous avons également noté l'accumulation de deux autres isoformes de la périlipine suite à la stimulation par le GIP. L'un d'eux est l'isoforme C, exprimé uniquement dans les cellules stéroïdiennes (146). Les fonctions de ces isoformes ne sont pas encore connues et la séquence de ceux-ci n'a été identifiée que dans des espèces murines (154). L'architecture du gène humain est toutefois très similaire à celui du rat et de la souris. Les isoformes B et C perdent toutes les zones de régulation par la PKA et semblent jouer un rôle différent que l'isoforme A. Une étude a démontré que l'isoforme B se situe à la membrane cytoplasmique et qu'il peut être modulé par un contrôle hormonal (155). Face à ces observations, il est tentant d'envisager un rôle pour ces isoformes dans la signalisation cellulaire induite à la membrane cytoplasmique et l'implication de ceux-ci dans l'induction de l'expression de différents gènes, dont le *GIPR*.

La présente étude soulève un autre point : comment la répression de la périlipine peut-elle avoir un effet sur l'expression du *GIPR*? Une action directe sur le promoteur de ce gène est peu probable, compte tenu de l'absence de séquences de liaison à l'ADN dans la séquence de *PLIN*. Une autre hypothèse est que la périlipine interagit avec un activateur de la transcription du *GIPR*. Ici encore, aucune donnée n'existe pour supporter cette hypothèse

mais l'implication potentielle des isoformes B et C dans la signalisation intracellulaire est envisageable. La dernière hypothèse est que l'expression du *GIPR* est induite en réaction à l'effet physiologique de la répression de la périlipine. En absence de cette protéine, les stocks de lipides intracellulaires sont perdus. Tel que décrit dans le point IV.3.b de l'introduction, les lipides sont capables de stimuler directement l'expression du *GIPR* via le facteur de transcription PPAR $\alpha$ .

## Partie IV : CONCLUSIONS

L'objectif principal de cette étude était d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'expression aberrante du récepteur au GIP dans les tumeurs du cortex surrénaliens. Bien que nous n'ayons pas identifié de gènes mutés pouvant expliquer clairement à quoi sont dus les niveaux d'expression du récepteur dans ces conditions pathologiques, cette étude a réussi à identifier de nouveaux mécanismes fonctionnels identifiant un lien encore plus fort entre le GIP et la physiologie de la glande surrénale, tant en situation normale avec l'identification de la capacité du GIP à stimuler la sécrétion d'aldostérone et de rénine, que pathologiques avec la démonstration clinique de l'existence de récepteurs aberrants dans des tumeurs productrices d'aldostérone. Cette étude a de plus identifié un grand nombre de gènes candidats et de nouvelles avenues de recherche qui permettront de mieux comprendre la pathophysiologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant. L'un de ces gènes candidats, la périlipine, est particulièrement intéressant. La réplique *in vitro* de ses profils d'expression spécifiques aux hyperplasies GIP-dépendantes a mené à une surexpression spécifique du *GIPR*. En même temps, cette étude relève le rôle potentiellement capital de la périlipine dans la physiologie surrénalienne normale. La caractérisation des isoformes spécifiques au cortex surrénalien et de ses fonctions pourrait identifier un moyen de mobiliser les stocks intracellulaires de cholestérol jusqu'alors inconnu.

## Partie V : DISCUSSION GÉNÉRALE

La glande surrénale est un organe très particulier à étudier. Elle possède deux parties fondamentalement différentes : la medulla et le cortex; ce dernier est divisé en trois zones aux fonctionnalités différentes qui, sous le contrôle d'hormones spécifiques, ont leurs propres mécanismes de prolifération et de différenciation. Si l'on tient aussi en compte les cellules endothéliales de la capsule, les vaisseaux et la matrice extracellulaire, nous obtenons un organe complexe dont l'étude des tumeurs présente plusieurs défis. La présente étude a été fondée en grande partie sur des résultats obtenus *in vivo* et sur des tissus d'origine humaine. Les patients étaient d'âges différents, il s'agissait d'hommes et de femmes atteints, à des degrés de sévérité variables, de différents syndromes. Face à une telle diversité, il est capital d'avoir des protocoles d'investigation *in vivo* robustes et de recueillir le plus de données possibles avant toute chirurgie. Cette étude a bénéficié de l'accessibilité à une équipe d'investigation clinique de pointe dans le domaine d'étude des glandes surrénales. Une précaution particulière doit toutefois être gardée lors de l'analyse des données *in vivo*, ce qui soulève l'importance de la confirmation des observations *in vivo* dans des modèles *in vitro*.

Cette diversité cellulaire a constitué un défi particulier lors de l'étude des profils d'expression des tumeurs. En effet, les préparations d'ARNm ont été faites à partir de tumeurs congelées, obtenues immédiatement après leur résection. Il n'a donc pas été possible de ne sélectionner uniquement les parties hyperplasiques ou nodulaires des tumeurs ou encore uniquement les parties normales. Un défi semblable s'est présenté lors de l'étude de tissus normaux : une tumeur d'origine fasciculée (dans l'exemple d'un syndrome de Cushing) était comparée avec une préparation contenant des cellules des trois

zones du cortex, et même de la medulla. Un moyen utilisé dans d'autres études a été de faire des microdissections au laser de tumeurs et de cortex surrénalien. Bien que cette méthode offre une meilleure spécificité, elle n'est pas précise à 100 % et peut être subjective. De plus, un risque de dénaturer l'ARNm avec le laser est ajouté. Une autre méthode qui pourrait être testée, quoique plus dispendieuse, serait de trier les cellules par cytométrie de flux (FACS). En utilisant un marqueur spécifique, le récepteur à Ang2 par exemple, il serait possible d'isoler avec précision des cellules surrénaliennes de la zone glomérulée.

En utilisant cette technique, il serait intéressant de comparer les niveaux d'expression de la périlipine dans les différentes zones du cortex. Nous postulons que, face au contenu lipidique des cellules de ces zones, la périlipine serait la plus fortement exprimée dans la zone fasciculée. Il aurait été intéressant de pouvoir confirmer cette hypothèse dans cette étude. Il n'a toutefois pas été possible de réaliser de l'immunohistochimie sur les tissus normaux, étant donné que ceux-ci sont fixés dans la paraffine et le formaldéhyde, qui détruisent les contenus lipidiques des tissus et dénaturent les protéines qui y sont liées. Pour palier ce caveat, il faudrait réaliser des immunohistochimies sur des tissus conservés en cryogénie, mais la technique n'était pas encore au point lors de la réalisation de la présente étude.

Pour surmonter le défi constitué par la diversité cellulaire dans l'étude de biopuces, il a fallu développer un protocole statistique rigoureux afin de pouvoir n'isoler que des gènes spécifiques aux hyperplasies GIP-dépendantes. La première étape, et sans doute la plus importante, a été de choisir les contrôles. Les hyperplasies surrénaliennes retrouvées dans les maladies de Cushing constituaient une option intéressante. Ainsi, des hyperplasies secondaires à des hormones signalant par l'intermédiaire de l'AMPc ont pu être

comparées : l'unique différence entre les groupes étant la présence d'un récepteur au GIP fonctionnel exprimé fortement. Tous les tissus ont également été normalisés à l'aide d'un autre contrôle, soit un pool d'ARNm isolé d'une soixantaine de sujets normaux âgés de 10 à 62 ans. Ce contrôle représente bien les profils d'expression retrouvés dans des surrénales normales. C'est maintenant l'habitude dans le laboratoire d'inclure, dans les tests de confirmation, des niveaux d'expression des surrénales normales issues de néphrectomies dont l'ARNm a été isolé au sein de l'équipe. Les variations avec le pool d'ARNm normal sont très rares. La composition de ce pool a toutefois fait ressortir une faiblesse de l'étude : le faible nombre de tissus incorporés dans l'étude. Seulement cinq tissus GIP-dépendant ont pu être inclus, ce qui peut paraître insuffisant. Cependant, il faut préciser que l'extrême rareté de cette pathologie rend difficile la collecte d'un grand nombre de tissus. Il en résulte donc que l'étude n'a pu annuler efficacement la variation inter-individus ou la variation introduite par le sexe et l'âge du patient. Des données provenant de patients supplémentaires permettraient d'améliorer la spécificité de la liste de gènes isolés.

Il a donc fallu mettre au point un protocole statistique rigoureux. L'analyse en série de biopuces (SAM) a été très utile dans l'élimination de gènes non spécifiques. En fait, tous les gènes qui ont passé ce test et dont les profils d'expression ont été vérifiés par RT-PCR en temps réel ont été confirmés. La véracité des données et de la spécificité de la liste de gènes a aussi été confirmée par des tests de hiérarchisation. Ces tests n'étaient pas coordonnés : ils ont été faits sans connaissance préalable des groupes auxquels appartiennent les échantillons. Il s'en est résulté une dichotomie parfaite des groupes de patients. De plus, lorsque nous avons isolé l'ARNm d'une nouvelle tumeur répondant au GIP et que les profils d'expression ont été déterminés par biopuces, cette même hiérarchisation a permis de classer correctement ce tissu dans le groupe GIP-dépendant. Les

données isolées ne demeurent toutefois que des données d'ARNm et ne peuvent être considérées comme des preuves de l'implication fonctionnelle des gènes isolés. La confirmation de cette implication fonctionnelle se fait dans des modèles cellulaires. Ces expériences sont longues et ardues. Il faut donc posséder une connaissance approfondie des échantillons et des gènes cibles avant de se lancer dans ces expériences. Suite aux observations faites dans l'étude de biopuce, la périlipine a été la première cible étudiée *in vitro* et que les résultats préliminaires, rapportés ici, indiquent que cette protéine est bel et bien impliquée dans la pathologie du syndrome de Cushing GIP-dépendant, et ce, même si le lien exact entre la périlipine et le GIPR n'est pas encore compris.

Bien que cette étude ait identifié de nouvelles voies de signalisation de même que plusieurs gènes cibles potentiellement impliqués dans l'expression aberrante du récepteur au GIP dans des tumeurs cortico-surréaliennes, les causes génétiques d'initiation sont encore inconnues. Déjà plusieurs familles ont été identifiées, dont plusieurs membres sont affectés du syndrome de Cushing et répondent de façon aberrante à divers stimuli. Tous les membres affectés ont le même profil de réponses aux tests de stimulation. L'existence d'un facteur génétique dans ces cas est donc fortement envisageable. Une étude de profilage génique à grande échelle par la méthode de petits polymorphismes singuliers (SNP) est actuellement en cours et plusieurs régions chromosomiques sont à l'étude. La moitié des membres présentent des syndromes de Cushing dus à des hyperplasies macronodulaires bilatérales répondant aux agonistes  $\beta$ -adrénergiques et à la vasopressine. L'identification d'une famille avec plusieurs membres atteints du syndrome de Cushing GIP-dépendant pourrait sans doute permettre d'élucider le ou les gènes modifiés dans ces cas.

La mise au point d'un protocole d'investigation clinique est important dans toutes

les études impliquant des patients atteints de conditions pathologiques rares. C'est particulièrement le cas dans les études en endocrinologie, alors que les mesures principales sont des taux d'hormones qui doivent être mis en relation avec des valeurs normales. Dans le cas de la glande surrénale qui suit un cycle circadien, le défi est encore plus grand. Ainsi, de nombreuses précautions doivent être prises pour déterminer le bon diagnostic des patients. Dans les études familiales de réponses aberrantes, mentionnées au paragraphe précédent, le problème se développe à plusieurs niveaux. Tout d'abord, le nombre de sujets est restreint. Il sera difficile de recruter tous les membres de cette famille car les tests cliniques sont intensifs et se déroulent sur trois à quatre jours. Même en les recrutant tous et en identifiant d'autres familles, il sera étonnant de pouvoir recueillir plus de cinquante patients, alors qu'on retrouve plusieurs centaines, voire plusieurs milliers, de sujets dans des études sur le diabète ou l'hypertension. La véracité statistique des données risque donc d'en souffrir, mais cette situation pourra être balancée du fait que les sujets appartiennent à la même famille. Le problème sera alors de déterminer avec certitude les sujets non atteints. Les réponses aberrantes peuvent se développer relativement tard, dans la cinquième ou la sixième décennie de vie. Est-ce que l'absence de réponse est simplement due au fait que les symptômes ne sont pas encore développés? Ou encore, est-ce que les réponses sont présentes mais le syndrome de Cushing est sous-clinique? C'est pour ces raisons qu'une équipe d'investigation clinique et un suivi serré des patients sont essentiels à la réussite d'études cliniques dans le cas des réponses aberrantes de la glande surrénale.

La réalisation de cultures primaires des cellules dispersées de tumeurs retirées par surrénalectomie est un outil puissant pour confirmer les réponses aberrantes mesurées *in vivo*. Comme pour l'utilisation d'ARNm, la clé dans ces techniques est d'avoir accès à des tissus frais. Il est donc primordial d'instaurer une coordination avec les départements de

chirurgie et de pathologie. Nous avons pu, dans cette étude, confirmer plusieurs réponses observées *in vivo* et aussi étendre le profil de réponse d'une tumeur en testant les cellules avec des stimuli qui ne peuvent être utilisés en clinique, comme les inhibiteurs de voies de signalisation. Dans le cas des réponses à la vasopressine ou à la sérotonine, la culture primaire de cellules tumorales a permis de déterminer quel récepteur était impliqué dans les réponses aberrantes. Il est de plus possible de déterminer la sensibilité à un stimulus en essayant plusieurs concentrations. Cette technique permet aussi de démontrer que le stimulus testé agit directement sur la glande surrénale et non à travers une autre hormone. Dans le cas d'une réponse positive à l'aldostérone par exemple, la culture primaire permet de déterminer que le stimulus agit sur la surrénale et qu'il ne stimule pas l'Ang2 ni la relâche de potassium.

La culture primaire de cellules en dispersion possède toutefois un désavantage inhérent à la technique : on retire les cellules de leur environnement naturel. On retire tous les effets de l'environnement extracellulaire comme la matrice extracellulaire qui peut être capitale dans la réponse à des stimuli, comme les facteurs de croissance. Il existe une autre technique de culture primaire qui préserve en partie l'environnement cellulaire : la périfusion. Dans ce cas, la tumeur peut être mise en entier dans un milieu contenant ou non les stimuli d'intérêt. On obtient un monitoring en temps réel de la réponse et l'effet du milieu extracellulaire natif est conservé. Cette technique utilise toutefois une très grande quantité de tissus et limite le nombre de conditions que l'on peut tester. L'idéal serait donc d'allier la périfusion à la culture de cellules en dispersion afin d'obtenir une bonne idée du profil de réponse de la tumeur.

Pour la poursuite de l'étude sur le lien entre le GIP et la physiologie surrénalienne,

plusieurs données au niveau moléculaire devraient être recueillies. Tout d'abord, il faut comprendre les mécanismes de signalisation du GIP dans les cellules surrenaliennes. Dans les îlots  $\beta$  du pancréas, le GIP stimule la prolifération *via* la MAP kinase p38. Or cette protéine n'est pas impliquée dans les mécanismes de prolifération induits par l'ACTH. La question consiste donc à savoir si le GIP ne fait qu'emprunter la voie de signalisation de l'ACTH ou s'il recrute l'activation de voies de signalisation propre à lui? De plus, Le GIP peut de plus signaler à travers un grand nombre de voies de signalisation différentes, notamment la PLC ou la protéine kinase B. Bien que le GIP agisse à travers l'AMPc dans les cas de syndrome de Cushing GIP-dépendant, qu'en est-il des aldostéromes répondant au GIP? À ce sujet, une comparaison des gènes induits par l'ACTH à ceux induits par le GIPR serait particulièrement intéressante. La lignée cellulaire H295R serait aussi intéressante pour cette étude puisqu'elle ne répond ni à l'ACTH ni au GIP et qu'il serait possible d'insérer ces deux réponses *de novo* par transfection ou par infection lentivirale. La corrélation des gènes isolés par cette technique à ceux observés dans l'étude de biopuces de cas de syndrome de Cushing GIP-dépendant permettrait d'identifier les gènes induits par le GIP de même que les gènes potentiellement en amont de l'expression aberrante du GIPR. La fonction du GIPR dans les cellules de la zone glomérulée doit aussi être clarifiée. Bien qu'il puisse stimuler la production d'aldostérone, il faut se demander s'il est également capable d'induire la prolifération et la différenciation des cellules souches ou progénitrices du cortex surrenalien. L'isolation des cellules cortico-surrenalienne exprimant le GIPR par FACS permettrait de déterminer leur rôle exact mais aussi les possibles déterminant de l'expression du GIPR dans ces cellules. La perte d'un mécanisme de répression serait une des manières d'expliquer les niveaux d'expression aberrant du GIPR dans les tumeurs corticosurrenaliennes.

En raison de l'hétérogénéité des tumeurs et de la rareté des cas, l'étude des cas de syndrome de Cushing GIP-dépendant peut s'avérer ardue. En associant des études cliniques à de puissantes technologies *in vitro*, nos travaux ont réussi à identifier de nouvelles voies de recherche prometteuses pour les rôles du GIP et de son récepteur dans la physiologie normale de la surrénale, pour la régulation de l'expression du récepteur au GIP ainsi que pour le rôle des récepteurs aberrants dans la pathophysiologie des tumeurs et hyperplasies surrénaliennes.

## Bibliographie

1. Williams RH, Larsen PR 2003 Williams textbook of endocrinology. 10th ed. Philadelphia: Saunders
2. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP 2005 Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146:1018-1024
3. Vinson GP 2003 Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech* 61:227-239
4. Mitani F, Suzuki H, Hata J, Ogishima T, Shimada H, Ishimura Y 1994 A novel cell layer without corticosteroid-synthesizing enzymes in rat adrenal cortex: histochemical detection and possible physiological role. *Endocrinology* 135:431-438
5. Mitani F, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y 2003 The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta* 1619:317-324
6. Kraemer FB 2007 Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:42-45
7. Atlas SA 2007 The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 13:9-20
8. Capponi AM 2004 The control by angiotensin II of cholesterol supply for aldosterone biosynthesis. *Mol Cell Endocrinol* 217:113-118
9. Schweda F, Friis U, Wagner C, Skott O, Kurtz A 2007 Renin release. *Physiology (Bethesda)* 22:310-319
10. Williams GH 2005 Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. *Heart Fail Rev* 10:7-13
11. Yamazaki T, Kawasaki H, Takamasa A, Yoshitomi T, Kominami S 2006 Ca<sup>2+</sup> signal stimulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in bovine adrenal fasciculata-reticularis cells. *Life Sci* 78:2923-2930
12. Bassett MH, White PC, Rainey WE 2004 The regulation of aldosterone synthase expression. *Mol Cell Endocrinol* 217:67-74
13. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE 2004 The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* 18:279-290
14. Foster RH 2004 Reciprocal influences between the signalling pathways regulating proliferation and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *J Mol Endocrinol* 32:893-902
15. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP 1998 Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19:101-143
16. Gambaryan S, Butt E, Tas P, Smolenski A, Allolio B, Walter U 2006 Regulation of aldosterone production from zona glomerulosa cells by ANG II and cAMP: evidence for PKA-independent activation of CaMK by cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E423-433
17. Connell JM, Davies E 2005 The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* 186:1-20
18. Clark AJ, Baig AH, Noon L, Swords FM, Hunyady L, King PJ 2003 Expression,

- desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). *Ann N Y Acad Sci* 994:111-117
19. Miller WL 2007 Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 1771:663-676
  20. Miller WL 2007 StAR search--what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* 21:589-601
  21. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P 2001 Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 22:75-110
  22. Waterman MR, Bischof LJ 1996 Mechanisms of ACTH(cAMP)-dependent transcription of adrenal steroid hydroxylases. *Endocr Res* 22:615-620
  23. Sewer MB, Waterman MR 2003 ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 61:300-307
  24. Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Bertagna X, Bertherat J 2002 Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann N Y Acad Sci* 968:65-74
  25. Rocha KM, Forti FL, Lepique AP, Armelin HA 2003 Deconstructing the molecular mechanisms of cell cycle control in a mouse adrenocortical cell line: roles of ACTH. *Microsc Res Tech* 61:268-274
  26. Rainey WE, Nakamura Y 2008 Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:281-286
  27. Nguyen AD, Conley AJ 2008 Adrenal androgens in humans and nonhuman primates: production, zonation and regulation. *Endocr Dev* 13:33-54
  28. Peri A, Danza G, Benvenuti S, Luciani P, Deledda C, Rosati F, Cellai I, Serio M 2009 New insights on the neuroprotective role of sterols and sex steroids: the seladin-1/DHCR24 paradigm. *Front Neuroendocrinol* 30:119-129
  29. Battista MC, Roberge C, Martinez A, Gallo-Payet N 2009 DHCR24/Seladin-1: a key protein differentially involved in ACTH effects observed in human and rat adrenal cortex. *Endocrinology*
  30. Kim AC, Hammer GD 2007 Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:10-16
  31. Kim AC, Barlaskar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, Krill KT, Scheys JO, Simon DP, Trovato A, Yang WH, Hammer GD 2009 In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev* 30:241-263
  32. Forti FL, Dias MH, Armelin HA 2006 ACTH receptor: ectopic expression, activity and signaling. *Mol Cell Biochem* 293:147-160
  33. Watanabe G, Pena P, Albanese C, Wilsbacher LD, Young JB, Pestell RG 1997 Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo. *J Biol Chem* 272:20063-20069
  34. Lotfi CF, Armelin HA 2001 cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells. *J Endocrinol* 168:381-389
  35. Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N 2007 Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *J Endocrinol* 193:331-347
  36. Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N 2007 The growth-promoting effects of angiotensin II in adrenal glomerulosa cells: an interactive tale. *Mol Cell*

- Endocrinol 273:1-5
37. Feige JJ 2009 Angiogenesis in adrenocortical physiology and tumor development. *Ann Endocrinol (Paris)* 70:153-155
  38. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E 1993 Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 91:2235-2243
  39. Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A, Feige JJ 2006 Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol* 20:916-930
  40. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ 2004 Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology* 145:4320-4329
  41. Teboul M, Guillaumond F, Grechez-Cassiau A, Delaunay F 2008 The nuclear hormone receptor family round the clock. *Mol Endocrinol* 22:2573-2582
  42. Gross KL, Cidlowski JA 2008 Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab* 19:331-339
  43. Levin ER 2008 Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1425-1430
  44. Stahn C, Buttgereit F 2008 Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:525-533
  45. Verrey F, Fakitsas P, Adam G, Staub O 2008 Early transcriptional control of ENaC (de)ubiquitylation by aldosterone. *Kidney Int* 73:691-696
  46. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J 1999 The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 341:709-717
  47. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, Neaton J, Roniker B, Hurley S, Burns D, Bittman R, Kleiman J 2001 The EPHEsus trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. *Cardiovasc Drugs Ther* 15:79-87
  48. Rocha R, Stier CT, Jr. 2001 Pathophysiological effects of aldosterone in cardiovascular tissues. *Trends Endocrinol Metab* 12:308-314
  49. Cohn JN, Colucci W 2006 Cardiovascular effects of aldosterone and post-acute myocardial infarction pathophysiology. *Am J Cardiol* 97:4F-12F
  50. Pippal JB, Fuller PJ 2008 Structure-function relationships in the mineralocorticoid receptor. *J Mol Endocrinol* 41:405-413
  51. Funder JW 2009 Reconsidering the roles of the mineralocorticoid receptor. *Hypertension* 53:286-290
  52. Parker CR, Jr. 1999 Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate production in the human adrenal during development and aging. *Steroids* 64:640-647
  53. Boscaro M, Arnaldi G 2009 Approach to the patient with possible Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3121-3131
  54. Pivonello R, De Martino MC, De Leo M, Lombardi G, Colao A 2008 Cushing's Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37:135-149, ix
  55. Biller BM, Grossman AB, Stewart PM, Melmed S, Bertagna X, Bertherat J,

- Buchfelder M, Colao A, Hermus AR, Hofland LJ, Klibanski A, Lacroix A, Lindsay JR, Newell-Price J, Nieman LK, Petersenn S, Sonino N, Stalla GK, Swearingen B, Vance ML, Wass JA, Boscaro M 2008 Treatment of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2454-2462
56. Isidori AM, Lenzi A 2007 Ectopic ACTH syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51:1217-1225
  57. Stratakis CA 2008 Cushing syndrome caused by adrenocortical tumors and hyperplasias (corticotropin-independent Cushing syndrome). *Endocr Dev* 13:117-132
  58. Mulatero P, Dluhy RG, Giacchetti G, Boscaro M, Veglio F, Stewart PM 2005 Diagnosis of primary aldosteronism: from screening to subtype differentiation. *Trends Endocrinol Metab* 16:114-119
  59. Fardella CE, Mosso L, Gomez-Sanchez C, Cortes P, Soto J, Gomez L, Pinto M, Huete A, Oestreicher E, Foradori A, Montero J 2000 Primary hyperaldosteronism in essential hypertensives: prevalence, biochemical profile, and molecular biology. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 85:1863-1867
  60. Young WF 2007 Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:607-618
  61. Lim PO, Young WF, MacDonald TM 2001 A review of the medical treatment of primary aldosteronism. *J Hypertens* 19:353-361
  62. Mulatero P, Morello F, Veglio F 2004 Genetics of primary aldosteronism. *J Hypertens* 22:663-670
  63. Stowasser M, Gordon RD 2006 Monogenic mineralocorticoid hypertension. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:401-420
  64. Schirpenbach C, Reincke M 2007 Primary aldosteronism: current knowledge and controversies in Conn's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:220-227
  65. 2006 The evaluation and treatment of androgen excess. *Fertil Steril* 86:S241-247
  66. Demirci C, Witchel SF 2008 Congenital adrenal hyperplasia. *Dermatol Ther* 21:340-353
  67. Singh PK, Buch HN 2008 Adrenal incidentaloma: evaluation and management. *J Clin Pathol* 61:1168-1173
  68. Stratakis CA 2003 Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab* 14:404-410
  69. Reincke M, Beuschlein F, Slawik M, Borm K 2000 Molecular adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3:63-68
  70. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB 2008 Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist* 13:548-561
  71. Gicquel C, Le Bouc Y 1997 Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. *Horm Res* 47:269-272
  72. Moule RN, Jhavar SG, Eeles RA 2006 Genotype phenotype correlation in Li-Fraumeni syndrome kindreds and its implications for management. *Fam Cancer* 5:129-133
  73. Libe R, Groussin L, Tissier F, Elie C, Rene-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J 2007 Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res* 13:844-850
  74. Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla

- P 2008 Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* 261:21-25
75. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR 2005 Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90:615-619
  76. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, Oliveira AG, Michalkiewicz E, Rodrigues GA, Zambetti G, Haddad BR, Lalli E 2006 SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 42:1040-1043
  77. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM 2003 Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 162:521-531
  78. Libe R, Bertherat J 2005 Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur J Endocrinol* 153:477-487
  79. White ML, Doherty GM 2008 Multiple endocrine neoplasia. *Surg Oncol Clin N Am* 17:439-459, x
  80. Sidhu S, Gicquel C, Bambach CP, Campbell P, Magarey C, Robinson BG, Delbridge LW 2003 Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumorigenesis. *ANZ J Surg* 73:727-738
  81. Agarwal SK, Kennedy PA, Scacheri PC, Novotny EA, Hickman AB, Cerrato A, Rice TS, Moore JB, Rao S, Ji Y, Mateo C, Libutti SK, Oliver B, Chandrasekharappa SC, Burns AL, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ 2005 Menin molecular interactions: insights into normal functions and tumorigenesis. *Horm Metab Res* 37:369-374
  82. Boikos SA, Stratakis CA 2006 Carney complex: pathology and molecular genetics. *Neuroendocrinology* 83:189-199
  83. Horvath A, Stratakis C 2007 Primary pigmented nodular adrenocortical disease and Cushing's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51:1238-1244
  84. Diaz A, Danon M, Crawford J 2007 McCune-Albright syndrome and disorders due to activating mutations of GNAS1. *J Pediatr Endocrinol Metab* 20:853-880
  85. Barker N 2008 The canonical Wnt/beta-catenin signalling pathway. *Methods Mol Biol* 468:5-15
  86. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, Libutti SK, Stratakis CA 2004 Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 23:1575-1585
  87. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I 2008 Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:264-270
  88. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, Rene-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J 2005 Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* 65:7622-7627
  89. Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, Libe R, Ragazzon B, Launay P, Audebourg A,

- Dousset B, Bertagna X, Bertherat J 2008 Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4135-4140
90. Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, Lavery GG, Parker KL, Hammer GD 2008 Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* 135:2593-2602
  91. Stratakis CA 2009 New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 300:152-157
  92. Mazzuco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M 2006 Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 91:196-203
  93. Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ, Thomas M 2006 Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology* 147:782-790
  94. Bourdeau I, Stratakis CA 2002 Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Ann N Y Acad Sci* 968:240-255
  95. Sevetson BR, Kong X, Lawrence JC, Jr. 1993 Increasing cAMP attenuates activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10305-10309
  96. Liu J, Li XD, Ora A, Heikkila P, Vaheri A, Voutilainen R 2004 cAMP-dependent protein kinase activation inhibits proliferation and enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-alpha in NCI-H295R adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol* 33:511-522
  97. André Lacroix IB, Antoine Lampron, Tânia Longo Mazzuco, Johanne Tremblay, Pavel Hamet 2009 Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clinical Endocrinology*
  98. Albiger NM, Occhi G, Mariniello B, Iacobone M, Favia G, Fassina A, Faggian D, Mantero F, Scaroni C 2007 Food-dependent Cushing's syndrome: from molecular characterization to therapeutical results. *Eur J Endocrinol* 157:771-778
  99. Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn JM, Vaudry H, Lefebvre H 2005 In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1302-1310
  100. Dall'Asta C, Ballare E, Mantovani G, Ambrosi B, Spada A, Barbetta L, Colombo P, Travaglini P, Loli P, Beck-Peccoz P 2004 Assessing the presence of abnormal regulation of cortisol secretion by membrane hormone receptors: in vivo and in vitro studies in patients with functioning and non-functioning adrenal adenoma. *Horm Metab Res* 36:578-583
  101. Groussin L, Perlemoine K, Contesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot P, Schlienger JL, Luton JP, Bertagna X, Bertherat J 2002 The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral

- tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1980-1985
102. Costa MH, Latronico AC, Martin RM, Barbosa AS, Almeida MQ, Lotfi CF, Valassi HP, Nishi MY, Lucon AM, Siqueira SA, Zerbini MC, Carvalho LR, Mendonca BB, Fragoso MC 2009 Expression profiles of the glucose-dependent insulinotropic peptide receptor and LHCGR in sporadic adrenocortical tumors. *J Endocrinol* 200:167-175
  103. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, Lefebvre H 2006 Expression of serotonin<sub>7</sub> receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4578-4586
  104. Mazzuco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M 2007 Aberrant GPCR expression is a sufficient genetic event to trigger adrenocortical tumorigenesis. *MolCell Endocrinol* 265-266:23-28
  105. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P 1997 Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 337:1429-1434
  106. Abdallah MA, Lei ZM, Li X, Greenwold N, Nakajima ST, Jauniaux E, Rao Ch V 2004 Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:952-956
  107. Pabon JE, Li X, Lei ZM, Sanfilippo JS, Yussman MA, Rao CV 1996 Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2397-2400
  108. Lacroix A, Hamet P, Boutin JM 1999 Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 341:1577-1581
  109. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM 1998 Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 30:398-403
  110. Lefebvre H, Duparc C, Cartier D, Contesse V, Perraudin V, Bertherat J, Plouin PF, Reznik Y, Kuhn JM, Louiset E 2009 Autocrine/paracrine regulations of steroidogenesis in adrenocortical hyperplasias and tumors. *Ann Endocrinol (Paris)*
  111. Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B, Reincke M 2001 Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:627-632
  112. Nakamura Y, Son Y, Kohno Y, Shimono D, Kuwamura N, Koshiyama H, Sasano H, Matsuda T 2001 Case of adrenocorticotrophic hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II. *Endocrine* 15:57-61
  113. Tsagarakis S, Tsigos C, Vassiliou V, Tsiotra P, Pratsinis H, Kletsas D, Trivizas P, Nikou A, Mavromatis T, Sotsiou F, Raptis S, Thalassinou N 2001 Food-dependent androgen and cortisol secretion by a gastric inhibitory polypeptide-receptor expressive adrenocortical adenoma leading to hirsutism and subclinical Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 86:583-589
  114. Leinonen P, Ranta T, Sieberg R, Pelkonen R, Heikkila P, Kahri A 1991 Testosterone-secreting virilizing adrenal adenoma with human chorionic gonadotrophin receptors and 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)* 34:31-35
  115. Goodarzi MO, Dawson DW, Li X, Lei Z, Shintaku P, Rao CV, Van Herle AJ 2003

- Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 88:73-77
116. Ye P, Mariniello B, Mantero F, Shibata H, Rainey WE 2007 G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol* 195:39-48
  117. Cartier D, Jegou S, Parmentier F, Lihrmann I, Louiset E, Kuhn JM, Bastard C, Plouin PF, Godin M, Vaudry H, Lefebvre H 2005 Expression profile of serotonin4 (5-HT4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol* 153:939-947
  118. Saner-Amigh K, Mayhew BA, Mantero F, Schiavi F, White PC, Rao CV, Rainey WE 2006 Elevated expression of luteinizing hormone receptor in aldosterone-producing adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 91:1136-1142
  119. Zwermann O, Suttman Y, Bidlingmaier M, Beuschlein F, Reincke M 2009 Screening for membrane hormone receptor expression in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol* 160:443-451
  120. Baggio LL, Drucker DJ 2007 Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157
  121. Wideman RD, Kieffer TJ 2004 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide as a regulator of beta cell function and fate. *HormMetab Res* 36:782-786
  122. Gautier JF, Choukem SP, Girard J 2008 Physiology of incretins (GIP and GLP-1) and abnormalities in type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 34 Suppl 2:S65-S72
  123. Baggio LL, Drucker DJ 2007 Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131-2157
  124. Getty-Kaushik L, Song DH, Boylan MO, Corkey BE, Wolfe MM 2006 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide modulates adipocyte lipolysis and reesterification. *Obesity(SilverSpring)* 14:1124-1131
  125. Weaver RE, Donnelly D, Wabitsch M, Grant PJ, Balmforth AJ 2008 Functional expression of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptors is coupled to differentiation in a human adipocyte model. *Int J Obes (Lond)* 32:1705-1711
  126. Kim SJ, Nian C, McIntosh CH 2007 Activation of lipoprotein lipase by glucose-dependent insulinotropic polypeptide in adipocytes. A role for a protein kinase B, LKB1, and AMP-activated protein kinase cascade. *J BiolChem* 282:8557-8567
  127. Xie D, Zhong Q, Ding KH, Cheng H, Williams S, Correa D, Bollag WB, Bollag RJ, Insogna K, Troiano N, Coady C, Hamrick M, Isales CM 2007 Glucose-dependent insulinotropic peptide-overexpressing transgenic mice have increased bone mass. *Bone* 40:1352-1360
  128. Zhong Q, Itokawa T, Sridhar S, Ding KH, Xie D, Kang B, Bollag WB, Bollag RJ, Hamrick M, Insogna K, Isales CM 2007 Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E543-548
  129. Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron R, Mulloy AL, Rasmussen H, Qin F, Ding KH, Isales CM 2000 Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic peptide receptors. *Endocrinology* 141:1228-1235
  130. Zhong Q, Ding KH, Mulloy AL, Bollag RJ, Isales CM 2003 Glucose-dependent insulinotropic peptide stimulates proliferation and TGF-beta release from MG-63 cells. *Peptides* 24:611-616
  131. Tsukiyama K, Yamada Y, Yamada C, Harada N, Kawasaki Y, Ogura M, Bessho K, Li M, Amizuka N, Sato M, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka K, Oiso Y, Seino Y

- 2006 Gastric inhibitory polypeptide as an endogenous factor promoting new bone formation after food ingestion. *Mol Endocrinol* 20:1644-1651
132. Nyberg J, Anderson MF, Meister B, Alborn AM, Strom AK, Brederlau A, Illerskog AC, Nilsson O, Kieffer TJ, Hietala MA, Ricksten A, Eriksson PS 2005 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 25:1816-1825
  133. Nyberg J, Jacobsson C, Anderson MF, Eriksson PS 2007 Immunohistochemical distribution of glucose-dependent insulinotropic polypeptide in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 85:2099-2119
  134. Holscher C, Li L 2008 New roles for insulin-like hormones in neuronal signalling and protection: New hopes for novel treatments of Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging*
  135. Antonini SR, N'Diaye N, Baldacchino V, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A 2004 Analysis of the putative regulatory region of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in food-dependent Cushing's syndrome. *J Steroid BiochemMolBiol* 91:171-177
  136. Baldacchino V, Oble S, Hamet P, Tremblay J, Bourdeau I, Lacroix A 2004 The Sp transcription factor family is involved in the cellular expression of the human GIP-R gene promoter. *EndocrRes* 30:805-806
  137. Mazzocchi G, Rebuffat P, Meneghelli V, Malendowicz LK, Tortorella C, Gottardo G, Nussdorfer GG 1999 Gastric inhibitory polypeptide stimulates glucocorticoid secretion in rats, acting through specific receptors coupled with the adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Peptides* 20:589-594
  138. Boylan MO, Jepeal LI, Wolfe MM 1999 Structure of the rat glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene. *Peptides* 20:219-228
  139. Baldacchino V, Oble S, Hamet P, Tremblay J, Lacroix A 2002 Partial characterisation of the 5' flanking region of the human GIP receptor (GIPR) gene. *Endocr Res* 28:577
  140. Baldacchino V, Oble S, Hamet P, Tremblay J, Bourdeau I, Lacroix A 2004 The Sp transcription factor family is involved in the cellular expression of the human GIP-R gene promoter. *Endocr Res* 30:805-806
  141. Boylan MO, Jepeal LI, Wolfe MM 2006 Sp1/Sp3 binding is associated with cell-specific expression of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290:E1287-1295
  142. Lynn FC, Thompson SA, Pospisilik JA, Ehses JA, Hinke SA, Pamir N, McIntosh CH, Pederson RA 2003 A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. *FASEB J* 17:91-93
  143. Xu G, Kaneto H, Laybutt DR, Duvivier-Kali VF, Trivedi N, Suzuma K, King GL, Weir GC, Bonner-Weir S 2007 Downregulation of GLP-1 and GIP receptor expression by hyperglycemia: possible contribution to impaired incretin effects in diabetes. *Diabetes* 56:1551-1558
  144. Pan QR, Li WH, Wang H, Sun Q, Xiao XH, Brock B, Schmitz O 2009 Glucose, metformin, and AICAR regulate the expression of G protein-coupled receptor members in INS-1 beta cell. *Horm Metab Res* 41:799-804
  145. Aerts S, Thijs G, Coessens B, Staes M, Moreau Y, Moor BD 2003 Toucan: deciphering the cis-regulatory logic of coregulated genes. *Nucl Acids Res* 31:1753-1764

146. Servetnick DA, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, Kimmel AR, Wolff J, Londos C 1995 Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem* 270:16970-16973
147. Deram S, Nicolau CY, Perez-Martinez P, Guazzelli I, Halpern A, Wajchenberg BL, Ordovas JM, Villares SM 2008 Effects of perilipin (PLIN) gene variation on metabolic syndrome risk and weight loss in obese children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4933-4940
148. Qi L, Zhang C, Greenberg A, Hu FB 2008 Common variations in perilipin gene, central obesity, and risk of type 2 diabetes in US women. *Obesity (Silver Spring)* 16:1061-1065
149. Kang ES, Cha BS, Kim HJ, Kim SH, Hur KY, Lee HJ, Shim WS, Ahn CW, Lee HC 2006 The 11482G >A polymorphism in the perilipin gene is associated with weight gain with rosiglitazone treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 29:1320-1324
150. Mottagui-Tabar S, Ryden M, Lofgren P, Faulds G, Hoffstedt J, Brookes AJ, Andersson I, Arner P 2003 Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. *Diabetologia* 46:789-797
151. Yan W, Chen S, Huang J, Shen Y, Qiang B, Gu D 2004 Polymorphisms in PLIN and hypertension combined with obesity and lipid profiles in Han Chinese. *Obes Res* 12:1733-1737
152. Qi L, Shen H, Larson I, Schaefer EJ, Greenberg AS, Tregouet DA, Corella D, Ordovas JM 2004 Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population. *Obes Res* 12:1758-1765
153. Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P 2004 Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 318:168-175
154. Brasaemle DL, Barber T, Kimmel AR, Londos C 1997 Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. *J Biol Chem* 272:9378-9387
155. Aboulaich N, Vener AV, Stralfors P 2006 Hormonal control of reversible translocation of perilipin B to the plasma membrane in primary human adipocytes. *J Biol Chem* 281:11446-11449