



HAL
open science

CONTRIBUTION DE L'EXPRESSION ANORMALE DE RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G À LA TUMORIGENESE CORTICO-SURRENALIENNE

Tânia Longo Mazzuco

► **To cite this version:**

Tânia Longo Mazzuco. CONTRIBUTION DE L'EXPRESSION ANORMALE DE RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G À LA TUMORIGENESE CORTICO-SURRENALIENNE. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00009050

HAL Id: tel-00009050

<https://theses.hal.science/tel-00009050>

Submitted on 18 Apr 2005

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

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

Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Doctorat

Biologie Cellulaire et Moléculaire

Tânia Longo MAZZUCO

CONTRIBUTION DE L'EXPRESSION ANORMALE DE
RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G
À LA TUMORIGENESE CORTICO-SURRENALIENNE

Thèse dirigée par : Pr. Olivier CHABRE

Co-directeur : Dr. Michaël THOMAS

Le 5 avril 2005

Jury :

Pr. André LACROIX

Pr. Eric CLAUSER

Pr. Duarte PIGNATELLI

Pr. Jacques YOUNG

Dr. Michaël THOMAS

Pr. Olivier CHABRE

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Ecole Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Doctorat

Biologie Cellulaire et Moléculaire

Tânia Longo MAZZUCO

CONTRIBUTION DE L'EXPRESSION ANORMALE DE
RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G
À LA TUMORIGENESE CORTICO-SURRENALIENNE

Thèse dirigée par : Pr. Olivier CHABRE

Co-directeur : Dr. Michaël THOMAS

Le 5 avril 2005

Jury :

Pr. André LACROIX

Pr. Eric CLAUSER

Pr. Duarte PIGNATELLI

Pr. Jacques YOUNG

Dr. Michaël THOMAS

Pr. Olivier CHABRE

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

A Marcos, mon amour, mari et ami.

Remerciements

Je souhaite exprimer mes remerciements :

Aux membres du jury, les professeurs Eric Clauser, André Lacroix, Duarte Pignatelli et Jacques Young, qui ont accepté de se déplacer de Paris, de Montréal ou de Porto, et de consacrer leur temps pour la lecture et la critique de ce travail de thèse.

A Olivier Chabre pour m'avoir accueillie dès mon arrivée en France, quand j'étais interne dans le service d'Endocrinologie du Prof. Bachelot au CHU de Grenoble ; merci à tous les deux pour le soutien, l'amitié et les enseignements fondamentaux et cliniques.

A Jean-Jacques Feige qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et m'a orientée au cours de ce travail.

A Michaël Thomas qui a agréablement co-dirigé ce travail pour lequel sa participation a été essentielle.

A tous les membres de l'EMI 0105 pour leur aide et pour les corrections de mon français durant ces dernières années:

- ceux qui étaient ici lors de mon arrivée et que j'ai vu partir du laboratoire : Gwen, qui m'a guidée dans la biologie moléculaire, mes chers collègues thésards Del et Sam, ainsi que Manu, Mme. Defaye, Josiane et Léone

- ceux que j'ai vu arriver dans l'unité : Nadia avec laquelle j'ai partagé le bureau, l'amitié et la science; Caro, Laurent et Sév qui ont bien ri avec moi (et de moi) pour surmonter les moments plus difficiles; Nadia bis et Agnès qui ont toléré mes allers-retours dans leur bureau pour poser des questions à Michaël ; Pascale et son enthousiasme lors de nos échanges « gynéco-endocrinologiques » ; Nicole et son amabilité ; Pierre Alain et Emilie, les plus jeunes

- ceux que j'ai rencontrés dès le départ et qui restent dans le laboratoire: Christine, Sabine, Michelle, Bruno, Sonia et M. Chambaz ; merci pour les renseignements quotidiens et les bons moments partagés.

Un merci à Jacques Baudier pour ses discussions culturelles et pour les prêts de matériel, ainsi qu'aux membres de son équipe EMI 0104.

Un merci à Nora, Françoise et Annie pour leur attention, ainsi que la sympathie de Nicolas, Sandrine et Anca (et de toutes les souris) lors de mes allers-retours à l'animalerie.

Je tiens à remercier les amis que j'ai eu la joie de rencontrer à Grenoble et qui m'ont aidée à ne pas perdre mes habitudes brésiliennes : Denise, Genivan, Marianita, Jenny, Viviane, Rafael, Marcelo, Gustavo et Lucile. J'exprime également toute ma sympathie aux amis si nombreux du bâtiment K, ainsi qu'à ceux avec lesquels j'ai pu jouer un peu de musique et me détendre.

Je suis très reconnaissante au personnel du service d'Endocrinologie du CHU de Grenoble, un exemple de gentillesse, avec une pensée spéciale à Monique Martinie pour son efficacité. Je remercie également l'aide des personnes provenant des autres services du CHU tels que l'Anatomie Pathologique, la Chirurgie Générale et Thoracique et le Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles Hormonologiques.

J'aimerais aussi remercier mes amies Myriam et Marie pour leur compréhension et leur soutien, ainsi que mes amis brésiliens et ma famille qui m'ont beaucoup manqués et qui ont tout suivi grâce à internet.

Il m'est impossible de mentionner tous ceux qui, de diverses façons, ont contribué à l'élaboration de ce travail. Je remercie toutes les personnes qui m'ont fait généreusement don de leur temps, de leur savoir et d'un sourire sincère; je ne les oublierai pas.

Finalement, je remercie Dieu, qui est l'Alpha et l'Oméga, le principe et la fin.

Liste des Abréviations.....	7
Table des Illustrations	9

INTRODUCTION

Partie 1. Le cortex surrénalien et son rôle physiologique.....	11
1.1 Glande Surrénale.....	11
1.2 Histologie du cortex surrénalien	13
1.3 Contrôle physiologique du cortex	13
1.3.1 Voie de l'AMPc et stéroïdogénèse.....	15
1.3.2 Effet trophique de l'ACTH	20
1.4 Formation d'un tissu cortico-surrénalien dans un modèle expérimental	22
1.4.1 Culture primaire des cellules cortico-surréaliennes bovines.....	22
1.4.2 Transplantation hétérologue de cellules : formation d'un néo tissu.....	23
Partie 2. La tumorigénèse cortico-surrénalienne	25
2.1 Les lésions tumorales de la surrénale.....	25
2.1.1 Les tumeurs cortico-surréaliennes bénignes	26
2.1.2 Le carcinome cortico-surrénalien.....	28
2.1.3 Caractérisation anatomopathologique.....	30
2.2 Le développement tumoral.....	32
2.3 Aspects moléculaires de la tumorigénèse cortico-surrénalienne.....	34
2.3.1 La recherche des oncogènes cortico-surréaliens	34
2.3.2 Les GPCRs et la voie de l'AC/PKA/AMPc	38
2.3.2 Des nouvelles cibles de l'AMPc	41
2.4 Progression tumorale et stéroïdogénèse	44
Partie 3. Le syndrome de Cushing et les récepteurs surréaliens aberrants.....	47
3.1 Syndrome de Cushing surrénalien.....	47
3.2 Récepteurs surréaliens aberrants	50
3.2.1 Premières descriptions <i>in vitro</i>	50
3.2.2 Expressions cliniques	51
3.3 Explorations cliniques à la recherche d'une expression aberrante.....	60
3.4 Traitement	62
But de l'étude.....	64

RESULTATS

A) Expression ectopique du récepteur du GIP dans un modèle animal	66
Situation du sujet.....	66
Article I “Development of adrenocortical tumor by single expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in a xenotransplantation model”. <i>Tânia L. Mazzuco, Olivier Chabre, Nathalie Sturm, Jean-Jacques Feige & Michaël Thomas.</i>	70
Discussion	92
B) Expression aberrante du récepteur de la LH dans un modèle animal	95
Situation du sujet.....	95
Article II Article II: “Anomalous expression of the single human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells induces in vivo hyperplasia and Cushing’s syndrome features mice”. <i>Tânia L. Mazzuco, Olivier Chabre, Jean-Jacques Feige & Michaël Thomas.</i>	98
Discussion	121
C) Expression aberrante des récepteurs β -adrenergiques : études cliniques et <i>in vitro</i>	123
Situation du sujet.....	123
Article III “Cushing’s syndrome due to bilateral macronodular adrenal hyperplasia with posture-sensitive cortisol secretion: treatment with beta-blocking agents or unilateral adrenalectomy”. <i>Tânia L. Mazzuco, Philippe Chaffanjon, Monique Martinie, Nathalie Sturm & Olivier Chabre</i>	125
Article IV “Characterization of the molecular defects of a macronodular adrenal hyperplasia causing a β -blocker-sensitive Cushing’s syndrome”. <i>Tânia L. Mazzuco, Michaël Thomas, Monique Martinie, Nadia Cherradi, Nathalie Sturm, Jean-Jacques Feige & Olivier Chabre</i>	143
Discussion	165
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	167
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174

Liste des Abréviations

AA = acides aminés
AC = adénylyl cyclase
ACTH = hormone adrenocorticotrope ou corticotrophine
ADN = acide désoxyribonucléique
ADNc = acide désoxyribonucléique complémentaire
AIMAH = *ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia*
AKT = protéine kinase B
ARNm = Acide ribonucléique messenger
AT = angiotensine
ATF-1 = *activating transcription factor 1*
AVP = arginine vasopressine ou ADH (*antidiuretic hormone*)
 β -AR = récepteur bêta-adrénergique
BAC = cellules cortico-surréaliennes bovines
Bcl-2 = *B-cell CLL/lymphoma 2*
cAMP = *adenosine 3',5'-cyclic monophosphate*
C/EBPs = *CCAAT-Enhancer-binding Proteins*
CEH = cholestérol ester hydrolase
CRE = *cAMP-responsive element*
CREB = *CRE-binding protein*
CREM = *CRE modulator*
CRH = corticolibérine
CRS = *cAMP-responsive sequence*
DAX-1 = *dosage-sensitive sex adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1*
DHEAS = *dehydroepiandrosterone sulphate*
EGF = *Endotelium growth factor*
Epac = *Exchange protein directly activated by cAMP*
ERK = *extra-cellular-signal-regulated kinase*
ET = endothéline
FGF-2 = facteur de croissance fibroblastique 2
FSH = *follicle stimulating hormone*
GEF = *guanine nucleotide exchange factor*
GH = *growth hormone*
GIP = *gastric inhibitory polypeptide*
GLP = *glucagon-like peptide*
GnRH = *gonadotrophin-releasing hormone*
GNSA1 = gène de la protéine G α

GTPase = enzyme de transfert de la liaison riche du GTP (guanosine triphosphate)
5-HT = 5 hydroxytryptamine ou sérotonine
hCG = gonadotrophine chorionique humaine
H-Ras = *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*
hTERT = sous-unité catalytique de la télomérase humaine
IGF = *insulin growth factor*
LDLs = *low-density lipoprotein*
LH = hormone lutéinique
MAP = *mitogen-activated protein*
MAPK = *mitogen-activated protein kinase*
MC2R = *melanocortin type 2 receptor*
NEM1 = néoplasie endocrine multiple de type 1
NPY = neuropeptide Y
PBR = *peripheral-type benzodiazepine receptor*
PI3K = *phosphatidylinositol-3-kinase*
PKA = protéine kinase A
PKC = protéine kinase C
pLNCX2 = plasmide rétroviral avec gène de résistance à la néomycine
POMC = pro-opiomélanocortine
PPNAD = *primary pigmented adrenal nodular disease*
PRKAR1A = sous-unité régulatrice R1 alpha de la PKA
RAG = *recombination activating gene*
RCPG = récepteur couplé aux protéines G
RT-PCR = *reverse transcriptase-polymerase chain reaction*
SCID = *severe combined immuno-deficiency*
SF-1 = *Steroidogenic Factor 1*
Sgk = *serum and glucocorticoid induced kinase*
StAR = *steroidogenic acute regulatory*
SV40 TAg = antigène grand T du *simian virus 40*
TGF = *Transforming growth factor*
TSH = thyroestimuline
V1R, V2R et V3R = récepteurs de la vasopressine
VEGF = facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIP = peptide vaso-intestinal actif

Table des Illustrations

Figure 1. Représentation de la structure générale de la glande surrénale chez les mammifères et de la sécrétion hormonale cortico-surrénalienne sous contrôle de l'axe corticotrope.	12
Figure 2. Rythme circadien de sécrétion des glucocorticoïdes chez l'homme et chez la souris.	14
Figure 3. Action de l'ACTH sur la cellule cortico-surrénalienne.	16
Figure 4. Représentation schématique des réponses de la cellule cortico-surrénalienne à l'élévation de l'AMPC et les facteurs de transcription impliqués.	17
Figure 5. Etapes de la biosynthèse des stéroïdes chez l'homme.	19
Figure 6. Modèle de transplantation hétérologue des cellules avec formation d'un néo-tissu cortico-surrénalien.	24
Figure 7. Exemples macro et microscopiques de lésions tumorales typiques du cortex surrénalien.	27
Figure 9. Mécanismes potentiels de la tumorigenèse cortico-surrénalienne.	35
Figure 10. Organisation de la région chromosomique 11p15 chez l'homme.	37
Figure 11. Les voies alternatives de signalisation en aval de l'AMPC.	42
Figure 12. Séquence typique des modifications génétiques impliquées dans la tumorigenèse colorectale.	44
Figure 13. Prévalence des étiologies du syndrome de Cushing de l'adulte.	48
Figure 14. Physiopathologie du syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation.	51
Figure 15. Profil de sécrétion de cortisol plasmatique dans un cas de Cushing secondaire à la surexpression du récepteur de LH/hCG.	56
Figure 16. Réponse des patients porteurs d'un incidentalome surrénalien aux tests cliniques de recherche des récepteurs aberrants.	59

Figure 17. Tests de dépistage ou de confirmation d'une réponse anormale du cortisol <i>via</i> des récepteurs surrenaliens aberrants.	61
Figure 18. Résumé de la procédure utilisée pour la construction rétrovirale pLNCX2 GIPR....	67
Figure 19. Représentation schématique des étapes pour la transduction cellulaire du GIPR. ...	68
Figure 20. Représentation schématique du modèle d'expression ectopique du GIPR dans le cortex surrenalien. Démonstration de son rôle causal dans la formation tumorale bénigne indépendant de l'ACTH.	93
Figure 21. Schéma résumé de l'approche moléculaire utilisé pour obtention d'un rétrovirus codant le gène du récepteur de la LH/hCG.....	96
Figure 22. Modèle d'interprétation des résultats dans la tumorigenèse cortico-surrenalienne...	171
Tableau 1 - Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes surrenaliens.	18
Tableau 2. Classification des incidentalomes surrenaliens.	26
Tableau 3. Les critères positifs définis par Weiss pour l'évaluation pronostique des tumeurs cortico-surrenaliennes.	31
Tableau 4. Les anomalies responsables d'une hyperactivation de la voie de l'AMPC dans les tumeurs endocrines.....	40
Tableau 5. Résultats des tests cliniques systématiques à la recherche des récepteurs surrenaliens aberrants.	62

INTRODUCTION

1. Le cortex surrénalien et son rôle physiologique

1.1 Glande Surrénale

Positionnée au pôle supérieur du rein et en nombre pair chez les mammifères, la glande surrénale a une forme triangulaire et pèse entre 4 et 6 grammes chez un adulte normal. La surrénale est composée de deux parties bien distinctes des points de vue embryologique, histologique et physiologique : le cortex, qui représente 80 à 90 % de la glande, de coloration jaune due à sa teneur élevée en lipides, et la médullaire, partie interne de coloration rougeâtre, composée de cellules chromaffines (Idelman and Verdeti, 2000, Stewart, 2003). La surface de la glande est enveloppée par une capsule conjonctive, faite de fibroblastes et de fibres de collagène.

Le présent travail se concentrera sur le cortex surrénalien, site des cellules dénommées adrénocytes, responsables de la synthèse et la sécrétion des stéroïdes surrénaliens (Figure 1). La stéroïdogénèse est contrôlée principalement par une hormone peptidique d'origine adéno-hypophysaire, l'hormone adrenocorticotrope ou corticotrophine (ACTH). Sa sécrétion est sous le contrôle d'une hormone hypothalamique, la corticolibérine (CRH), libérée par les neurones des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'homéostasie de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, comme le rythme circadien, le stress, ainsi que le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes (Stewart, 2003). Il existe aussi un rétro-contrôle court de l'ACTH circulant sur sa propre sécrétion contrôlée par la CRH. D'autre part, la vasopressine peut aussi stimuler la sécrétion de l'ACTH.

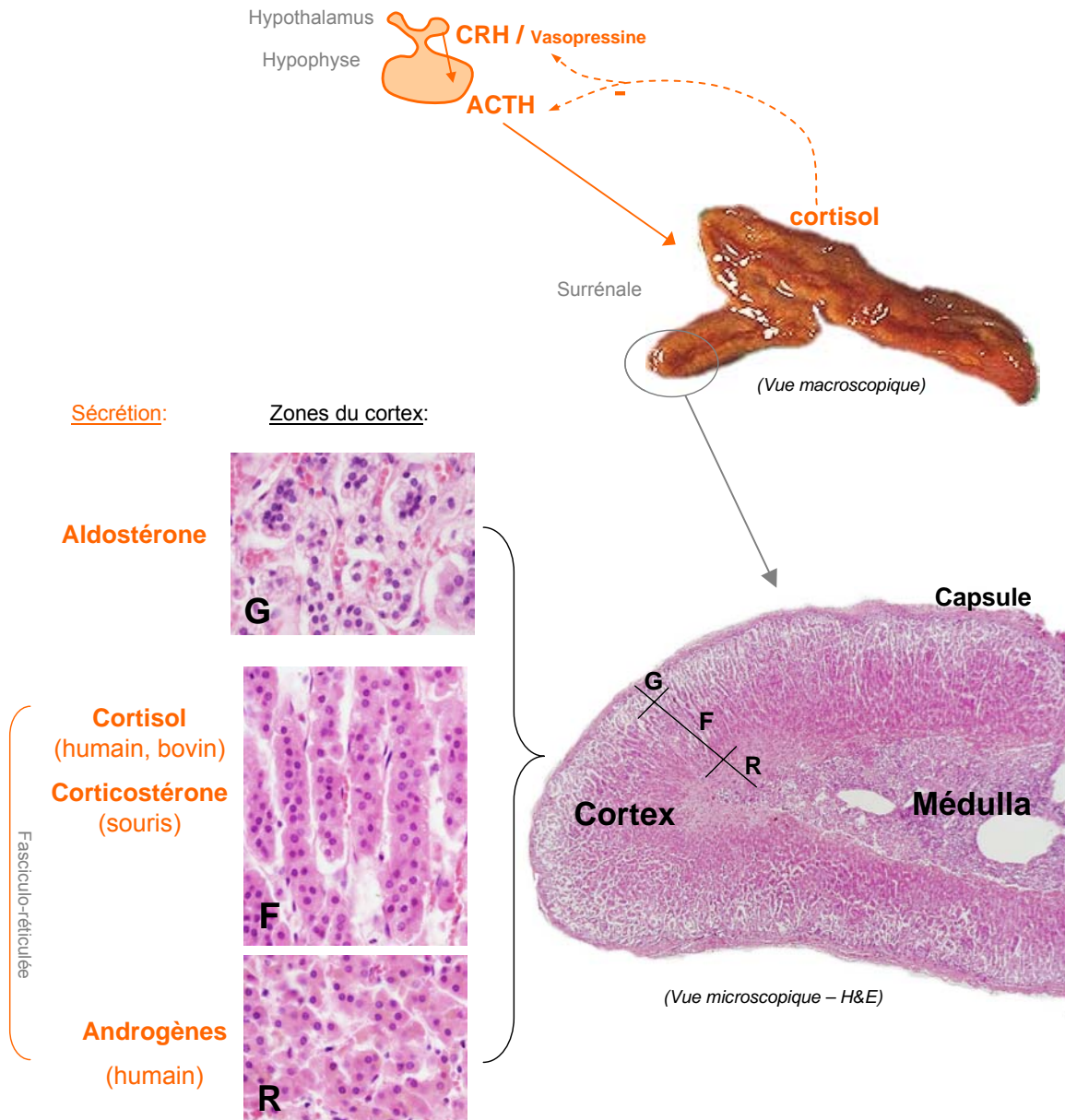


Figure 1. Représentation de la structure générale de la glande surrénale chez les mammifères et de la sécrétion hormonale cortico-surrénalienne sous contrôle de l'axe corticotrope.

Représentation des zones du cortex : glomérulée (**G**), fasciculée (**F**), réticulée (**R**).

1.2 Histologie du cortex surrénalien

Les caractères morphologiques et stéroïdogènes des adrénocytes peuvent être considérés comme des marqueurs phénotypiques. Il existe trois zones morphologiquement distinctes dans le cortex surrénalien examiné en microscopie optique (Figure 1) :

- La zone glomérulée, sous la capsule, correspondant à 5 – 10 % du cortex, formée par des cellules petites et arrondies à noyau dense. C'est la source des hormones minéralocorticoïdes, représentées par l'aldostérone.
- La zone fasciculée, qui occupe les deux tiers de l'épaisseur du cortex, composée de cordons de cellules très riches en lipides. Lors de l'inclusion dans la paraffine, les gouttelettes lipidiques sont dissoutes, donnant aux cellules un aspect spongieux (spongiocytes). La fasciculée est le principal site de synthèse des glucocorticoïdes, dont le plus important est le cortisol chez l'humain et le bovin, la corticostérone chez la souris. Chez l'humain, ces cellules à noyau dense ont un rapport nucléo-cytoplasmique faible, dû à la présence des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme. Par contre, chez les bovidés, ces cellules ont une charge lipidique basse, environ 0,35 % du volume cellulaire (Nussdorfer, 1986).
- La zone réticulée, synthétisant les androgènes, organisée en réseau anastomosé de courtes travées cellulaires entourées de capillaires interdigités. Les cellules sont de taille intermédiaire entre les zones glomérulée et fasciculée et ont une charge lipidique relativement faible, ce qui les a fait nommer « cellules compactes » chez l'homme (Neville and O'Hare, 1985).

1.3 Contrôle physiologique du cortex

L'activité stéroïdogénique du cortex surrénal, de même que la prolifération et la trophicité cellulaires sont sous contrôle hormonal, en particulier sous l'influence de l'ACTH. C'est une hormone polypeptidique de 39 acides aminés (AA) dont la fraction active est constituée par les 24 premiers AA. La perte d'un seul AA de la partie N-terminale supprime complètement l'effet de l'hormone. En revanche, son activité biologique est faiblement dépendante des AA C-terminaux 20 à 39. Sa structure présente une forte homologie chez les mammifères.

L'ACTH est sécrétée par l'antéhypophyse selon un rythme circadien parallèle à celui du cortisol. Cette sécrétion est plutôt diurne chez l'homme et nocturne chez les murins (Figure 2), caractérisée par un premier pic important d'ACTH et par conséquent du cortisol plasmatique à la fin de la période de sommeil (vers 7 heures), suivi d'un deuxième pic de sécrétion moins accentuée vers 13 heures. La demi-vie de l'ACTH est de 20 à 30 minutes chez l'homme et de 1 minute chez la souris (Idelman and Verdeti, 2000). La suppression de sa sécrétion entraîne une atrophie du cortex surrénalien et, inversement, des injections d'ACTH provoquent une hyperplasie des zones fasciculée et réticulée.

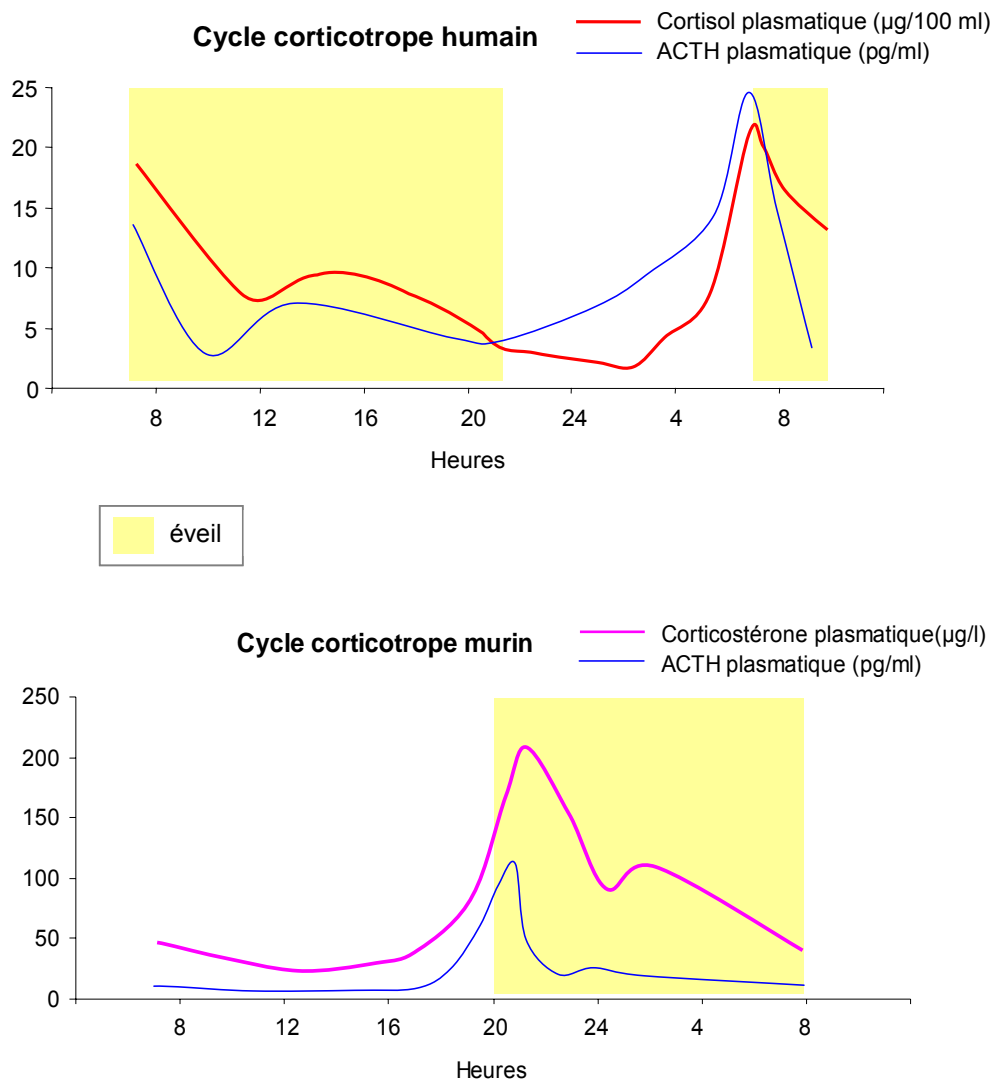


Figure 2. Rythme circadien de sécrétion des glucocorticoïdes chez l'homme et chez la souris.

L'action de l'ACTH sur la surrénale est médiée par sa liaison à un récepteur spécifique faisant partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) : le MC2R (melanocortin type 2 receptor) (Clark, Baig *et al.*, 2003).

Selon les données classiques (Lefkowitz, Roth *et al.*, 1971), l'ACTH agit via l'activation de son récepteur couplé à une protéine Gs, dont la sous-unité alpha active l'enzyme adénylyl cyclase (AC), qui engendre la production d'AMPc (Figure 3). Ce schéma n'est pas si simple. Le mécanisme d'action de l'ACTH sur la stéroïdogénèse des cellules cortico-surréaliennes s'appuie sur des études qui démontrent le rôle du cytosquelette et d'autres seconds messagers tels que le calcium et la protéine kinase C dans la réponse physiologique de la cellule à l'ACTH (Arola, Heikkila *et al.*, 1994, Enyeart, Mlinar *et al.*, 1996, Gallo-Payet and Payet, 2003). Cependant, l'AMPc reste le second messenger le plus important de l'action de l'ACTH, responsable d'une série d'événements dans la cellule cortico-surrénaliennne tels que l'augmentation du nombre de récepteurs des LDLs (low-density lipoprotein), le transport du cholestérol vers les mitochondries, la synthèse *de novo* du cholestérol, la phosphorylation de protéines via la protéine kinase A (PKA), la synthèse d'ADN, transcription en ARNm et synthèse des protéines totales ou spécifiques, l'activation de la cascade des enzymes stéroïdogéniques, la multiplication cellulaire *in vivo* et le métabolisme des phospholipides et des lipoprotéines.

1.3.1 Voie de l'AMPc et stéroïdogénèse

Il est bien établi que l'ACTH exerce deux effets temporellement espacés sur la stéroïdogénèse du cortex surrénalien par l'intermédiaire de l'AMPc (Kramer, Rainey *et al.*, 1984). Le premier effet est à court terme. Le signal hormonal entraîne en quelques minutes une stimulation de la stéroïdogénèse (DiBartolomeis and Jefcoate, 1984). L'administration prolongée d'ACTH se traduit par une stimulation de la biosynthèse des enzymes de la stéroïdogénèse : c'est la réponse chronique (Waterman and Bischof, 1997).

L'activation de la PKA par l'AMPc va conduire à la mobilisation immédiate du cholestérol du compartiment cytoplasmique jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie, où est localisé le cytochrome p450_{scc} (desmolase) qui catalyse la première étape de la stéroïdogénèse ou coupure de la chaîne latérale du cholestérol. Cet effet est médié par la protéine StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) (Jefcoate, DiBartolomeis *et al.*, 1987, Clark, Wells *et al.*, 1994). Le transfert intra-mitochondrial de cholestérol dépendant de StAR est une étape limitante de la synthèse des stéroïdes. Il dépend également d'une deuxième protéine, le PBR (*peripheral-type benzodiazepine receptor*) (Papadopoulos, 1998) (Figure 3).

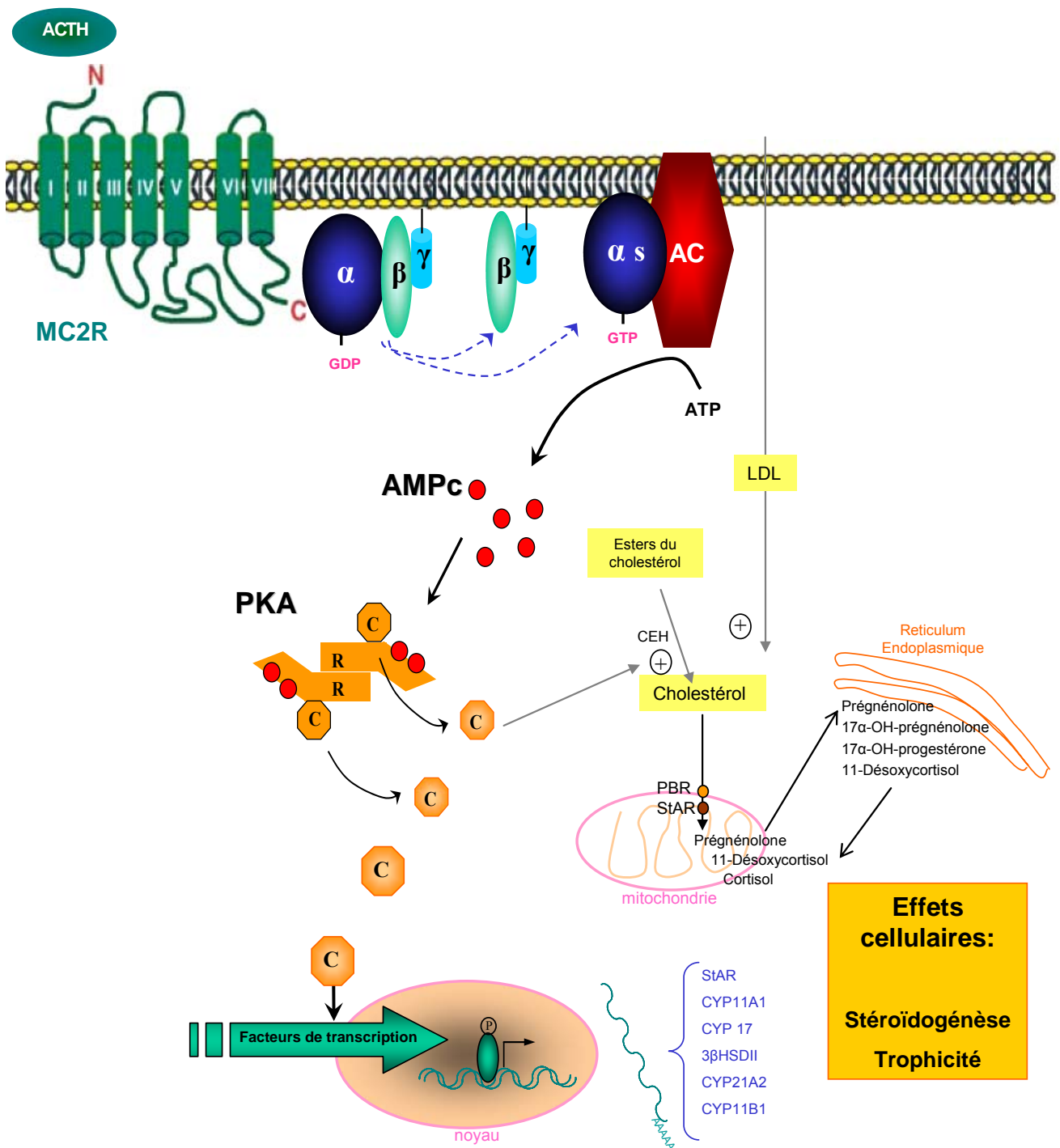


Figure 3. Action de l'ACTH sur la cellule cortico-surrénalienne. Effet à court terme : activation de la stéroïdogenèse par transfert intra-mitochondrial de cholestérol. Effet à long terme : maintien de la stéroïdogenèse par phosphorylation des facteurs de transcription, synthèse d'ADN, transcription en ARNm et synthèse des enzymes stéroïdogènes. α , β et γ représentent la sous-unité α et le complexe $\beta\gamma$ de la protéine G_s . R , sous-unité régulatrice de la PKA. C , sous-unité catalytique de la PKA. CEH , Cholestérol ester hydrolase.

La réponse aiguë des cellules stéroïdogènes stimulées par l'ACTH est détaillée dans la figure 4. Cette réponse médiée par l'AMPC consiste de l'activation de deux voies complémentaires : 1) la synthèse du cholestérol libre suite à la phosphorylation de l'enzyme cholestérol ester hydrolase (CEH) ; 2) la régulation de l'expression de la protéine StAR (Figure 4). La transcription du gène de StAR est activée de façon précoce (1 à 2 heures), comparée à celle des gènes codant pour les enzymes stéroïdogènes (15 à 36 heures) (John, John *et al.*, 1986). Le promoteur du gène StAR ne contient pas d'éléments consensus de réponse à l'AMPC (CRE). La réponse à l'AMPC est conférée par l'interaction de SF-1 (*Steroidogenic Factor 1*), un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires orphelins, avec des éléments de réponse spécifiques. SF-1 contrôle également l'expression tissu-spécifique des gènes codant pour les P-450 stéroïdes hydroxylases (Parker and Schimmer, 1997). Plus récemment, d'autres facteurs de transcription tels que les Sp1, C/EBPs (*CCAAT-Enhancer-binding Proteins*), CREB/CREM (*cAMP-response element [CRE] binding protein/CRE modulator*) et GATA-4 (*GATA binding protein 4*) ont été suggérés comme régulateurs de la transcription du gène StAR (Christenson and Strauss, 2001). L'inhibition de la transcription du gène StAR est conférée par DAX-1 (*dosage-sensitive sex adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1*), un facteur de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires (Zazopoulos, Lalli *et al.*, 1997).

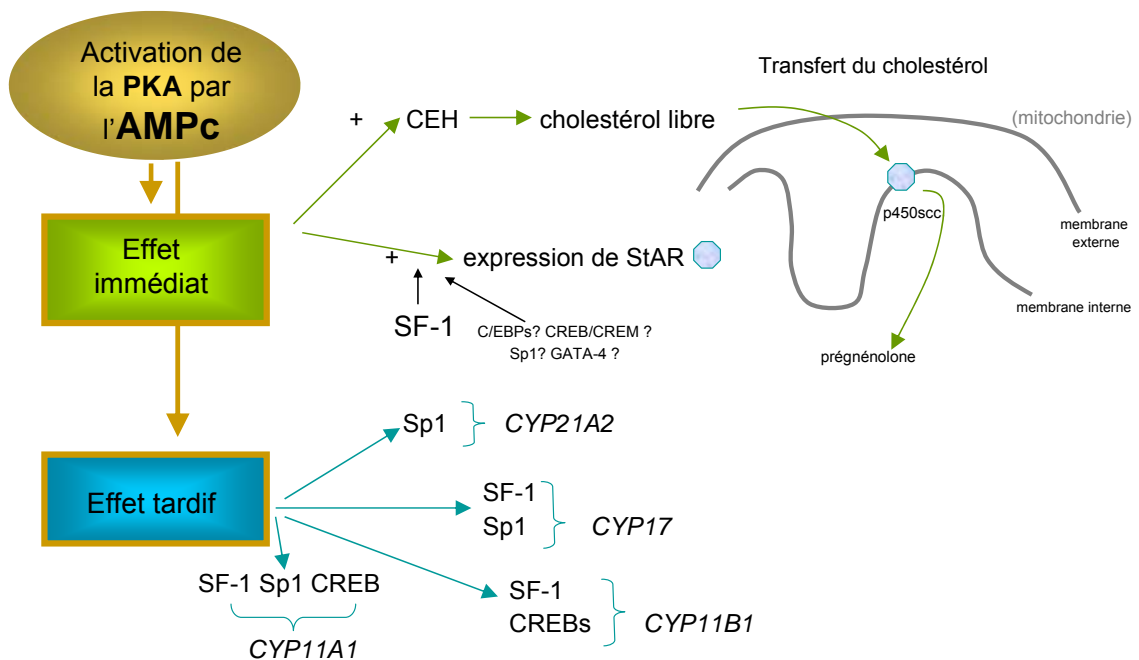


Figure 4. Représentation schématique des réponses de la cellule cortico-surrénalienne à l'élévation de l'AMPC et les facteurs de transcription impliqués.

A long terme, l'activation du complexe AMPc/AC/PKA va aussi permettre aux sous-unités catalytiques de phosphoryler des facteurs de transcriptions spécifiques, tels que SF-1, Sp1, CREB et ATF-1 (*activating transcription factor 1*) capables de réguler la transcription de gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse (effet tardif, Figure 4). La régulation de la transcription des gènes s'effectue principalement par l'intermédiaire des séquences « CRS » (*cAMP-responsive sequence*) spécifiques de chaque gène (Sewer and Waterman, 2003). Le récepteur nucléaire orphelin SF-1 joue un rôle central dans l'expression et la régulation des enzymes de la stéroïdogénèse. L'étude du promoteur des différents gènes de ces enzymes a permis de mettre en évidence le rôle de facteurs de transcription pour chaque enzyme, selon le schéma précédent.

Il existe deux catégories majeures d'enzymes de la stéroïdogénèse: les cytochromes P450 et les déshydrogénases (Tableau 1). Les cytochromes P450 font partie de complexes enzymatiques membranaires nommés stéroïdes hydroxylases. Ils catalysent les réactions d'hydroxylation et de coupure de chaîne latérale des stéroïdes qui confèrent la spécificité du message hormonal.

Tableau 1 - Les enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes surrénaliens.

<i>types</i>	<i>activité enzymatique</i>	<i>gène</i>	<i>localisation</i>
cytochromes P450	20-22 hydroxylase, 20-22 desmolase ou scc (side chain cleavage)	<i>CYP11A1</i>	mitochondrie
	11 β -hydroxylase	<i>CYP11B1</i>	
	aldostérone synthase	<i>CYP11B2</i>	
	17 α -hydroxylase/17-20 lyase	<i>CYP17</i>	
déshydrogénases	21-hydroxylase	<i>CYP21A2</i>	réticulum endoplasmique
	3 β -déshydrogénase type II	<i>HSD3B2</i>	
	17-cétostéroïde réductase	<i>HSD17B3</i>	

Les réactions enzymatiques et les stéroïdes synthétisés sont illustrés dans la figure 5. La 3 β -désydrogénase est très importante dans l'étape initiale de la biosynthèse des trois grandes familles de stéroïdes : les minéralocorticoïdes, les glucocorticoïdes et les androgènes. Les enzymes impliquées dans les étapes finales de la stéroïdogénèse sont : l'aldostérone synthétase, la 11 β -hydroxylase et la 17 α -hydroxylase / 17,20-lyase.

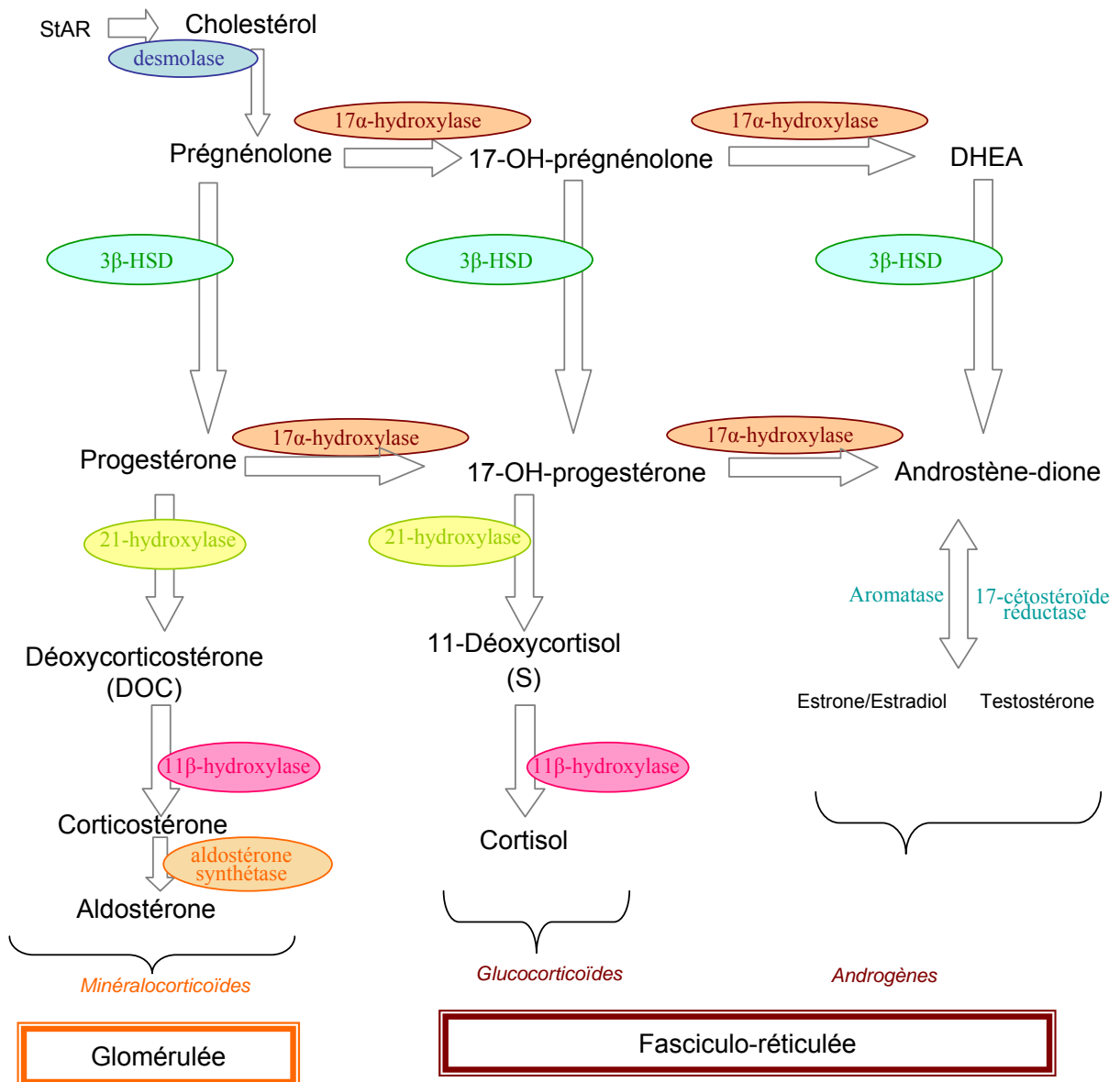


Figure 5. Etapes de la biosynthèse des stéroïdes chez l'homme. La 17 α -hydroxylase et l'aldostérone synthétase ne sont présentes que dans la fasciculo-réticulée et dans la glomérulée, respectivement.

1.3.2 Effet trophique de l'ACTH

L'ACTH constitue un facteur de croissance des adrénocytes et son absence induit leur apoptose. Cellule unique, l'adrénocyte prolifère dans la périphérie du cortex, migre vers l'intérieur et est éliminé par apoptose dans la zone réticulée profonde (Wyllie, Kerr et al., 1973). Pendant ce trajet il présente successivement un phénotype non différencié (cellule souche), le phénotype glomérulé et finalement le phénotype fasciculo-réticulé (Zajicek, Ariel et al., 1986). D'une façon continue, la migration centripète et la différenciation adrénocytaire assurent la morphologie du cortex surrénalien (Belloni, Mazzocchi et al., 1978). D'autre part, le cortex surrénal des rats adultes exhibent une couche additionnelle, la zone indifférenciée. Située entre les zones glomérulée et fasciculée, elle est formée par des cellules souches qui peuvent se différencier et migrer vers le centre ou la périphérie selon son phénotype (Mitani, Mukai *et al.*, 2003).

L'importance de l'ACTH dans ce processus a été initialement démontrée par la suppression de sa sécrétion *in vivo*, obtenue soit par hypophysectomie soit par inhibition de la synthèse suite à l'administration d'hormones corticoïdes, techniques donnant des résultats très proches. L'absence d'ACTH induit la baisse de la prolifération adrénocytaire (hypoplasie) ainsi que l'indique le comptage des mitoses (Nowakowska-Jankiewicz, Lewinski *et al.*, 1988, Malendowicz, Nussdorfer *et al.*, 1992) et le dosage de l'ADN (Stachowiak & al. 1990). L'apoptose augmente fortement, ce qui conduit à l'élimination de la zone réticulée et de la partie profonde de la fasciculée (Wyllie et al., 1973), alors que la fasciculée résiduelle se dédifférencie vers le phénotype glomérulé (baisse du volume cellulaire ou hypotrophie, crêtes mitochondriales lamellaires) (Rao, Long *et al.*, 1978). De plus, l'absence d'ACTH induit à une diminution de l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF associée à la réduction de la vascularisation du cortex (Thomas, Keramidis et al., 2004). L'introduction de l'ACTH restaure la morphologie normale de la surrénale.

Suite à l'administration chronique d'ACTH *in vivo*, les adrénocytes augmentent de volume en parallèle avec une montée des synthèses d'ADN et de protéines. Ce processus hypertrophique apparaît dans les premiers jours et s'y ajoute une hyperémie; il évolue vers l'augmentation du nombre des cellules ou hyperplasie (Pudney, Price *et al.*, 1984). En

administration chronique également, l'ACTH diminue l'incidence de l'apoptose (Wyllie et al., 1973). La stimulation de la croissance et de la prolifération du cortex induite par l'ACTH est réversible.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la prolifération du cortex surrénalien induite par l'ACTH ont été l'objet d'étude pendant des décennies. Cette hormone trophique a un effet paradoxal ; son action est mitogène *in vivo*, mais un effet inhibiteur de la croissance a été observé sur des adrénocytes en culture (Hornsby, 1984). En fait, l'addition d'ACTH a des effets différents *in vitro* selon qu'il est aigu (une seule dose ou un court traitement jusqu'à 2 jours) ou chronique (à partir de 3 jours de traitement), approximativement.

- **Effet aigu.** Les études *in vitro* sur des cellules cortico-surréaliennes fœtales humaines et bovines ou tumorales Y1 de souris démontrent le rôle anti-mitogène de l'ACTH sur 24 heures (Masui and Garren, 1970, Simonian and Gill, 1981). La majorité des travaux confirme que l'administration aiguë inhibe la prolifération des adrénocytes d'origine fasciculo-réticulée ; cet effet est reproduit par l'AMPc (Ramachandran and Suyama, 1975, Hornsby and Gill, 1978, Duperray and Chambaz, 1980, Simonian and Gill, 1981, Abu-Hakima, Branchaud *et al.*, 1987). D'autres hypothèses sont en faveur d'un effet mitogène discret et variable dans les 2 premières heures de traitement. La phosphorylation des MAP (mitogen-activated protein) kinases par l'ACTH et la cumulation rapide de la protéine c-FOS ont été démontrées en étudiant des cellules tumorales Y1 (Lotfi, Todorovic *et al.*, 1997). Une augmentation des ARNm de *c-fos* ainsi que de *jun-B* a été démontré dans la réponse précoce à l'ACTH, un effet comparable à celui du facteur de croissance analogue à l'insuline IGF-1 (Penhoat, Ouali *et al.*, 1996). Cette étude a montré aussi un effet positif de l'angiotensine II sur les ARNm codant pour trois proto-oncogènes : *c-fos*, *jun-B* et *c-jun*.
- **Effet chronique.** L'administration chronique *in vitro*, au contraire, stimule la croissance et la prolifération cellulaire (Armato, Andreis *et al.*, 1977, Menapace, Armato *et al.*, 1987, Di Blasio, Fujii *et al.*, 1990). A partir de 72 heures de traitement, il est vérifié un effet trophique de l'ACTH sur les cellules en cultures (Arola, Heikkila *et al.*, 1993).

L'effet trophique de l'ACTH peut être régulé par un grand nombre de facteurs de croissance locaux (Feige, Vilgrain *et al.*, 1998). L'expression du puissant facteur mitogénique FGF-2 (facteur de croissance fibroblastique 2) est stimulée par l'ACTH dans la surrénale fœtale. D'autres facteurs sont impliqués dans le développement de la surrénale fœtale, comme l'IGF-I et II et le TGF- α . Dans la surrénale adulte, l'ACTH stimule la sécrétion autocrine de l'IGF-I, IGF-II et TGF- β 1. L'IGF-I semble agir en coopération avec le FGF-2 et le facteur de croissance épidermique (EGF) dans la régulation de l'effet mitogénique de l'ACTH. Les protéines de la matrice cellulaire du cortex surrénalien, telles que la laminine et la thrombospondine-2, ont leur synthèse induite par l'ACTH (Feige, Keramidas *et al.*, 1998).

La pro-opiomélanocortine (POMC), précurseur de l'ACTH, peut originer un court peptide N-terminal qui exhibe une activité mitogénique (Bicknell, Lomthaisong *et al.*, 2001, Fassnacht, Hahner *et al.*, 2003). D'autre part, des peptides neurotransmetteurs participent de la régulation de la prolifération cortico-surrénalienne, comme le peptide vaso-intestinal actif (VIP), le neuropeptide Y (NPY), la somatostatine et l'endothéline 1 (ET-1). (Whitworth, Kosti *et al.*, 2003). Les deux principaux neuropeptides qui stimulent la division cellulaire dans le cortex surrénalien sont le VIP et le NPY, un effet médié par les MAP kinases ERK-1 et -2.

1.4 Formation d'un tissu cortico-surrénalien dans un modèle expérimental

1.4.1 Culture primaire des cellules cortico-surrénaliennes bovines

Parmi les cellules cortico-surrénalines des mammifères, le choix de l'espèce bovine pour l'étude *in vitro* présente quelques avantages, tels que la disponibilité des données dans la littérature grâce à son utilisation habituelle, la similarité entre le bovin et l'humain de la fonction cortico-surrénalienne et de l'horloge mitotique (raccourcissement de la longueur des télomères), ainsi que l'accès plus facile aux tissus bovins face à la difficulté d'obtention des surrénales humaines. Les cellules cortico-surrénaliennes bovines (BAC) sont obtenues à partir de glandes corticosurrénales prélevées aux abattoirs, selon un protocole pratiqué depuis 20

ans dans l'unité INSERM 244, dont est issu le laboratoire du Dr Jean-Jacques Feige (Duperray and Chambaz, 1980). Le modèle cellulaire utilisé au laboratoire est représenté par les cellules de la zone fasciculo-réticulée du cortex surrénal bovin dont les produits majeurs de sécrétion sont le cortisol et la corticostérone (Dobson and Kanchev, 1977). D'après ce protocole, il est possible d'obtenir des cultures primaires de cellules BAC contenant moins de 1 % de contaminants cellulaires non stéroïdogènes. Leur origine fasciculo-réticulée est confirmée en utilisant un anticorps anti-17 α -hydroxylase : au moins 90% des cellules nouvellement mises en culture sont immunoréactives (Negoescu, 1995).

Le schéma de la stéroïdogénèse chez l'homme présenté dans la figure 5 s'applique aussi aux bovins. La seule différence concerne les enzymes codées par *CYP11B* (Tableau 1) : seulement la 11 β -hydroxylase est présente chez le bovin. D'autre part, les mêmes différences histologiques entre les cellules des 3 zones du cortex sont observées chez le bœuf, mais les adrénocytes sont plus pauvres en lipides (Fruhling, Penasse *et al.*, 1970, Nussdorfer, 1986).

Par contre, dans les cellules cortico-surréaliennes murines, la 17 α -hydroxylase est absente, ce qui explique la synthèse de corticostérone comme produit final chez la souris.

1.4.2 Transplantation hétérologue de cellules : formation d'un néo tissu

Un intéressant modèle de transplantation hétérologue de cellules cortico-surréaliennes *in vivo* a été développé permettant l'observation phénotypique et physiologique d'un néo-organe (Thomas, Northrup *et al.*, 1997). La manipulation génétique des cellules avant transplantation rend possible la formation d'un nouveau cortex surrénalien qui peut être considéré comme un tissu transgénique.

Dans ce modèle (Figure 6), des cellules cortico-surréaliennes bovines ou humaines issues de cultures primaires *in vitro* sont implantées dans un anneau de polycarbonate placé sous la capsule rénale par microchirurgie, chez des souris immunodéficientes SCID (*Severe Combined Immuno-Deficiency*) surrénalectomisées. Les souris reçoivent un traitement substitutif corticoïde pendant une semaine. Il a été démontré que cette greffe cellulaire donne naissance à un néo-organe cortico-surrénalien, vascularisé, différencié et fonctionnel et que la sécrétion de cortisol par ce néo-organe permet aux animaux d'échapper à la mort par insuffisance surréalienne (Thomas *et al.*, 1997). Dans cette situation, le principal

glucocorticoïde sécrété par les souris, la corticostérone, est remplacé par le cortisol d'origine bovine ou humaine synthétisé par le néo-organe.

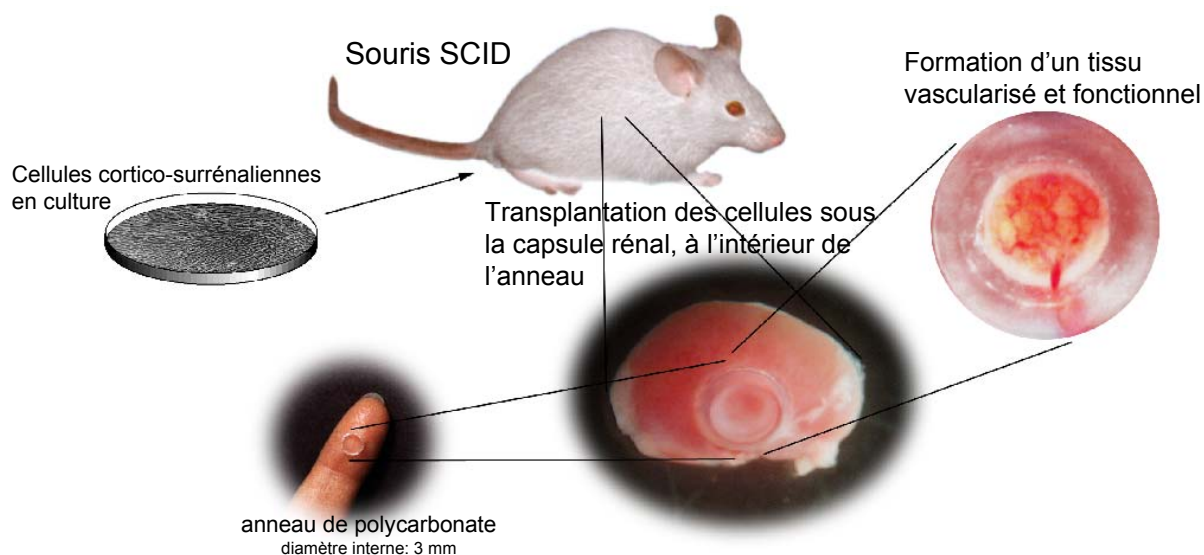


Figure 6. Modèle de transplantation hétérologue des cellules avec formation d'un néo-tissu cortico-surrénalien.

Un des grands intérêts du modèle est l'étude de la tumorigénèse cortico-surrénalienne. Ainsi, Thomas et collaborateurs ont démontré que l'infection des cellules surréaliennes bovines par trois gènes : hTERT (sous-unité catalytique de la télomérase humaine), SV40 TAg (antigène grand T du virus SV40) et H-Ras^{val12} (version oncogénique du proto-oncogène Ras), suivie de leur transplantation chez la souris immunodéficiente, conduit au développement de tumeurs cortico-surréaliennes malignes (Thomas, Suwa *et al.*, 2002). Par contre l'infection des cellules cortico-surréaliennes par seulement deux de ces gènes ne conduit pas à un phénotype malin, quelle que soit la combinaison des deux gènes. Par ailleurs, la transplantation de cellules infectées par un oncogène ou une combinaison de deux oncogènes ne conduit pas à la mort cellulaire (sauf l'association de SV40 Tag et H-Ras^{val12}) et en plus permet la formation d'un tissu non tumoral ainsi que fonctionnel, puisque les souris transplantées survivent à la surrénalectomie.

Références Bibliographiques

- ABU-HAKIMA, M., BRANCHAUD, C. L., GOODYER, C. G., MURPHY, B. E. The effects of human chorionic gonadotropin on growth and steroidogenesis of the human fetal adrenal gland in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, 1987, 156, 681-7.
- ANDO, T., SHIBATA, H., SUZUKI, T., KURIHARA, I., HAYASHI, K., HAYASHI, M., SAITO, I., KAWABE, H., TSUJIOKA, M., SARUTA, T. The possible role of apoptosis-suppressing genes, bcl-2 and mcl-1/EAT in human adrenal tumors. *Endocr Res*, 1998, 24, 955-60.
- ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX, F., COMAS, J.M., TESSIER, M.P. Food-dependent Cushing's syndrome associated with the Carney complex. *Program and abstracts of the 10th International Congress of Endocrinology, San Francisco, CA*, 1996, p 899.
- ARMATO, U., ANDREIS, P. G., DRAGHI, E. Dose-related persistent proliferogenic action of corticotrophin 1-24 in normal adult human adrenocortical cells in primary tissue culture. *J Endocrinol*, 1977, 72, 97-8.
- ARNALDI, G., GASC, J. M., DE KEYZER, Y., RAFFIN-SANSON, M. L., PERRAUDIN, V., KUHN, J. M., RAUX-DEMAY, M. C., LUTON, J. P., CLAUSER, E., BERTAGNA, X. Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 2029-35.
- ARNEY, K. L. H19 and Igf2--enhancing the confusion? *Trends Genet*, 2003, 19, 17-23.
- AROLA, J., HEIKKILA, P., KAHRI, A. I. Biphasic effect of ACTH on growth of rat adrenocortical cells in primary culture. *Cell Tissue Res*, 1993, 271, 169-76.
- AROLA, J., HEIKKILA, P., VOUTILAINEN, R., KAHRI, A. I. Protein kinase C signal transduction pathway in ACTH-induced growth effect of rat adrenocortical cells in primary culture. *J Endocrinol*, 1994, 141, 285-93.
- ASA, S. L., EZZAT, S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev*, 1998, 19, 798-827.
- BARBOSA, A. S., GIACAGLIA, L. R., MARTIN, R. M., MENDONCA, B. B., LIN, C. J. Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord*, 2004, 4, 3.
- BARZILAY, J. I., PAZIANOS, A. G. Adrenocortical carcinoma. *Urol Clin North Am*, 1989, 16, 457-68.
- BEAVO, J. A., BRUNTON, L. L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3, 710-8.
- BELLONI, A. S., MAZZOCCHI, G., MENEGHELLI, V., NUSSDORFER, G. G. Cytogenesis in the rat adrenal cortex: evidence for an ACTH-induced centripetal cell migration from the zona glomerulosa. *Arch Anat Histol Embryol*, 1978, 61, 195-205.
- BERNARD, M. H., SIDHU, S., BERGER, N., PEIX, J. L., MARSH, D. J., ROBINSON, B. G., GASTON, V., LE BOUC, Y., GICQUEL, C. A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 998-1001.
- BERTHERAT, J., BARRANDE, G., LEFEBVRE, H. AL., E. Illegitimate membrane receptors are frequent and often multiple in bilateral ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *The Endocrine Society's 85th Meeting, Philadelphia, PA*, 2003, Abstract P3-410.

- BERTHERAT, J., CONTESSE, V., LOUISET, E., BARRANDE, G., DUPARC, C., GROUSSIN, L., EMY, P., BERTAGNA, X., KUHN, J. M., VAUDRY, H., *et al.* In Vivo and in Vitro Screening for Illegitimate Receptors in ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH) Causing Cushing's Syndrome: Identification of Two Cases of Gonadotropin/Gastric Inhibitory Polypeptide-Dependent Hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, Dec 7; [Epub ahead of print].
- BEUSCHLEIN, F., REINCKE, M., KARL, M., TRAVIS, W. D., JAURSCH-HANCKE, C., ABDELHAMID, S., CHROUSOS, G. P., ALLOLIO, B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res*, 1994, 54, 4927-32.
- BICKNELL, A. B., LOMTHAISONG, K., WOODS, R. J., HUTCHINSON, E. G., BENNETT, H. P., GLADWELL, R. T., LOWRY, P. J. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell*, 2001, 105, 903-12.
- BLICHERT-TOFT, M., VEJLSTED, H., HEHLET, H., ALBRECHTSEN, R. Virilizing adrenocortical adenoma responsive to gonadotrophin. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1975, 78, 77-85.
- BOS, J. L. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4, 733-8.
- BOS, J. L., DE ROOIJ, J., REEDQUIST, K. A. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2, 369-77.
- BOSCARO, M., BARZON, L., FALLO, F., SONINO, N. Cushing's syndrome. *Lancet*, 2001, 357, 783-91.
- BOURDEAU, I., ANTONINI, S. R., LACROIX, A., KIRSCHNER, L. S., MATYAKHINA, L., LORANG, D., LIBUTTI, S. K., STRATAKIS, C. A. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene*, 2004, 23, 1575-85.
- BOURDEAU, I., D'AMOUR, P., HAMET, P., BOUTIN, J. M., LACROIX, A. Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 5534-40.
- BRUSH, J. S., SUTLIFF, L. S., SHARMA, R. K. Metabolic regulation and adenyl cyclase activity of adrenocortical carcinoma cultured cells. *Cancer Res*, 1974, 34, 1495-502.
- BUGALHO, M. J., LI, X., RAO, C. V., SOARES, J., SOBRINHO, L. G. Presence of a Gs alpha mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 2000, 14, 50-4.
- BUSCA, R., ABBE, P., MANTOUX, F., ABERDAM, E., PEYSSONNAUX, C., EYCHENE, A., ORTONNE, J. P., BALLOTTI, R. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *Embo J*, 2000, 19, 2900-10.
- CARON, K. M., SOO, S. C., WETSEL, W. C., STOCCO, D. M., CLARK, B. J., PARKER, K. L. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 11540-5.
- CARTIER, D., LIHRMANN, I., PARMENTIER, F., BASTARD, C., BERTHERAT, J., CARON, P., KUHN, J. M., LACROIX, A., TABARIN, A., YOUNG, J., *et al.* Overexpression of serotonin4 receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 248-54.
- CATARGI, B., RIGALLEAU, V., POUSSIN, A., RONCI-CHAIX, N., BEX, V., VERGNOT, V., GIN, H., ROGER, P., TABARIN, A. Occult Cushing's syndrome in type-2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 5808-13.

- CHABRE, O., LIAKOS, P., VIVIER, J., CHAFFANJON, P., LABAT-MOLEUR, F., MARTINIE, M., BOTTARI, S. P., BACHELOT, I., CHAMBAZ, E. M., DEFAYE, G., *et al.* Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 3134-43.
- CHARMANDARI, E., BROOK, C. G., HINDMARSH, P. C. Classic congenital adrenal hyperplasia and puberty. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151 Suppl 3, U77-82.
- CHIDIAC, R. M., ARON, D. C. Incidentalomas. A disease of modern technology. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1997, 26, 233-53.
- CHRISTENSON, L. K., STRAUSS, J. F., 3RD Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res*, 2001, 32, 576-86.
- CHROUSOS, G. *Adrenal Cancer - Diagnosis and Treatment*. Endotext.org, CD-ROM. 2003.
- CLARK, A. J., BAIG, A. H., NOON, L., SWORDS, F. M., HUNYADY, L., KING, P. J. Expression, desensitization, and internalization of the ACTH receptor (MC2R). *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 994, 111-7.
- CLARK, B. J., WELLS, J., KING, S. R., STOCCO, D. M. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*, 1994, 269, 28314-22.
- CLOSE, C. F., MANN, M. C., WATTS, J. F., TAYLOR, K. G. ACTH-independent Cushing's syndrome in pregnancy with spontaneous resolution after delivery: control of the hypercortisolism with metyrapone. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1993, 39, 375-9.
- COMBES, J., BOURRINET-PELLET, E., NARBONI, G., SAEZ, J. M., REMY-MARTIN, M. A., MANTION, G., CORNETTE, C., DE WAZIÈRES, B., PENFORNIS, A. Un nouveau cas de syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation associé à un adénome surrénalien unique. *Ann Endocrinol (Paris)*, 1998, 59:264, Abstract A171.
- CROUGHS, R. J., ZELISSEN, P. M., VAN VROONHOVEN, T. J., HOFLAND, L. J., N'DIAYE, N., LACROIX, A., DE HERDER, W. W. GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2000, 52, 235-40.
- DAIDOH, H., MORITA, H., HANAFUSA, J., MUNE, T., MURASE, H., SATO, M., SHIBATA, T., SUWA, T., ISHIZUKA, T., YASUDA, K. In vivo and in vitro effects of AVP and V1a receptor antagonist on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1998, 49, 403-9.
- DE FRAIPONT, F., EL ATIFI, M., CHERRADI, N., LE MOIGNE, G., DEFAYE, G., HOULGATTE, R., BERTHERAT, J., BERTAGNA, X., PLOUIN, P. F., BAUDIN, E., *et al.* Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using cDNA microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004.
- DE HERDER, W. W., HOFLAND, L. J., USDIN, T. B., DE JONG, F. H., UITTERLINDEN, P., VAN KOETSVELD, P., MEZEY, E., BONNER, T. I., BONJER, H. J., LAMBERTS, S. W. Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 3168-72.
- DE LANGE, W. E., PRATT, J. J., DOORENBOS, H. A gonadotrophin responsive testosterone producing adrenocortical adenoma and high gonadotrophin levels in an elderly woman. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1980, 12, 21-8.
- DE ROOIJ, J., REHMANN, H., VAN TRIEST, M., COOL, R. H., WITTINGHOFER, A., BOS, J. L. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*, 2000, 275, 20829-36.

- DE ROOIJ, J., ZWARTKRUIS, F. J., VERHEIJEN, M. H., COOL, R. H., NIJMAN, S. M., WITTINGHOFER, A., BOS, J. L. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 1998, 396, 474-7.
- DI BLASIO, A. M., FUJII, D. K., YAMAMOTO, M., MARTIN, M. C., JAFFE, R. B. Maintenance of cell proliferation and steroidogenesis in cultured human fetal adrenal cells chronically exposed to adrenocorticotrophic hormone: rationalization of in vitro and in vivo findings. *Biol Reprod*, 1990, 42, 683-91.
- DIBARTOLOMEIS, M. J., JEFCOATE, C. R. Characterization of the acute stimulation of steroidogenesis in primary bovine adrenal cortical cell cultures. *J Biol Chem*, 1984, 259, 10159-67.
- DIDOLKAR, M. S., BESCHER, R. A., ELIAS, E. G., MOORE, R. H. Natural history of adrenal cortical carcinoma: a clinicopathologic study of 42 patients. *Cancer*, 1981, 47, 2153-61.
- DOBSON, H., KANCHEV, L. N. Effect of adrenal stimulation on bovine plasma steroids. *J Reprod Fertil*, 1977, 50, 357-8.
- DREMIER, S., POHL, V., POTEET-SMITH, C., ROGER, P. P., CORBIN, J., DOSKELAND, S. O., DUMONT, J. E., MAENHAUT, C. Activation of cyclic AMP-dependent kinase is required but may not be sufficient to mimic cyclic AMP-dependent DNA synthesis and thyroglobulin expression in dog thyroid cells. *Mol Cell Biol*, 1997, 17, 6717-26.
- DUPERRAY, A., CHAMBAZ, E. M. Effect of prostaglandin E1 and ACTH on proliferation and steroidogenic activity of bovine adreno-cortical cells in primary culture. *J Steroid Biochem*, 1980, 13, 1359-64.
- DUPREZ, L., PARMA, J., VAN SANDE, J., RODIEN, P., SABINE, C., ABRAMOWICZ, M., DUMONT, J. E., VASSART, G. Pathology of the TSH receptor. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 1999, 12 Suppl 1, 295-302.
- ENSERINK, J. M., CHRISTENSEN, A. E., DE ROOIJ, J., VAN TRIEST, M., SCHWEDE, F., GENIESER, H. G., DOSKELAND, S. O., BLANK, J. L., BOS, J. L. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*, 2002, 4, 901-6.
- ENYEART, J. J., MLINAR, B., ENYEART, J. A. Adrenocorticotrophic hormone and cAMP inhibit noninactivating K⁺ current in adrenocortical cells by an A-kinase-independent mechanism requiring ATP hydrolysis. *J Gen Physiol*, 1996, 108, 251-64.
- ESAPA, C., FOSTER, S., JOHNSON, S., JAMESON, J. L., KENDALL-TAYLOR, P., HARRIS, P. E. G protein and thyrotropin receptor mutations in thyroid neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 493-6.
- ETTINGER, S., FELDMAN, E. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th. Saunders, 2005, p.
- FASSNACHT, M., HAHNER, S., HANSEN, I. A., KREUTZBERGER, T., ZINK, M., ADERMANN, K., JAKOB, F., TROPFMAIR, J., ALLOLIO, B. N-terminal proopiomelanocortin acts as a mitogen in adrenocortical tumor cells and decreases adrenal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 2171-9.
- FEARON, E. R., VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 1990, 61, 759-67.
- FEELDERS, R. A., LAMBERTS, S. W., HOFLAND, L. J., VAN KOETSVELD, P. M., VERHOEF-POST, M., THEMEN, A. P., DE JONG, F. H., BONJER, H. J., CLARK, A. J., VAN DER LELY, A. J., *et al.* Luteinizing hormone (LH)-responsive Cushing's syndrome: the demonstration of LH receptor messenger ribonucleic acid in hyperplastic adrenal cells, which respond to chorionic gonadotropin and serotonin agonists in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 230-7.
- FEIGE, J. J., KERAMIDAS, M., CHAMBAZ, E. M. Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. *Horm Metab Res*, 1998, 30, 421-5.

- FEIGE, J. J., VILGRAIN, I., BRAND, C., BAILLY, S., SOUCHELNITSKIY, S. Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. *J Endocrinol*, 1998, 158, 7-19.
- FINDLAY, J. C., SHEELER, L. R., ENGELAND, W. C., ARON, D. C. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 76, 189-91.
- FRAGOSO, M. C., DOMENICE, S., LATRONICO, A. C., MARTIN, R. M., PEREIRA, M. A., ZERBINI, M. C., LUCON, A. M., MENDONÇA, B. B. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 2147-51.
- FRUHLING, J., PENASSE, W., SAND, G., MRENA, E., CLAUDE, A. [Comparative study by electron microscopy of cytochemical reactions of digitonin with cholesterol and other lipids in adrenal cortex cells]. *Arch Int Physiol Biochim*, 1970, 78, 997-8.
- GALLO-PAYET, N., PAYET, M. D. Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. *Microsc Res Tech*, 2003, 61, 275-87.
- GASTON, V., LE BOUC, Y., SOUPRE, V., BURGLIN, L., DONADIEU, J., ORO, H., AUDRY, G., VAZQUEZ, M. P., GICQUEL, C. Analysis of the methylation status of the KCNQ10T and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2001, 9, 409-18.
- GERL, H., ROHDE, W., BIERING, H., SCHULZ, N., LOCHS, H. [Food-dependent Cushing syndrome of long standing with mild clinical features]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2000, 125, 1565-8.
- GIBBS, J. B., SIGAL, I. S., POE, M., SCOLNICK, E. M. Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81, 5704-8.
- GICQUEL, C., BERTAGNA, X., GASTON, V., COSTE, J., LOUVEL, A., BAUDIN, E., BERTHERAT, J., CHAPUIS, Y., DUCLOS, J. M., SCHLUMBERGER, M., *et al.* Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*, 2001, 61, 6762-7.
- GICQUEL, C., DIB, A., BERTAGNA, X., AMSELEM, S., LE BOUC, Y. Oncogenic mutations of alpha-Gi2 protein are not determinant for human adrenocortical tumorigenesis. *Eur J Endocrinol*, 1995, 133, 166-72.
- GICQUEL, C., LEBLOND-FRANCILLARD, M., BERTAGNA, X., LOUVEL, A., CHAPUIS, Y., LUTON, J. P., GIRARD, F., LE BOUC, Y. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1994, 40, 465-77.
- GICQUEL, C., RAFFIN-SANSON, M. L., GASTON, V., BERTAGNA, X., PLOUIN, P. F., SCHLUMBERGER, M., LOUVEL, A., LUTON, J. P., LE BOUC, Y. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 2559-65.
- GIORDANO, T. J., THOMAS, D. G., KUICK, R., LIZYNESS, M., MISEK, D. E., SMITH, A. L., SANDERS, D., ALJUNDI, R. T., GAUGER, P. G., THOMPSON, N. W., *et al.* Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*, 2003, 162, 521-31.
- GIVENS, J. R., ANDERSEN, R. N., WISER, W. L., COLEMAN, S. A., FISH, S. A. A gonadotropin-responsive adrenocortical adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1974, 38, 126-33.
- GONZALEZ-ROBAYNA, I. J., FALENDER, A. E., OCHSNER, S., FIRESTONE, G. L., RICHARDS, J. S. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 2000, 14, 1283-300.

- GOODARZI, M. O., DAWSON, D. W., LI, X., LEI, Z., SHINTAKU, P., RAO, C. V., VAN HERLE, A. J. Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 73-7.
- GROUSSIN, L., PERLEMOINE, K., CONTESSE, V., LEFEBVRE, H., TABARIN, A., THIEBLOT, P., SCHLIENGER, J. L., LUTON, J. P., BERTAGNA, X., BERTHERAT, J. 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*, 2002, 87, 1980-5.
- HAMET, P., LAROCHELLE, P., FRANKS, D. J., CARTIER, P., BOLTE, E. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med*, 1987, 10, 530-3.
- HARADA, H., BECKNELL, B., WILM, M., MANN, M., HUANG, L. J., TAYLOR, S. S., SCOTT, J. D., KORSMEYER, S. J. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. *Mol Cell*, 1999, 3, 413-22.
- HIRATA, Y., UCHIHASHI, M., SUEOKA, S., MATSUKURA, S., FUJITA, T. Presence of ectopic beta-adrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1981, 53, 953-7.
- HORIBA, N., SUDA, T., AIBA, M., NARUSE, M., NOMURA, K., IMAMURA, M., DEMURA, H. Lysine vasopressin stimulation of cortisol secretion in patients with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80, 2336-41.
- HORNSBY, P. J. Regulation of adrenocortical cell proliferation in culture. *Endocr Res*, 1984, 10, 259-81.
- HORNSBY, P. J., GILL, G. N. Characterization of adult bovine adrenocortical cells throughout their life span in tissue culture. *Endocrinology*, 1978, 102, 926-36.
- HOUGH, A. J., HOLLIFIELD, J. W., PAGE, D. L., HARTMANN, W. H. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol*, 1979, 72, 390-9.
- IDELMAN, S. Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex. *Int Rev Cytol*, 1970, 27, 181-281.
- IDELMAN, S., VERDETTI, J. Chapitre 6: Les glandes surrénales. *Endocrinologie et communications cellulaires* / ed. par E. Sciences. Grenoble: 2000, 584 p.
- IIDA, K., KAJI, H., MATSUMOTO, H., OKIMURA, Y., ABE, H., FUJISAWA, M., KAMIDONO, S., CHIHARA, K. Adrenocorticotrophin-independent macronodular adrenal hyperplasia in a patient with lysine vasopressin responsiveness but insensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1997, 47, 739-45.
- ILVESMAKI, V., KAHRI, A. I., MIETTINEN, P. J., VOUTILAINEN, R. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77, 852-8.
- IMOHL, M., KODITZ, R., STACHON, A., MULLER, K. M., NICOLAS, V., PFEILSCHIFTER, J., KRIEG, M. [Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome - follow-up after unilateral adrenalectomy]. *Med Klin (Munich)*, 2002, 97, 747-53.
- JANSSEN, K. P., EL-MARJOU, F., PINTO, D., SASTRE, X., ROUILLARD, D., FOUQUET, C., SOUSSI, T., LOUVARD, D., ROBINE, S. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, 2002, 123, 492-504.
- JEFCOATE, C. R., DIBARTOLOMEIS, M. J., WILLIAMS, C. A., MCNAMARA, B. C. ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J Steroid Biochem*, 1987, 27, 721-9.

- JOHN, M. E., JOHN, M. C., BOGGARAM, V., SIMPSON, E. R., WATERMAN, M. R. Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83, 4715-9.
- KANAUCHI, H., WADA, N., CLARK, O. H., DUH, Q. Y. Apoptosis regulating genes, bcl-2 and bax, and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in adrenal tumors: possible diagnostic and prognostic importance. *Surgery*, 2002, 132, 1021-6; discussion 1026-7.
- KARAKOUSIS, C. P., RAO, U., MOORE, R. Adrenal adenocarcinomas: histologic grading and survival. *J Surg Oncol*, 1985, 29, 105-11.
- KARASAWA, R., HOTTA, M., AIBA, M., TAKANO, K. Cushing's syndrome due to a large adrenocortical adenoma with histological features simulating ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Pathol Int*, 2004, 54, 273-8.
- KATZ, M. S., KELLY, T. M., DAX, E. M., PINEYRO, M. A., PARTILLA, J. S., GREGERMAN, R. I. Ectopic beta-adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985, 60, 900-9.
- KIRSCHNER, L. S., CARNEY, J. A., PACK, S. D., TAYMANS, S. E., GIATZAKIS, C., CHO, Y. S., CHO-CHUNG, Y. S., STRATAKIS, C. A. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet*, 2000, 26, 89-92.
- KLOOS, R. T., GROSS, M. D., FRANCIS, I. R., KOROBKIN, M., SHAPIRO, B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev*, 1995, 16, 460-84.
- KNUDSON, A. G., JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971, 68, 820-3.
- KOCH, C. A., PACAK, K., CHROUSOS, G. P. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87, 5367-84.
- KORBONITS, M., MORRIS, D. G., NANZER, A., KOLA, B., GROSSMAN, A. B. Role of regulatory factors in pituitary tumour formation. *Front Horm Res*, 2004, 32, 63-95.
- KOSTI, O., KING, P. J., HINSON, J. P. Tumour-derived human adrenocortical cells express beta-adrenergic receptors: steroidogenic effects of beta-adrenergic input. *Endocr Res*, 2002, 28, 363-7.
- KRAMER, R. E., RAINEY, W. E., FUNKENSTEIN, B., DEE, A., SIMPSON, E. R., WATERMAN, M. R. Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *J Biol Chem*, 1984, 259, 707-13.
- LACROIX, A., BALDACCHINO, V., BOURDEAU, I., HAMET, P., TREMBLAY, J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 2004, 15, 375-82.
- LACROIX, A., BOLTE, E., TREMBLAY, J., DUPRE, J., POITRAS, P., FOURNIER, H., GARON, J., GARREL, D., BAYARD, F., TAILLEFER, R., *et al.* Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med*, 1992, 327, 974-80.
- LACROIX, A., HAMET, P., BOUTIN, J. M. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med*, 1999, 341, 1577-81.
- LACROIX, A., N'DIAYE, N., DE HERDER, W. W., NIEMAN, L., EZZAT, S., HERMUS, A., NOORDAM, C., GERL, H., LOCHS, H., PICO, A., HAMET, P., TREMBLAY, J. Adrenal GIP receptor overexpression in food-dependent Cushing's syndrome. *Program and abstracts of the 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, Australia*, 2000, p 99.

- LACROIX, A., NDIAYE, N., TREMBLAY, J., HAMET, P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev*, 2001, 22, 75-110.
- LACROIX, A., TREMBLAY, J., ROUSSEAU, G., BOUVIER, M., HAMET, P. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med*, 1997a, 337, 1429-34.
- LACROIX, A., TREMBLAY, J., TOUYZ, R. M., DENG, L. Y., LARIVIERE, R., CUSSON, J. R., SCHIFFRIN, E. L., HAMET, P. Abnormal adrenal and vascular responses to vasopressin mediated by a V1-vasopressin receptor in a patient with adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome, and orthostatic hypotension. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997b, 82, 2414-22.
- LANDIS, C. A., MASTERS, S. B., SPADA, A., PACE, A. M., BOURNE, H. R., VALLAR, L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*, 1989, 340, 692-6.
- LARSON, B. A., VANDERLAAN, W. P., JUDD, H. L., MCCULLOUGH, D. L. A testosterone-producing adrenal cortical adenoma in an elderly woman. *J Clin Endocrinol Metab*, 1976, 42, 882-7.
- LATRONICO, A. C. Role of ACTH receptor in adrenocortical tumor formation. *Braz J Med Biol Res*, 2000, 33, 1249-52.
- LATRONICO, A. C., CHROUSOS, G. P. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 1317-24.
- LATRONICO, A. C., MENDONCA, B. B., BIANCO, A. C., VILLARES, S. M., LUCON, M. A., NICOLAU, W., WAJCHENBERG, B. L. Calcium-dependent protein kinase-C activity in human adrenocortical neoplasms, hyperplastic adrenals, and normal adrenocortical tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 79, 736-9.
- LATRONICO, A. C., PINTO, E. M., DOMENICE, S., FRAGOSO, M. C., MARTIN, R. M., ZERBINI, M. C., LUCON, A. M., MENDONCA, B. B. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86, 4970-3.
- LATRONICO, A. C., REINCKE, M., MENDONCA, B. B., ARAI, K., MORA, P., ALLOLIO, B., WAJCHENBERG, B. L., CHROUSOS, G. P., TSIGOS, C. No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80, 875-7.
- LAURENT, V., KIMBLE, A., PENG, B., ZHU, P., PINTAR, J. E., STEINER, D. F., LINDBERG, I. Mortality in 7B2 null mice can be rescued by adrenalectomy: involvement of dopamine in ACTH hypersecretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99, 3087-92.
- LEBRETHON, M. C., AVALLET, O., REZNIK, Y., ARCHAMBEAUD, F., COMBES, J., USDIN, T. B., NARBONI, G., MAHOUDEAU, J., SAEZ, J. M. Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 4514-9.
- LECLERE, J., BENE, M. C., AUBERT, V., KLEIN, M., PASCAL-VIGNERON, V., WERYHA, G., FAURE, G. Clinical consequences of activating germline mutations of TSH receptor, the concept of toxic hyperplasia. *Horm Res*, 1997, 47, 158-62.
- LEFEBVRE, H., CONTESSE, V., DELARUE, C., FEUILLOLEY, M., HERY, F., GRISE, P., RAYNAUD, G., VERHOFSTAD, A. A., WOLF, L. M., VAUDRY, H. Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin4 receptor subtype. *Neuroscience*, 1992, 47, 999-1007.

- LEFEBVRE, H., CONTESSE, V., DELARUE, C., VAUDRY, H., KUHN, J. M. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res*, 1998, 30, 398-403.
- LEFEBVRE, H., DUPARC, C., CHARTREL, N., JEGOU, S., PELLERIN, A., LAQUERRIERE, A., IVELL, R., VAUDRY, H., KUHN, J. M. Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 3035-42.
- LEFKOWITZ, R. J., ROTH, J., PASTAN, I. ACTH-receptor interaction in the adrenal: a model for the initial step in the action of hormones that stimulate adenyl cyclase. *Ann N Y Acad Sci*, 1971, 185, 195-209.
- LEIBOWITZ, G., TSUR, A., CHAYEN, S. D., SALAMEH, M., RAZ, I., CERASI, E., GROSS, D. J. Pre-clinical Cushing's syndrome: an unexpected frequent cause of poor glycaemic control in obese diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1996, 44, 717-22.
- LEINONEN, P., RANTA, T., SIEGBERG, R., PELKONEN, R., HEIKKILA, P., KAHRI, A. Testosterone-secreting virilizing adrenal adenoma with human chorionic gonadotrophin receptors and 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1991, 34, 31-5.
- LENGAUER, C., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 1998, 396, 643-9.
- LEWINSKY, B. S., GRIGOR, K. M., SYMINGTON, T., NEVILLE, A. M. The clinical and pathologic features of "non-hormonal" adrenocortical tumors. Report of twenty new cases and review of the literature. *Cancer*, 1974, 33, 778-90.
- LI, F. P., FRAUMENI, J. F., JR. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*, 1969, 71, 747-52.
- LIEBERMAN, S. A., ECCLESHALL, T. R., FELDMAN, D. ACTH-independent massive bilateral adrenal disease (AIMBAD): a subtype of Cushing's syndrome with major diagnostic and therapeutic implications. *Eur J Endocrinol*, 1994, 131, 67-73.
- LIGHT, K., JENKINS, P. J., WEBER, A., PERRETT, C., GROSSMAN, A., PISTORELLO, M., ASA, S. L., CLAYTON, R. N., CLARK, A. J. Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia? *Life Sci*, 1995, 56, 1523-7.
- LIN, S. R., TSAI, J. H., YANG, Y. C., LEE, S. C. Mutations of K-ras oncogene in human adrenal tumours in Taiwan. *Br J Cancer*, 1998, 77, 1060-5.
- LIU, J., HEIKKILA, P., KAHRI, A. I., VOUTILAINEN, R. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein mRNA in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Endocrinol*, 1996, 150, 43-50.
- LOTFI, C. F., TODOROVIC, Z., ARMELIN, H. A., SCHIMMER, B. P. Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotropin hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells. *J Biol Chem*, 1997, 272, 29886-91.
- LU, M., WHEELER, M. B., LENG, X. H., BOYD, A. E., 3RD The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide I(7-37). *Endocrinology*, 1993, 132, 94-100.
- LUMBROSO, S., PARIS, F., SULTAN, C. McCune-Albright syndrome: molecular genetics. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 15 Suppl 3, 875-82.
- LUTON, J. P., BERTHERAT, J., KUHN, J. M., BERTAGNA, X. [Aberrant expression of the GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) receptor in an adrenal cortical adenoma responsible for a case of food-dependent Cushing's syndrome]. *Bull Acad Natl Med*, 1998, 182, 1839-49; discussion 1849-50.

- LUTON, J. P., CERDAS, S., BILLAUD, L., THOMAS, G., GUILHAUME, B., BERTAGNA, X., LAUDAT, M. H., LOUVEL, A., CHAPUIS, Y., BLONDEAU, P., *et al.* Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med*, 1990, 322, 1195-201.
- LYONS, J., LANDIS, C. A., HARSH, G., VALLAR, L., GRUNEWALD, K., FEICHTINGER, H., DUH, Q. Y., CLARK, O. H., KAWASAKI, E., BOURNE, H. R., *et al.* Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*, 1990, 249, 655-9.
- MAHER, E. R., REIK, W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest*, 2000, 105, 247-52.
- MALENDOWICZ, L. K., NUSSDORFER, G. G., MARKOWSKA, A., NOWAK, K. W. Analysis of the preventive action of ACTH on dexamethasone-induced adrenocortical atrophy in the rat. *Cytobios*, 1992, 71, 191-9.
- MALKIN, D., LI, F. P., STRONG, L. C., FRAUMENI, J. F., JR., NELSON, C. E., KIM, D. H., KASSEL, J., GRYKA, M. A., BISCHOFF, F. Z., TAINSKY, M. A., *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 1990, 250, 1233-8.
- MANNELLI, M., FERRUZZI, P., LUCIANI, P., CRESCIOLI, C., BUCI, L., CORONA, G., SERIO, M., PERI, A. Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 4616-22.
- MANSMANN, G., LAU, J., BALK, E., ROTHBERG, M., MIYACHI, Y., BORNSTEIN, S. R. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev*, 2004, 25, 309-40.
- MANTERO, F., TERZOLO, M., ARNALDI, G., OSELLA, G., MASINI, A. M., ALI, A., GIOVAGNETTI, M., OPOCHER, G., ANGELI, A. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85, 637-44.
- MASUI, H., GARREN, L. D. On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone. Stimulation of deoxyribonucleic acid polymerase and thymidine kinase activities in adrenal glands. *J Biol Chem*, 1970, 245, 2627-32.
- MATSUKURA, S., KAKITA, T., SUEOKA, S., YOSHIMI, H., HIRATA, Y., YOKOTA, M., FUJITA, T. Multiple hormone receptors in the adenylate cyclase of human adrenocortical tumors. *Cancer Res*, 1980, 40, 3768-71.
- MAZZUCO, T.L., MARTINIE, M., FAVRE, S., BACHELOT, I., CHABRE, O. ACTH-independent Cushing's Syndrome treated solely with propranolol therapy. *The Endocrine Society's 84th Meeting*, San Francisco, CA, 2002, Abstract P25-22.
- MENAPACE, L., ARMATO, U., WHITFIELD, J. F. The effects of corticotrophin (ACTH1-24), cyclic AMP and TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) on DNA replication and proliferation of primary rabbit adrenocortical cells in a synthetic medium. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, 148, 1295-303.
- MILLINGTON, D. S., GOLDER, M. P., COWLEY, T., LONDON, D., ROBERTS, H., BUTT, W. R., GRIFFITHS, K. In vitro synthesis of steroids by a feminising adrenocortical carcinoma: effect of prolactin and other protein hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1976, 82, 561-71.
- MINAMI, S., SUGIHARA, H., SATO, J., TATSUKUCHI, A., SUGISAKI, Y., SASANO, H., WAKABAYASHI, I. ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1996, 44, 483-8.
- MIRCESCU, H., JILWAN, J., N'DIAYE, N., BOURDEAU, I., TREMBLAY, J., HAMET, P., LACROIX, A. Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85, 3531-6.

- MITANI, F., MUKAI, K., MIYAMOTO, H., SUEMATSU, M., ISHIMURA, Y. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1619, 317-24.
- MIYAMURA, N., TSUTSUMI, A., SENOKUCHI, H., NAKAMARU, K., KAWASHIMA, J., SAKAI, K., TAGUCHI, T., TOKUNAGA, H., NISHIDA, K., UEHARA, M., *et al.* A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: simultaneous expression of several aberrant hormone receptors in the adrenal gland. *Endocr J*, 2003, 50, 333-40.
- MOUL, J. W., BISHOFF, J. T., THEUNE, S. M., CHANG, E. H. Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas. *J Urol*, 1993, 149, 1389-94.
- MULLER, M., MAZZUCO, T.L., MARTINIE, M., PARISSI, M., CHABRE, O. Diagnosis of Cushing's syndrome: who suspects it first and how? *6th European Congress of Endocrinology*, Lyon, 2003, Abstract Book P-1124.
- MUNE, T., MURASE, H., YAMAKITA, N., FUKUDA, T., MURAYAMA, M., MIURA, A., SUWA, T., HANAFUSA, J., DAIDO, H., MORITA, H., *et al.* Eutopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87, 5706-13.
- MURRELL, A., HEESON, S., REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet*, 2004, 36, 889-93.
- N'DIAYE, N., HAMET, P., TREMBLAY, J., BOUTIN, J. M., GABOURY, L., LACROIX, A. Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84, 2616-22.
- N'DIAYE, N., TREMBLAY, J., HAMET, P., DE HERDER, W. W., LACROIX, A. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 2781-5.
- NAKAMURA, Y., SON, Y., KOHNO, Y., SHIMONO, D., KUWAMURA, N., KOSHIYAMA, H., SASANO, H., MATSUDA, T. Case of adrenocorticotropin hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II. *Endocrine*, 2001, 15, 57-61.
- NEGOESCU, A. N. (1995) Apoptose et evolution phenotypique des cellules corticosurréaliennes en culture primaire. Grenoble.
- NEVILLE, A. M., O'HARE, M. J. Histopathology of the human adrenal cortex. *Clin Endocrinol Metab*, 1985, 14, 791-820.
- NEWELL-PRICE, J., TRAINER, P., BESSER, M., GROSSMAN, A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev*, 1998, 19, 647-72.
- NOORDAM, C., HERMUS, A. R., PESMAN, G., N'DIAYE, N., SWEEP, C. G., LACROIX, A., OTTEN, B. J. An adolescent with food-dependent Cushing's syndrome secondary to ectopic expression of GIP receptor in unilateral adrenal adenoma. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2002, 15, 853-60.
- NOWAKOWSKA-JANKIEWICZ, B., LEWINSKI, A., SEWERYNEK, E., ZIELENIEWSKI, J. The effect of hypophysectomy on the mitotic activity of the regenerating adrenal cortex in rats. *Cytobios*, 1988, 56, 145-8.
- NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 1976, 194, 23-8.
- NUSSDORFER, G. G. Cytophysiology of the adrenal cortex. *Int Rev Cytol*, 1986, 98, 1-405.
- O'CARROLL, A. M. Localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptor subtypes (sstr1-5) in the rat adrenal gland. *J Histochem Cytochem*, 2003, 51, 55-60.

- O'SULLIVAN, C., BARTON, C. M., STADDON, S. L., BROWN, C. L., LEMOINE, N. R. Activating point mutations of the gsp oncogene in human thyroid adenomas. *Mol Carcinog*, 1991, 4, 345-9.
- PABON, J. E., LI, X., LEI, Z. M., SANFILIPPO, J. S., YUSSMAN, M. A., RAO, C. V. Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 2397-400.
- PAPADOPOULOS, V. Structure and function of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenic cells. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998, 217, 130-42.
- PARKER, K. L., SCHIMMER, B. P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*, 1997, 18, 361-77.
- PARMA, J., DUPREZ, L., VAN SANDE, J., COCHAUX, P., GERVY, C., MOCKEL, J., DUMONT, J., VASSART, G. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature*, 1993, 365, 649-51.
- PENHOAT, A., OUALI, R., VIARD, I., LANGLOIS, D., SAEZ, J. M. Regulation of primary response and specific genes in adrenal cells by peptide hormones and growth factors. *Steroids*, 1996, 61, 176-83.
- PERCHELLET, J. P., SHARMA, R. K. Ectopic alpha-adrenergic mediated accumulation of guanosine 3',5'-monophosphate in isolated adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology*, 1980, 106, 1589-93.
- PEREIRA, M. A., ARAUJO, R. S., BISI, H. Síndrome de Cushing associada à hiperplasia macronodular das adrenais: apresentação de um caso e revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 2001, 45, 619-627.
- PERRAUDIN, V., DELARUE, C., DE KEYZER, Y., BERTAGNA, X., KUHN, J. M., CONTESSE, V., CLAUSER, E., VAUDRY, H. Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80, 2661-7.
- PIGNATELLI, D., RODRIGUES, E., BARBOSA, A. P., MEDINA, J. L. Cushing Syndrome Due to the Ectopic Expression of Adrenergic Receptors in the Adrenal Cortex. A Case of ACTH Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH). *The Endocrine Society's 86th Meeting*, New Orleans, LA, 2004, 611.
- PITTAWAY, D. E., ANDERSEN, R. N., GIVENS, J. R. In vitro on an HCG responsive, testosterone secreting adrenal cortical adenoma. *Steroids*, 1973, 22, 731-45.
- PRALONG, F. P., GOMEZ, F., GUILLOU, L., MOSIMANN, F., FRANSCCELLA, S., GAILLARD, R. C. Food-dependent Cushing's syndrome: possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84, 3817-22.
- PUDNEY, J., PRICE, G. M., WHITEHOUSE, B. J., VINSON, G. P. Effects of chronic ACTH stimulation on the morphology of the rat adrenal cortex. *Anat Rec*, 1984, 210, 603-15.
- RAMACHANDRAN, J., SUYAMA, A. T. Inhibition of replication of normal adrenocortical cells in culture by adrenocorticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72, 113-7.
- RAMSTAD, C., SUNDVOLD, V., JOHANSEN, H. K., LEA, T. cAMP-dependent protein kinase (PKA) inhibits T cell activation by phosphorylating ser-43 of raf-1 in the MAPK/ERK pathway. *Cell Signal*, 2000, 12, 557-63.
- RANGARAJAN, S., ENSERINK, J. M., KUIPERIJ, H. B., DE ROOIJ, J., PRICE, L. S., SCHWEDE, F., BOS, J. L. Cyclic AMP induces integrin-mediated cell adhesion through Epac and Rap1 upon stimulation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Cell Biol*, 2003, 160, 487-93.
- RAO, A. J., LONG, J. A., RAMACHANDRAN, J. Effects of antiserum to adrenocorticotropin on adrenal growth and function. *Endocrinology*, 1978, 102, 371-8.

- REINCKE, M., KARL, M., TRAVIS, W., CHROUSOS, G. P. No evidence for oncogenic mutations in guanine nucleotide-binding proteins of human adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77, 1419-22.
- REINCKE, M., MORA, P., BEUSCHLEIN, F., ARLT, W., CHROUSOS, G. P., ALLOLIO, B. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 3054-8.
- REINCKE, M., WACHENFELD, C., MORA, P., THUMSER, A., JAURSCH-HANCKE, C., ABDELHAMID, S., CHROUSOS, G. P., ALLOLIO, B. p53 mutations in adrenal tumors: Caucasian patients do not show the exon 4 "hot spot" found in Taiwan. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 3636-8.
- REZNIK, Y., ALLALI-ZERAH, V., CHAYVIALLE, J. A., LEROYER, R., LEYMARIE, P., TRAVERT, G., LEBRETHON, M. C., BUDI, I., BALLIERE, A. M., MAHOUDEAU, J. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med*, 1992, 327, 981-6.
- REZNIK, Y., LEFEBVRE, H., ROHMER, V., CHARBONNEL, B., TABARIN, A., RODIEN, P., LECOMTE, P., BARDET, S., COFFIN, C., MAHOUDEAU, J. Aberrant adrenal sensitivity to multiple ligands in unilateral incidentaloma with subclinical autonomous cortisol hypersecretion: a prospective clinical study. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004, 61, 311-9.
- RICHARDS, J. S. New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol Endocrinol*, 2001, 15, 209-18.
- RIGAMONTI, A. E., BONOMO, S. M., CELLA, S. G., MULLER, E. E. GH and cortisol rebound rise during and following a somatostatin infusion: studies in dogs with the use of a GH-releasing peptide. *J Endocrinol*, 2002, 174, 387-94.
- RODIEN, P., CETANI, F., COSTAGLIOLA, S., TONACCHERA, M., DUPREZ, L., MINEGISHI, T., GOVAERTS, C., VASSART, G. Evidences for an allelic variant of the human LC/CG receptor rather than a gene duplication: functional comparison of wild-type and variant receptors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83, 4431-4.
- ROSENBERG, D., GROUSSIN, L., JULLIAN, E., PERLEMOINE, K., MEDJANE, S., LOUVEL, A., BERTAGNA, X., BERTHERAT, J. Transcription factor 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88, 3958-65.
- ROSS, N. S., ARON, D. C. Hormonal evaluation of the patient with an incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med*, 1990, 323, 1401-5.
- SANDRINI, R., RIBEIRO, R. C., DELACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 2027-31.
- SCHORR, I., NEY, R. L. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. *J Clin Invest*, 1971, 50, 1295-300.
- SCHORR, I., RATHNAM, P., SAXENA, B. B., NEY, R. L. Multiple specific hormone receptors in the adenylate cyclase of an adrenocortical carcinoma. *J Biol Chem*, 1971, 246, 5806-11.
- SERON-FERRE, M., LAWRENCE, C. C., JAFFE, R. B. Role of hCG in regulation of the fetal zone of the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 1978, 46, 834-7.
- SEWER, M. B., WATERMAN, M. R. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech*, 2003, 61, 300-7.

- SHANKER, G., SHARMA, R. K. Characterization of ectopic alpha-adrenergic binding receptors of adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology*, 1980, 106, 1594-8.
- SHENKER, A., LAUE, L., KOSUGI, S., MERENDINO, J. J., JR., MINEGISHI, T., CUTLER, G. B., JR. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature*, 1993, 365, 652-4.
- SHIELDS, J. M., PRUITT, K., MCFALL, A., SHAUB, A., DER, C. J. Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol*, 2000, 10, 147-54.
- SIDHU, S., GICQUEL, C., BAMBACH, C. P., CAMPBELL, P., MAGAREY, C., ROBINSON, B. G., DELBRIDGE, L. W. Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumorigenesis. *ANZ J Surg*, 2003, 73, 727-38.
- SIMONIAN, M. H., GILL, G. N. Regulation of the fetal human adrenal cortex: effects of adrenocorticotropin on growth and function of monolayer cultures of fetal and definitive zone cells. *Endocrinology*, 1981, 108, 1769-79.
- SKOGSEID, B., LARSSON, C., LINDGREN, P. G., KVANTA, E., RASTAD, J., THEODORSSON, E., WIDE, L., WILANDER, E., OBERG, K. Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992, 75, 76-81.
- STENZEL-POORE, M. P., CAMERON, V. A., VAUGHAN, J., SAWCHENKO, P. E., VALE, W. Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology*, 1992, 130, 3378-86.
- STEWART, P. M. Chapter 14: The Adrenal Cortex. *Williams Textbook of Endocrinology* / ed. par P. R. Larsen *et al.* 10th ed. Philadelphia: 2003, 1927 p.
- STRATAKIS, C. A. Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14, 404-10.
- STUDER, H., DERWAHL, M. Mechanisms of nonneoplastic endocrine hyperplasia--a changing concept: a review focused on the thyroid gland. *Endocr Rev*, 1995, 16, 411-26.
- SUAREZ, H. G., DU VILLARD, J. A., CAILLOU, B., SCHLUMBERGER, M., PARMENTIER, C., MONIER, R. gsp mutations in human thyroid tumours. *Oncogene*, 1991, 6, 677-9.
- SWAIN, J. M., GRANT, C. S., SCHLINKERT, R. T., THOMPSON, G. B., VANHEERDEN, J. A., LLOYD, R. V., YOUNG, W. F. Corticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: a clinicopathologic correlation. *Arch Surg*, 1998, 133, 541-5; discussion 545-6.
- SWORDS, F. M., BAIG, A., MALCHOFF, D. M., MALCHOFF, C. D., THORNER, M. O., KING, P. J., HUNYADY, L., CLARK, A. J. Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Mol Endocrinol*, 2002, 16, 2746-53.
- TAKAHASHI, H., YOSHIZAKI, K., KATO, H., MASUDA, T., MATSUKA, G., MIMURA, T., INUI, Y., TAKEUCHI, S., ADACHI, H., MATSUMOTO, K. A gonadotrophin-responsive virilizing adrenal tumour identified as a mixed ganglioneuroma and adreno-cortical adenoma. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1978, 89, 701-9.
- TANG, C. K., GRAY, G. F. Adrenocortical neoplasms. Prognosis and morphology. *Urology*, 1975, 5, 691-5.
- TATSUNO, I., UCHIDA, D., TANAKA, T., KOIDE, H., SHIGETA, A., ICHIKAWA, T., SASANO, H., SAITO, Y. Vasopressin responsiveness of subclinical Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2004, 60, 192-200.

- TAUNTON, O. D., ROTH, J., PASTAN, I. Studies on the adrenocorticotrophic hormone-activated adenylyl cyclase of a functional adrenal tumor. *J Biol Chem*, 1969, 244, 247-53.
- TEN BOKUM, A. M., ROSMALEN, J. G., HOFLAND, L. J., KRENNING, E. P., VAN HAGEN, P. M., BREEMAN, W. A. Tissue distribution of octreotide binding receptors in normal mice and strains prone to autoimmunity. *Nucl Med Commun*, 2002, 23, 1009-17.
- THIBONNIER, M., COLES, P., THIBONNIER, A., SHOHAM, M. Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Prog Brain Res*, 2002, 139, 179-96.
- THOMAS, M., KERAMIDAS, M., MONCHAUX, E., FEIGE, J. J. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology*, 2004, 145, 4320-9.
- THOMAS, M., NORTHRUP, S. R., HORNSBY, P. J. Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med*, 1997, 3, 978-83.
- THOMAS, M., SUWA, T., YANG, L., ZHAO, L., HAWKS, C. L., HORNSBY, P. J. Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells. *Neoplasia*, 2002, 4, 493-500.
- TORDJMAN, K., STERN, N., OUAKNINE, G., YOSSIPHOV, Y., RAZON, N., NORDENSKJOLD, M., FRIEDMAN, E. Activating mutations of the Gs alpha-gene in nonfunctioning pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993, 77, 765-9.
- TRONCHE, F., KELLENDONK, C., KRETZ, O., GASS, P., ANLAG, K., ORBAN, P. C., BOCK, R., KLEIN, R., SCHUTZ, G. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet*, 1999, 23, 99-103.
- TRUMPER, A., TRUMPER, K., TRUSHEIM, H., ARNOLD, R., GOKE, B., HORSCH, D. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol*, 2001, 15, 1559-70.
- TSAGARAKIS, S., TSIGOS, C., VASSILIOU, V., TSIOTRA, P., PRATSINIS, H., KLETSAS, D., TRIVIZAS, P., NIKOU, A., MAVROMATIS, T., SOTSIOU, F., et al. 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*, 2001, 86, 583-9.
- TURLEY, E. A. The control of adrenocortical cytodifferentiation by extracellular matrix. *Differentiation*, 1980, 17, 93-103.
- USDIN, T. B., MEZEY, E., BUTTON, D. C., BROWNSTEIN, M. J., BONNER, T. I. 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, 2861-70.
- VAN SLOOTEN, H., SCHABERG, A., SMEENK, D., MOOLENAAR, A. J. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer*, 1985, 55, 766-73.
- VARLEY, J. M., MCGOWN, G., THORNCROFT, M., JAMES, L. A., MARGISON, G. P., FORSTER, G., EVANS, D. G., HARRIS, M., KELSEY, A. M., BIRCH, J. M. Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet*, 1999, 65, 995-1006.
- WACHENFELD, C., BEUSCHLEIN, F., ZWERMANN, O., MORA, P., FASSNACHT, M., ALLOLIO, B., REINCKE, M. Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful? *Eur J Endocrinol*, 2001, 145, 335-41.
- WAJCHENBERG, B. L., ALBERGARIA PEREIRA, M. A., MEDONCA, B. B., LATRONICO, A. C., CAMPOS CARNEIRO, P., ALVES, V. A., ZERBINI, M. C., LIBERMAN, B., CARLOS GOMES,

- G.,KIRSCHNER, M. A. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*, 2000, 88, 711-36.
- WALLACE, C., TOTH, E. L., LEWANCZUK, R. Z.,SIMINOSKI, K. Pregnancy-induced Cushing's syndrome in multiple pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81, 15-21.
- WATERMAN, M. R.,BISCHOF, L. J. Cytochromes P450 12: diversity of ACTH (cAMP)-dependent transcription of bovine steroid hydroxylase genes. *Faseb J*, 1997, 11, 419-27.
- WEINSTEIN, L. S., SHENKER, A., GEJMAN, P. V., MERINO, M. J., FRIEDMAN, E.,SPIEGEL, A. M. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med*, 1991, 325, 1688-95.
- WEISS, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*, 1984, 8, 163-9.
- WEISS, L. M., MEDEIROS, L. J.,VICKERY, A. L., JR. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1989, 13, 202-6.
- WERK, E. E., JR., SHOLITON, L. E.,KALEJS, L. Testosterone-secreting adrenal adenoma under gonadotropin control. *N Engl J Med*, 1973, 289, 767-70.
- WHEELER, M. B., GELLING, R. W., MCINTOSH, C. H., GEORGIU, J., BROWN, J. C.,PEDERSON, R. A. Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology*, 1995, 136, 4629-39.
- WHITWORTH, E. J., KOSTI, O., RENSCHAW, D.,HINSON, J. P. Adrenal neuropeptides: regulation and interaction with ACTH and other adrenal regulators. *Microsc Res Tech*, 2003, 61, 259-67.
- WIDEMAN, R. D.,KIEFFER, T. J. Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide as a Regulator of Beta Cell Function and Fate. *Horm Metab Res*, 2004, 36, 782-6.
- WIELAND, R. G., SHAFFER, M. B., JR.,GLOVE, R. P. Cushing's syndrome complicating pregnancy. A case report. *Obstet Gynecol*, 1971, 38, 841-3.
- WILLENBERG, H. S., STRATAKIS, C. A., MARX, C., EHRHART-BORNSTEIN, M., CHROUSOS, G. P.,BORNSTEIN, S. R. Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *N Engl J Med*, 1998, 339, 27-31.
- WILLIAMS, E.D., SIEBENMANN, R.E.SOBIN, L.H. *Histological typing of endocrine tumours*. Geneva: World Health Organization, 1980, 69 p.
- WILLIAMS, L. T., GORE, T. B.,LEFKOWITZ, R. J. Ectopic beta-adrenergic receptor binding sites. possible molecular basis of aberrant catecholamine responsiveness of an adrenocortical tumor adenylate cyclase. *J Clin Invest*, 1977, 59, 319-24.
- WILLIAMSON, E. A., DANIELS, M., FOSTER, S., KELLY, W. F., KENDALL-TAYLOR, P.,HARRIS, P. E. Gs alpha and Gi2 alpha mutations in clinically non-functioning pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1994, 41, 815-20.
- WILLIAMSON, E. A., INCE, P. G., HARRISON, D., KENDALL-TAYLOR, P.,HARRIS, P. E. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *Eur J Clin Invest*, 1995, 25, 128-31.
- WILLIAMSON, E. A., JOHNSON, S. J., FOSTER, S., KENDALL-TAYLOR, P.,HARRIS, P. E. G protein gene mutations in patients with multiple endocrinopathies. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, 80, 1702-5.

- WU, J., DENT, P., JELINEK, T., WOLFMAN, A., WEBER, M. J., STURGILL, T. W. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*, 1993, 262, 1065-9.
- WY, L. A., CARLSON, H. E., KANE, P., LI, X., LEI, Z. M., RAO, C. V. Pregnancy-associated Cushing's syndrome secondary to a luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor-positive adrenal carcinoma. *Gynecol Endocrinol*, 2002, 16, 413-7.
- WYLLIE, A. H., KERR, J. F., MACASKILL, I. A., CURRIE, A. R. Adrenocortical cell deletion: the role of ACTH. *J Pathol*, 1973, 111, 85-94.
- YAMAKITA, N., MURAI, T., ITO, Y., MIURA, K., IKEDA, T., MIYAMOTO, K., ONAMI, S., YOSHIDA, T. Adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia associated with multiple colon adenomas/carcinomas which showed a point mutation in the APC gene. *Intern Med*, 1997, 36, 536-42.
- YANG, Y., HU, J. F., ULANER, G. A., LI, T., YAO, X., VU, T. H., HOFFMAN, A. R. Epigenetic regulation of Igf2/H19 imprinting at CTCF insulator binding sites. *J Cell Biochem*, 2003, 90, 1038-55.
- YANO, H., READHEAD, C., NAKASHIMA, M., REN, S. G., MELMED, S. Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol*, 1998, 12, 1708-20.
- YANOVSKI, J. A., CUTLER, G. B., JR. Glucocorticoid action and the clinical features of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1994, 23, 487-509.
- YARED, Z., BOURDEAU, I., LACROIX, A. Failure to control Cushing's syndrome with leuprolide acetate in a case of ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia with partial regulation of cortisol secretion by LH and hCG. *The Endocrine Society's 84th Meeting*, San Francisco, CA, 2002, Abstract P3-673.
- YASHIRO, T., HARA, H., FULTON, N. C., OBARA, T., KAPLAN, E. L. Point mutations of ras genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. *World J Surg*, 1994, 18, 455-60; discussion 460-1.
- YOSHIMOTO, K., IWAHANA, H., FUKUDA, A., SANO, T., ITAKURA, M. Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. *Cancer*, 1993, 72, 1386-93.
- ZAJICEK, G., ARIEL, I., ARBER, N. The streaming adrenal cortex: direct evidence of centripetal migration of adrenocytes by estimation of cell turnover rate. *J Endocrinol*, 1986, 111, 477-82.
- ZAZOPOULOS, E., LALLI, E., STOCCO, D. M., SASSONE-CORSI, P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*, 1997, 390, 311-5.

Conclusion générale et Perspectives

Certains éléments suggèrent actuellement que la tumorigenèse cortico-surrénaliennne obéit à un schéma en plusieurs étapes avec acquisition séquentielle d'anomalies moléculaires conduisant à un phénotype tumoral. Les connaissances relatives aux étapes tardives du processus de tumorigenèse, simultanées à la transformation maligne, révèlent des anomalies importantes tels que les troubles d'empreinte parentale de la région 11p15, associés à la surexpression majeure du gène IGF-II. En revanche, les étapes plus précoces de la tumorigenèse restent mal connues. Ce travail montre pour la première fois que la seule expression d'un gène codant pour un RCPG normal, tel que le GIPR ou le LHR, est capable d'initier la transformation cortico-surrénaliennne (Figure 22). Ceci a été démontré en utilisant un modèle de formation de tissu transgénique chez la souris immunodéficiente. Succinctement, l'approche a consisté en : clonage du gène d'intérêt, transfection dans des cellules d'encapsulation, synthèse des particules virales et infection des cellules cortico-surrénaliennes, la transplantation de ces cellules sous la capsule rénale de souris immunodéficientes suivie de diverses expérimentations post-opératoires et de l'analyse des tissus après le sacrifice des animaux. Toutes les conditions nécessaires à cette approche ont été mises au point et sont actuellement disponibles dans notre laboratoire. De ce fait, le présent travail ouvre la possibilité d'étudier le rôle d'autres récepteurs aberrants dans la tumorigenèse surrénaliennne, y compris ceux qui appartiennent à d'autres familles de RPGC (comme les récepteurs de l'angiotensine II, couplés à la protéine Gq), ou encore des récepteurs mutés corrélés à des tumeurs cortico-surrénaliennes.

A ce jour, une réponse anormale à la stimulation de ces deux récepteurs étudiés (GIPR et LHR) et d'autres RCPGs, a été décrite dans de nombreux cas d'hyperplasies surrénaliennes, un peu moins fréquemment dans des adénomes et rarement dans des carcinomes du cortex surrénalien. Dans l'un de nos travaux à partir d'un cas clinique, nous avons confirmé la surexpression aberrante des récepteurs β 2-adrénergiques dans une AIMAH responsable d'un syndrome de Cushing. Cet hypercortisolisme s'est avéré dépendant d'autres médiateurs tels que la 5-HT4, l'AVP et l'ACTH ectopique (sécrétés de façon autocrine). Les hyperplasies, en particulier, semblent représenter un environnement favorable à l'expression

multiple des récepteurs aberrants et peut être des ligands ectopiques, ce qui augmenterait les possibilités de stimulation de la stéroïdogénèse dans la masse tumorale. Quelques travaux suggèrent un lien entre l'hyperfonctionnalité des lésions cortico-surréaliennes et leur bénignité, et vice-versa pour les lésions malignes. Une hypothèse propose que les tumeurs plus agressives soient moins différenciées et par conséquent peu ou non sécrétantes, en corrélation avec la perte d'expression du facteur de transcription CREB, une cible importante de la voie de l'AMPc. Les tumeurs qui se sont développées environ 50 jours après la transplantation des cellules modifiées ont présenté un aspect hyperplasique, en conséquence de l'expression du LHR, ou un aspect adénomateux, en conséquence de l'expression du GIPR. Les tumeurs formées ont été toutes bénignes et l'activation de la voie de l'AMPc était impliquée dans la réponse des cellules cortico-surréaliennes à la stimulation du récepteur aberrant par son ligand spécifique. Ces données sont en accord avec la théorie citée précédemment (lien entre bénignité, activation de l'AMPc et différenciation cellulaire). Par contre, d'autres voies de signalisation pourraient être impliquées dans la formation de ces tumeurs, comme par exemple celle des MAPKs et de la PI3K/Akt. La formation des tumeurs, obtenue par la transplantation de cellules génétiquement modifiées, va permettre d'étudier extensivement les messagers impliqués dans la réponse à l'activation des récepteurs aberrants dans les tumeurs cortico-surréaliennes.

La comparaison des altérations décrites dans les types particuliers de tumeurs cortico-surréaliennes humaines avec les tumeurs formées à partir de nos cellules bovines génétiquement modifiées peut être proposée pour l'étude moléculaire spécifique de chaque gène. Ainsi, pour les greffons exprimant le récepteur du GIP, il serait intéressant d'étudier l'expression particulière des gènes, démontrée par microarrays dans l'AIMAH dépendante de l'alimentation : le *WISP2* qui code une protéine de la voie de signalisation inductible par Wnt-1 (aussi intitulé « connective tissue growth factor-like protein ») et le *SGNE1* qui code pour la protéine neuroendocrine 7B2. Cette étude ne pourra être réalisée que lorsque les séquences bovines de ces gènes seront disponibles. Pour les greffons exprimant le récepteur de la LHR, la même problématique s'applique à deux gènes importants : les facteurs de transcription GATA-4 et GATA-6. Un rapport entre ceux-ci et le gène LHR a été suggéré dans les tumeurs cortico-surréaliennes. Cependant, l'étude de l'expression de ces gènes (non encore clonés chez le bovin) par les greffons LHR, demeure une perspective de recherche à plus ou moins long terme.

Les événements qui déclenchent l'expression de ces gènes dans les tumeurs humaines cortico-surréaliennes ne sont pas connus. L'excès chronique de LH induit l'expression de son récepteur dans le cortex surrénalien des souris transgéniques bLH β -CTP qui exhibent un taux de corticostérone élevé. Ce fait n'est pas observé dans d'autres espèces, en particulier chez l'Homme, car toutes les femmes ménopausées ne présentent pas un syndrome de Cushing. La manifestation de l'hypercortisolisme pendant la grossesse ou après la ménopause, dans certains cas, pourrait amener à conclure que l'excès de ligand serait obligatoire pour induire la formation tumorale. Toutefois, quelques cas de tumeurs surréaliennes répondant à la LH se manifestent hors ces deux périodes. Dans notre travail, nous avons obtenu des greffons transformés suite à l'expression du LHR avant l'élévation de la LH engendrée par l'ovariectomie. Ceci suggère que la concentration de LH plasmatique basale est suffisante pour activer ces récepteurs aberrants. Dans le présent travail nous avons caractérisé les altérations phénotypiques des souris transplantées avec des cellules LHR. Ceci va permettre la planification des futures expériences en réalisant une ovariectomie au moins 3 ou 4 mois avant la transplantation. Il sera donc envisageable de mieux explorer la possible dissociation chronologique entre la formation tumorale (dans un premier temps) et de l'hypersécrétion du cortisol par ces tissus transformés (dans un deuxième temps).

L'induction d'expression de gènes de RCPGs dans les cellules cortico-surréaliennes suscite la question suivante : la transformation tumorale est-elle une conséquence de l'activation de tout récepteur utilisant la même voie de signalisation que celle du récepteur de l'ACTH ? Nous sommes en train de réaliser le clonage du gène MC2R humain dans un vecteur rétroviral afin d'obtenir des cellules cortico-surréaliennes surexprimant ce récepteur. Ainsi, il sera possible de réaliser ultérieurement la transplantation de ces cellules et d'étudier le phénotype du tissu transgénique surexprimant MCR2R et les conséquences de la sensibilité augmentée à l'ACTH. Il est concevable que le rétrocontrôle par le cortisol sur la sécrétion d'ACTH soit suffisant pour préserver la normalité fonctionnelle et morphologique de ce tissu. Pourtant, la surexpression de ce récepteur pourrait induire l'activation d'autres voies de signalisation conduisant à une transformation tumorale, indépendamment du rétrocontrôle de l'ACTH.

Les particularités phénotypiques des lésions bénignes hyperfonctionnelles (AIMAH, adénome) exprimant un ou plusieurs récepteurs aberrants, illustrent l'importance d'une bonne caractérisation *in vivo* des patients avec syndrome de Cushing ACTH-indépendant. La

réalisation des tests cliniques de dépistage fournit des éléments pour corrélérer les réponses anormales *in vivo* et l'expression des récepteurs *in vitro*. Ces tests n'auraient pas de but thérapeutique pour les tumeurs malignes où un traitement chirurgical s'impose, mais il existe un intérêt d'investigation dans les cas de syndrome de Cushing ACTH-indépendant car les réponses à la stimulation des récepteurs anormaux sont peu connues. La recherche de l'expression de ces récepteurs dans une grande série de tumeurs cortico-surréaliennes, en cours d'exécution lors d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) du réseau COMETE, pourra permettre la compréhension de l'implication de ces récepteurs dans des étapes intermédiaires et tardives de la progression tumorale.

Le rôle de l'environnement *in vivo* sur l'initiation du développement tumoral est aussi un point intéressant à explorer. Nos expériences ont démontré que les cellules génétiquement modifiées cultivées en simple support plastique ne présentaient pas de réponse hyperproliférative à l'addition du ligand du récepteur aberrant exprimé. Ces mêmes cellules ont développé *in vivo* un tissu transformé, suggérant le rôle des facteurs de croissance et des interactions entre les cellules et leur matrice cellulaire. De plus, la différence importante entre le tissu GIPR (encapsulé et riche en stroma) et le tissu LHR (qui exhibe beaucoup moins de tissu conjonctif) suggère que ces 2 récepteurs puissent présenter des mécanismes différents concernant : a) la régulation des protéines comme la trombospondine-2, la laminine et la fibronectine ; b) l'interaction avec des facteurs tels que le TGF β et le FGF-2 ; c) l'angiogenèse tumorale. La réalisation d'une nouvelle série de transplantation pour l'obtention des tissus tumoraux exprimant un récepteur ectopique peut permettre, lors du sacrifice des animaux, de réaliser une microdissection des greffons et les placer immédiatement en culture pour ainsi étudier les interactions paracrines dans les tissus.

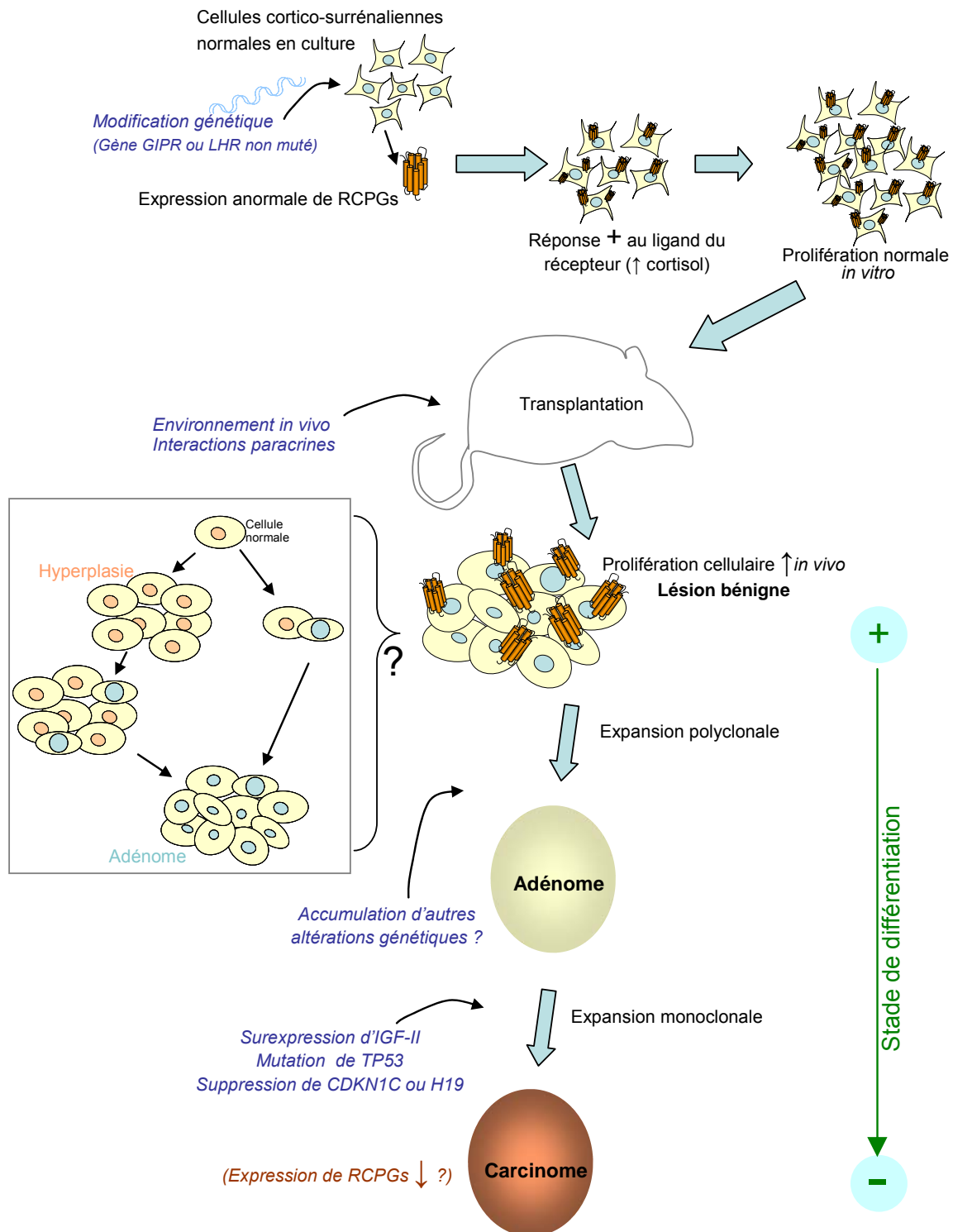


Figure 22. Modèle d'interprétation des résultats dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. L'expression anormale de RCPGs est présentée comme un événement initiateur, liée à un phénotype bénin. D'autres anomalies décrites dans la transformation maligne sont illustrées (cf. Sidhu, Gicquel *et al.*, 2003). La zone rectangulaire du schéma présente le modèle proposé pour la tumorigenèse hypophysaire (Asa & Ezzat, 1998) appliqué au cortex surrénal.

La caractérisation de la présence de récepteurs anormaux permet non seulement d'améliorer la compréhension des mécanismes pathophysiologiques, mais également d'offrir des possibilités thérapeutiques. L'utilisation d'un antagoniste ou inhibiteur de la sécrétion du ligand pourrait se prêter à deux types d'effets thérapeutiques : la correction de l'hypercortisolisme et l'effet anti-tumorale. Le premier effet répond à un intérêt clinique immédiat, le traitement des symptômes et complications du syndrome de Cushing. La première démonstration de cet effet a été réalisée dans un cas de syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation, où une amélioration transitoire de la cortisolémie a été obtenue en inhibant la libération de GIP par l'octréotide. Ce peptide inhibe également la sécrétion d'autres hormones digestives (telles que le GLP, le glucagon et l'insuline) et présente d'autres effets sur des récepteurs somatostatinerigiques présents dans certains tissus comprenant le cortex surrénalien. D'autres essais thérapeutiques ont été réalisés, comme dans le cas clinique d'AIMAH secondaire à expression β -adrénergique que nous avons présenté. Le traitement dirigé contre les récepteurs β -adrénergiques a permis de contrôler efficacement l'hypersecretion du cortisol et les signes cliniques de la patiente. Après 9 mois, ce traitement n'a pas permis de réduire la taille des masses surrénaliennes ; en contrepartie, il n'y a pas eu d'augmentation de la masse tumorale sous traitement. En fait, le bénéfice anti-tumoral de l'antagonisme des récepteurs aberrants n'a jamais été démontré. En clinique, la surrénalectomie reste donc le seul traitement capable de corriger à la fois le trouble hormonal et la complication tumorale dans cette maladie.

Un modèle animal serait donc très utile pour tester de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter l'hypercortisolisme mais aussi pour réduire la masse tumorale. Notre modèle de développement des tumeurs cortico-surrénaliennes chez la souris nous paraît en adéquation avec cet objectif. Le premier gène que nous avons étudié nous a permis de valider l'hypothèse initiale de causalité de l'expression aberrant d'un RCPG dans le développement tumoral du cortex surrénal. Malheureusement, nous ne disposons pas d'un antagoniste spécifique pour le récepteur du GIP et l'aspect thérapeutique n'a pas pu être testé. Le deuxième récepteur étudié dans notre modèle, le LHR, a été choisi afin de pouvoir tester ultérieurement l'effet anti-tumoral des médicaments disponibles capables de moduler la sécrétion du ligand d'une façon spécifique. Chez les souris, un traitement de longue durée (plusieurs mois) nécessite des conditions pharmacocinétiques adaptées. Les mini-pompes

osmotiques sous-cutanées ajustées à la taille de souris ne permettent que 14 jours de traitement. Le traitement via l'eau de boisson ne garantit pas une exactitude de dose. Notre perspective la plus immédiate est l'utilisation d'un nouvel antagoniste que nous venons d'obtenir, conçu pour provoquer une inhibition prolongée de la sécrétion de LHR.

L'étude d'un cas d'AIMAH responsable d'un hypercortisolisme sensible aux catécholamines a démontré sur le plan clinique l'importance de l'utilisation d'un antagoniste de récepteur β -adrénergique comme test diagnostique et également comme outil thérapeutique, résultant en un contrôle efficace de la sécrétion du cortisol. La préparation de ces cellules hyperplasiques en culture a permis d'en réserver une partie, qui a été congelée. Ainsi, nous disposons de cellules viables de l'AIMAH β -adrénergique. Elles ont été utilisées dans une première expérience de transplantation. Nos résultats préliminaires démontrent la formation d'un tissu tumoral bien vascularisé sous la capsule rénale des souris, indépendamment de la surrénalectomie. Ce tissu était fonctionnel (en termes de sécrétion de cortisol) et présentait des caractéristiques histologiques et de prolifération similaires au tissu d'origine. Le succès des expériences préliminaires va permettre d'étudier l'effet du traitement β -bloquant à très long terme sur la prolifération des cellules AIMAH et sur la taille de la masse tumorale.

Finalement, les récepteurs hormonaux aberrants GIPR et LHR ont un rôle causal dans l'étape initiale de la tumorigenèse. Un rôle similaire pour les autres récepteurs décrits en clinique est envisageable mais reste à démontrer. D'autre part, les mécanismes multiples d'activation des voies de signalisation des récepteurs rencontrés dans plusieurs cas d'AIMAH restent à élucider. Enfin, la question concernant l'existence d'un effet anti-tumoral par antagonisme sélectif d'un récepteur donné pourra être étudiée en utilisant le présent modèle de formation d'un tissu transgénique.

C) Expression aberrante des récepteurs β -adrenergiques : études cliniques et *in vitro*

Situation du sujet

Un nombre croissant d'études démontre l'expression anormale de récepteurs hormonaux dans les surrénales de patients porteurs d'un syndrome de Cushing ACTH-indépendant. Parmi ceux-ci, les récepteurs β -adrénergiques ont été rarement rapportés comme étant la cause d'une stimulation anormale de la sécrétion de cortisol. Il existe principalement des démonstrations *in vitro* de tumeurs corticosurréaliennes chez le rat et chez l'homme dont les cellules exhibent soit des sites de liaison, soit une réponse fonctionnelle à la présence de β -agonistes. La présence des récepteurs β -adrénergiques n'a jamais été démontrée dans le cortex surrénal humain normal. Les données de la littérature concernant l'expression ectopique des récepteurs β -adrénergiques n'ont pas démontré de corrélation avec des manifestations cliniques. Ceci à l'exception du cas index de syndrome de Cushing dépendant des catécholamines, qui a bénéficié des études *in vitro* (Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997). Dans un autre cas présentant un tableau clinique similaire, l'expression du gène du récepteur β -adrénergiques n'a pas pu être démontrée (Miyamura, Tsutsumi *et al.*, 2003).

Lors de mon internat dans le service d'Endocrinologie du Prof. Bachelot au CHU de Grenoble, nous avons pu diagnostiquer et accompagner le cas d'une patiente qui s'est présentée en mars 2001 avec un tableau évocateur d'un syndrome de Cushing, de manifestation intermittente. Cette patiente de 65 ans, aux antécédents d'hypertension et de diabète type 2, a présenté un fort déséquilibre hyperglycémique suivi de visage arrondi et erythroïque, amyotrophie et atrophie cutanée. Il s'agissait d'un cas de syndrome de Cushing ACTH-indépendant lié à une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales, chez laquelle les explorations ont fait suspecter l'expression anormale de récepteurs β -adrenergiques. Ceci a conduit à l'instauration d'un traitement par β -bloquants avec une très bonne réponse thérapeutique. Le cas a été présenté au congrès de l'Endocrine Society

(Mazzuco, Martinie *et al.*, 2002). Le tableau clinique a évolué vers une intolérance médicamenteuse due en partie à la nécessité de fortes doses de β -bloquant. Une conduite thérapeutique chirurgicale s'est imposée et la décision a privilégié l'option de surrénalectomie unilatérale. Ceci nous a permis d'obtenir le tissu surrénalien hyperplasique pour des études *in vitro*.

La description clinique de ce cas a été réalisée dans un article soumis à publication et ici nommé **Article III**. Il y a actuellement un total de six cas de syndrome de Cushing dépendant des catécholamines dans la littérature (Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997; Mircescu, Jilwan *et al.*, 2000; Imohl, Koditz *et al.*, 2002; Mazzuco, Martinie *et al.*, 2002; Miyamura, Tsutsumi *et al.*, 2003; Pignatelli, Rodrigues *et al.*, 2004). En ce qui concerne les traitements réalisés, il y a deux aspects importants dans le cas présent. Tout d'abord, le test thérapeutique par du propranolol s'est révélé plus sensible que les tests de stimulation β -adrénergique (posture et hypoglycémie insulinique), présentant un double avantage diagnostique et thérapeutique. En suite, la surrénalectomie unilatérale ayant produit de très bons résultats, elle constitue une option thérapeutique intéressante qui évite l'insuffisance surrénalienne définitive causée par la chirurgie bilatérale.

Immédiatement après l'acte chirurgical, nous avons récupéré des fragments de ce tissu hyperplasique pour la préparation de cellules en culture, pour l'extraction des ARNm et pour l'étude immunohistochimique. Les résultats sont présentés dans l'**Article IV**, qui reproduit *in vitro* les examens cliniques de recherche de récepteur anormaux réalisés chez la patiente. Les expériences réalisées nous ont permis d'identifier les différents médiateurs de la réponse cortisolique anormale de cette hyperplasie ainsi que de démontrer quels gènes y sont impliqués.

Article III

(Article soumis à publication)

CLINICAL CASE SEMINAR

Cushing's syndrome due to bilateral macronodular adrenal hyperplasia with posture-sensitive cortisol secretion:

treatment with β -blocking agents or unilateral adrenalectomy

Tânia L. Mazzuco, Philippe Chaffanjon, Monique Martinie, Nathalie Sturm, Olivier Chabre

Service d'Endocrinologie, Département de Diabétologie Urologie Néphrologie Endocrinologie (DUNE) (T.L.M., M.M., O.C.) ; Service de Chirurgie Générale et Thoracique (P.C.) ; Laboratoire de Pathologie Cellulaire, Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques (N.S.) ; Centre Hospitalier Universitaire A. Michallon, Grenoble, France.

Abbreviated title: **β -adrenoceptor-dependent Cushing's syndrome**

Key terms: **Macronodular Adrenal Hyperplasia, Cushing's syndrome, Beta-adrenoceptors, Adrenalectomy, Propranolol**

Introduction

Bilateral corticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) is a rare form of Cushing's syndrome in which both adrenals are responsible for an ACTH-independent cortisol secretion. In the past years it has been shown that in AIMAH the adrenals frequently show abnormal expression of receptors to hormones other than ACTH (1-3). While the role of these receptors in the tumorigenesis of AIMAH remains debated, there is good evidence that they are responsible for the peculiar pattern of cortisol secretion described in some patients with ACTH-independent Cushing's syndrome. For instance illegitimate expression of the GIP, LH/hCG or β -adrenergic receptor is responsible for food-induced, catecholamine-induced or gonadotrophin-induced Cushing's syndrome, respectively (3). On a clinical perspective these discoveries led to the hope that a medical treatment might be achieved in patients with AIMAH, using drugs that either suppress the secretion of the hormone acting on these receptors, or prevent the receptor activation. Such treatment has indeed been demonstrated but only in a surprisingly small number of patients (2, 4-10) [including a brief partial communication on the present case (8)], raising concern on the effectiveness of medical treatment. However it must be stressed that the accepted treatment of AIMAH is bilateral adrenalectomy (11), which imposes on the patient a life-long requirement for cortisol and aldosterone substitution, and a risk for fatal adrenal crisis in cases of poor compliance or adaptation of substitutive therapy. Therefore one must better define the clinical characteristics of patients with AIMAH that may benefit from an alternative to bilateral adrenalectomy.

Here we report the case of a patient with Cushing's syndrome linked to AIMAH who responded surprisingly well to the treatment with the β -adrenergic antagonist propranolol, although the clinical data only suggested a modest stimulation of cortisol secretion by catecholamines. On the long term however propranolol was not well tolerated but unilateral adrenalectomy, rather than bilateral adrenalectomy, proved to be an efficient and well tolerated treatment for her Cushing's syndrome.

Subject and Methods

Case Report

A 64 yr-old Caucasian woman was explored for suspected hypercortisolism. She had a history of type 2 diabetes treated with sulfonylurea and metformin and presented with severely deteriorating glycemic control (HbA1c 14 %) leading to insulin treatment and hypertension resistant to quinapril (150/105 mmHg). Physical examination revealed facial plethora and erythrosis, moderate skin atrophy and proximal muscle wasting. There was no hirsutism. Cushing's syndrome was evoked despite a recent weight loss of 7 kg (final weight 61 kg, Body Mass Index 25.1) contemporaneous to hyperglycemia and a restrictive diet. A 1 mg dexamethasone overnight test showed no suppression of morning plasma cortisol levels (500 nmol/L [181 µg/L]).

Diagnosis of ACTH-independent hypercortisolism was established by a 5-fold elevation of free urinary cortisol observed on two different days (900 and 1200 nmol/d [326 and 434 µg/d], normal range 120 - 220 nmol/d [43 - 80 µg/d]) and a suppressed morning ACTH concentration (<0.5 pmol/L [2.3 ng/L], normal 2 - 10 pmol/L [9 - 45 ng/L]). Circadian variations of plasma cortisol grossly mimicked a normal cycle however midnight nadir remained above normal value (280 nmol/L [101 µg/L]; normal, < 100 nmol/L [36 µg/L]) in two cycles separated by a one week interval (Fig. 1A). At the end of the second cycle, another 1 mg overnight oral dexamethasone test confirmed that cortisol secretion was not suppressed. Abdominal computed tomography revealed bilateral macronodular hyperplasia with a predominant left adrenal gland (6.1 x 3.0 x 3.0 cm versus 4.7 x 3.0 x 2.0 for the right adrenal gland) (Fig. 1B). Iodine-131 nor-cholesterol scintigraphy showed bilateral uptake, which was also predominant on the left adrenal gland (results not shown).

Hormone Assays

Plasma and urinary cortisol concentrations were determined by radioimmunoassay (Immunotech, Marseille, France). Plasma ACTH concentration was measured by immunoradiometric assay (Nichols Institute Diagnostics, San Clemente, CA), with detection limit of 0.5 pmol/L. Plasma aldosterone was measured by radioimmunoassay (home made), with a detection limit of 30 pmol/L. Plasma catecholamines levels were measured by high-pressure liquid chromatography technique coupled to electrochemical detection; plasma vasopressin was determined by radioimmunoassay after extraction with a sensitivity of 0.3

pg/ml for plasma (Dr Cottet-Emard, Laboratory of Exploration Fonctionnelle Endocrinienne et Métabolique, CHU de Lyon, France).

Investigation protocol

After informed consent of the patient, plasma levels of steroids in response to various stimuli were investigated using the protocol described by Lacroix *et al.* (12). It was approved by the local institutional ethics committee. The protocol consisted of monitoring plasma cortisol, aldosterone and ACTH concentrations at 30 – 60 min intervals for 2 – 3 h during the tests as follow: supine-to-upright posture test, standard mixed meal, combined iv administration of 200 µg TRH and 100 µg LHRH (Stimu-TSH and Stimu-LH, Ferring, Gentilly, France), combined administration of 1 mg glucagon (GlucaGen, Novo Nordisk, Puteaux, France) i.v. and cisapride (Prepulsid, Janssen-Cilag, Issy-les-Moulineaux, France) orally, 1 mg terlipressin (Glypressine, Ferring, Gentilly, France) i.v, 10 µg desmopressin (Minirin, Ferring, Gentilly, France) i.v., 6 IU regular insulin (Actrapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) i.v., or 0.25 mg tetracosactide (Synacthène, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France) i.v. as reference test. Cortisol response to the hypoglycemia (insulin test) was investigated after normalization of blood glucose levels of this diabetic patient. Because abnormal stimulations were found with the initial screening protocol, posture tests were repeated another two times and plasma levels of vasopressin, epinephrine and norepinephrine were measured. Modulation of endogenous levels of vasopressin and its relation with cortisol levels were examined during 5 h in a supine position by a 20-cc/kg oral water load in the first hour.

Morphological Evaluation

After surgical treatment, excised tissues were macroscopically evaluated and some representative fragments of different tumor areas were fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Hematoxylin and eosin staining and pathological analysis were performed.

Results

Evaluation for the presence of aberrant adrenal receptors

Systematic research for the expression of aberrant adrenal hormone receptors using the investigation protocol (described in *Subjects and Methods*) detected significant plasma cortisol response to four stimulation tests: upright posture, terlipressin (a V1-vasopressin receptor agonist), insulin-induced hypoglycemia and combined glucagon-cisapride (Table 1), while plasma ACTH remaining undetectable. As a reference test, tetracosactide administration resulted in a preserved cortisol response.

A meticulous evaluation of orthostatic variation revealed a reproducible profile of plasma cortisol variation reaching a maximum of 1.6 fold-increase at upright posture (Fig. 2). During a posture test, apart from cortisol and ACTH, the plasma levels of aldosterone, vasopressin, norepinephrine and epinephrine showed normal orthostatic variations (Table 2). Stimulation of cortisol secretion by upright posture could theoretically be mediated by receptors of catecholamines, vasopressin, angiotensin-II, atrial natriuretic factor and endothelin (12). The results of the terlipressin test pointed to the adrenal expression of vasopressin receptors, whereas the response to insulin-induced hypoglycemia pointed to catecholamines receptors. Thus, a water-loading test was performed suppressing vasopressin to undetectable levels; however this decrease in vasopressin was not accompanied by a decrease of cortisol (results not shown). We then addressed the hypothesis of adrenal expression of beta-adrenergic receptors. Considering the relative risk for coronary disease (long history of diabetes and hypertension), the test using the β -agonist isoproterenol was not performed. Instead, we chose to evaluate the response of cortisol secretion to the beta-blocking agent propranolol β because it is an accepted treatment for hypertension in diabetic patients and because it would have been the treatment of choice if the isoproterenol test had proved positive. Thus, a therapeutic test with 320 mg/d propranolol was performed and completely normalized free urinary cortisol excretion measured on the 3rd day of treatment (propranolol test, Fig. 3).

Clinical treatment

Maintaining of propranolol therapy for several weeks decreased both standing and supine plasma cortisol levels (not shown) and urinary cortisol, according to the evaluation in July-01 (Fig. 3). Diabetes and blood pressure were well controlled; usual anti-hypertensive treatment

(ACE) was stopped and the heart frequency was 65 beats/min. Discontinuation of β -blockade three months later resulted in a 6 fold-elevation of free urinary cortisol excretion (Fig. 3) and reappearance of facial plethora and erythrosis. Treatment reintroduction has normalized of cortisol levels and Cushing features. A novel tomographic evaluation (Fig. 4A) revealed stability of adrenal lesions, if compared before (right adrenal, 4.7 x 2.0 cm, left adrenal, 6.1 x 3.0 cm) and after treatment (right adrenal, 4.5 x 2.5 cm, left adrenal, 5.8 x 3.0 cm). Progressive appearance of fatigue, Raynaud's phenomenon and lower extremities edema led to replace propranolol by the β_1 -adrenoceptor antagonist atenolol (Fig. 3), which was less efficient to reduce cortisol levels. Then, atenolol was stopped and a lower dose of propranolol (160 mg/d) was tried but a mild hypercortisolism remained under this treatment.

Surgical treatment and morphological analysis

Seventh month after β -blockade initiation, a left transperitoneal laparoscopic adrenalectomy was performed without post-operative complications. The surgical specimen was a bright yellow plurinodular mass of 33 g corresponding to the hyperplastic left adrenal gland with multiple nodules measuring from few mm to more than 1,2 cm (Fig. 4B). Microscopic examination revealed a typical aspect of diffuse and nodular cortical hyperplasia composed of nests and cords of large vacuolated, lipid-laden zona fasciculata cells, admixed with few smaller and more compact cells (Fig. 4C), in absence of Weiss' criteria elements suggesting malignancy (13). Thus pathological findings confirmed the diagnosis of AIMAH. As a direct clinical consequence of surgical procedure, a normal free urinary cortisol excretion was verified in immediate post-surgical period (Fig. 3) without β -blocking treatment.

Clinical follow-up

Three months after unilateral adrenalectomy, clinical improvement was evident. Postural variations of cortisol disappeared and circadian values of plasma cortisol mimicking a normal cycle were detected (Fig. 5). However plasma ACTH levels remained suppressed whereas cortisol levels were not suppressed by dexamethasone, confirming persistence of pituitary-adrenocortical axis unresponsiveness and autonomous function of the remaining right hyperplastic adrenal gland.

After a follow-up of 2 years, the patient persists with a normal free urinary cortisol excretion (Fig. 3), without any evidence of Cushing's signs such as plethoric face, skin atrophy or amyotrophy. Diabetes is better controlled than prior to surgery (HbA1c 8.2 %) and

hypertension is well controlled (140/70 mmHg) by an angiotensin II receptor blocker/diuretic combination and a long acting calcium channel blocker.

Discussion

This report describes a patient with posture-sensitive Cushing's syndrome that presented satisfactory cortisol secretion normalization in response to different treatments as alternative to the bilateral adrenalectomy: First a high dose beta-blocking therapy and secondly a unilateral adrenalectomy, which was proposed to the patient as beta-blocking therapy was not well tolerated on the long term. A macronodular adrenal hyperplasia was responsible for the hypercortisolism, as confirmed by pathophysiological and morphological examinations. This rare form of adrenal pathology leading to a Cushing's syndrome still had unknown etiology in recent years (14). However, AIMAH is now frequently associated with aberrant adrenal expression of hormone receptors coupled to steroidogenesis (1) and a clinical screening protocol can currently be used to identify suspected patients (12).

Aberrant expression of β -adrenergic receptors was suggested in the present case by the finding of abnormal cortisol secretion stimulation in both upright posture and insulin-induced hypoglycaemia tests. Cortisol increased only modestly after upright posture and more significantly after administration of the V1-AVP receptor agonist terlipressin, but no significant changes were detected in response to desmopressin, a V2-AVP receptor agonist. The role of V1 receptors did not appear to be essential in postural cortisol response, as lowering vasopressin levels during a water load test did not suppress cortisol secretion. The partial cortisol stimulation in response to exogenous vasopressin (terlipressin test) at pharmacological levels could be either direct or mediated by AVP-induced catecholamine release from adrenal medulla (15). Since plasma ACTH level stayed below the detection limit assay during these tests, the adrenocorticotrophic axis had little or no effect on these results.

On the contrary the role of beta-adrenergic receptors was favored by the dramatic effects of a pharmacological test using the $\beta_{1/2}$ -adrenoceptor antagonist propranolol on cortisol secretion. Contrasting with the relatively weak cortisol stimulation (1.3 to 1.6 fold) during upright posture and insulin-induced hypoglycemia tests, a 3 days propranolol treatment showed a 13.5 fold inhibition of free urinary cortisol excretion. As briefly reported previously

for this patient (8) and another one (10), propranolol used in an antagonism test can confirm the cortisol secretion suppressibility and allow treatment extension for many months or years with adequate control of cortisol secretion and Cushing's clinical manifestations. In the first case reported of AIMAH with β -adrenergic-dependent Cushing's syndrome, a propranolol test followed by propranolol treatment were able to decrease cortisol levels, but they were not normalized after 35 days and an adrenalectomy was required (6). Hence, this therapeutic test can add a precision to the less specific posture test, affirming the implication of β -adrenoceptors in cortisol response and allowing a long term propranolol treatment in highly responsive and well tolerant patients. The present case and others (6, 10) provide evidence that the β -adrenoceptor blockade requires high doses of propranolol to be effective in AIMAH with β -adrenergic-dependent Cushing's syndrome. Thus, the risk of side effects and treatment intolerance is enhanced. That occurred during an essay of treatment introduction using progressively increased doses of propranolol, in a case of upright posture and insulin-induced hypoglycemia responsive hypercortisolism (1). Propranolol was discontinued due to fatigue and dyspnea and surgical therapy was carried out. In our case, treatment intolerance was manifest after 9 months β -blockade, which could be corrected by atenolol replacement or propranolol dose reduction; however, this resulted in less efficient reduction on cortisol secretion with free urinary cortisol of 1.6 and 1.2-fold normal values, respectively.

The clinical benefit of propranolol was well demonstrated on cortisol secretion, as the patient was exempted of Cushing's syndrome features during β -adrenoceptor blockade period, but no effect could be demonstrated on adrenal size (Fig. 4A). This suggests that β -adrenoceptors are not implicated in cellular proliferation and adrenal tumor progression in this stage of disease. However, one year-treatment can not be sufficient to conclude, especially since AIMAH appears to develop over a long period of time. Conversely, hyperplastic adrenal size did not enlarge during treatment, which could mean a preventive effect of the β -adrenoceptor blockade. An eventual anti-tumoral effect was not evaluated for more extended period of time because treatment intolerance imposed another therapeutic choice, and unilateral adrenalectomy was performed rather than bilateral adrenalectomy with adrenal insufficiency that follows this procedure.

An excellent control of cortisol secretion was obtained in our patient with unilateral adrenalectomy and two years after surgery she still has a normal free urinary cortisol excretion without the need for an adjuvant propranolol treatment. This suggests that unilateral

adrenalectomy of the largest gland can be an effective treatment for AIMAH, as already reported in a study of four cases in which no demonstration of anomalous receptors was performed (16). It may be argued that such report call in question the clinical validity of the search for abnormal expression of hormone receptors in AIMAH. We must stress however that at the present time only six patients with some evidence for overexpression of beta adrenergic receptors have been described (1, 6, 8, 10, 17, 18). In four of these patients, beta adrenergic receptor expression was suggested by stimulation of cortisol with isoproterenol, a test that might appear more direct evidence for adrenal expression of beta adrenergic receptor than the suppression test with propranolol that we describe here. However three criticisms can be made on the isoproterenol test: first, stimulation of cortisol by isoproterenol is not necessarily a direct phenomenon as it may be mediated by the isoproterenol stimulation of another hormone (such as renin) that eventually leads to stimulation of cortisol secretion; secondly the use of isoproterenol, a drug whose clinical use is restricted to patients treated in intensive care unit might not be devoided of any risk in patients with long lasting Cushing's syndrome and lastly a positive response to an isoproterenol test only leads to a trial with a betablocking agent.

In conclusion we argue that the use of a propranolol suppression test might be the best way to identify clinically relevant expression of beta adrenergic receptors in AIMAH patients, and that a systematic use of this test may help to better identify which patients might benefit from a long term treatment with beta-blocking agent. In patients without the possibility of pharmacological treatment because there is no response to the propranolol test neither to the LH/hCG or GIP receptors aberrant expression tests, unilateral adrenalectomy of the larger gland appears a better alternative than simultaneous bilateral adrenalectomy .

References

1. **Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, et al.** 2000 Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 85:3531-6.
2. **Bourdeau I, D'Amour P, Hamet P, Boutin JM, Lacroix A** 2001 Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5534-40.

3. **Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J** 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:375-82
4. **Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA, et al.** 1992 Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* 327:981-6
5. **de Herder WW, Hofland LJ, Usdin TB, et al.** 1996 Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3168-72
6. **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* 337:1429-34.
7. **Lacroix A, Hamet P, Boutin JM** 1999 Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 341:1577-81
8. **Mazzuco TL, Martinie M, Favre S, Bachelot I, Chabre O** ACTH-independent Cushing's Syndrome treated solely with propranolol therapy. The Endocrine Society's 84th Meeting, San Francisco, CA, 2002, pp Abstract P25-2
9. **Goodarzi MO, Dawson DW, Li X, et al.** 2003 Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 88:73-7
10. **Pignatelli D, Rodrigues E, Barbosa AP, Medina JL** Cushing Syndrome Due to the Ectopic Expression of Adrenergic Receptors in the Adrenal Cortex: a Case of ACTH Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH). The Endocrine Society's 86th Meeting, New Orleans, LA, 2004, pp Abstract P3-592
11. **Swain JM, Grant CS, Schlinkert RT, et al.** 1998 Corticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia: a clinicopathologic correlation. *Arch Surg* 133:541-5; discussion 545-6
12. **Lacroix A, Hamet P, Boutin JM** 1999 Clinical evaluation of the presence of abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *The Endocrinologist* 9:9-15
13. **Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr.** 1989 Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol* 13:202-6
14. **Stratakis CA, Kirschner LS** 1998 Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. *Horm Metab Res* 30:456-63
15. **Guillon G, Grazzini E, Andrez M, et al.** 1998 Vasopressin: a potent autocrine/paracrine regulator of mammal adrenal functions. *Endocr Res* 24:703-10
16. **Lamas C, Alfaro JJ, Lucas T, Lecumberri B, Barcelo B, Estrada J** 2002 Is unilateral adrenalectomy an alternative treatment for ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia? Long-term follow-up of four cases. *Eur J Endocrinol* 146:237-40
17. **Imohl M, Koditz R, Stachon A, et al.** 2002 [Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome - follow-up after unilateral adrenalectomy]. *Med Klin (Munich)* 97:747-53
18. **Miyamura N, Tsutsumi A, Senokuchi H, et al.** 2003 A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: simultaneous expression of several aberrant hormone receptors in the adrenal gland. *Endocr J* 50:333-40

TABLE 1. Screening tests for abnormal cortisol response.

Screening tests	Plasma cortisol (nmol/L)		
	Basal	Peak	% of basal
Supine-to-upright posture (without anti-hypertensive treatment)	448	559	125
(treated by quinapril)	574	785	137
Standard mixed meal	785	540	69
TRH, 200µg + LHRH, 100µg IV	604	647	107
Glucagon, 1mg IV + Cisapride, 10mg orally	496	634	128
Terlipressin, 1mg IV	686	1543	225
Tetracosactide, 0.25mg IV	982	1726	176
Desmopressin, 10µg IV	505	559	110
Insuline, 6U IV	536	713	133

Basal and maximum plasma cortisol values observed in response to the clinical tests (see *Subject and Methods*) are represented; maximum plasma cortisol variations are expressed as percentage of basal levels. A cortisol response was considered as non-significant when below 125%, potentially significant when above 125% and highly significant when above 150% of basal level, as described (12). All the tests were done while patient was supine, excepting the basal cortisol at the meal and the posture test response (after 2h upright).

TABLE 2. Variations of catecholamines and vasopressin during a posture test in the patient with macronodular adrenal hyperplasia.

Time	Posture test	Cortisol (nmol/L)	Aldosterone (pmol/L)	ACTH (pmol/L)	Vasopressin (pg/mL)	Norepinephrine (pg/mL)	Epinephrine (pg/mL)
08 :00	upright	820	245	< 0.5	1.10	638	49
10 :00	supine	580	104	< 0.5	0.58	303	37
12 :00	upright	847	267	< 0.5	1.93	703	87
8 :00	URL	690	443	12	< 1.50	450 ^a	50 ^a

URL, upper reference limit of the reference range. (^a) Upper normal values in supine position. Conversion factors: aldosterone values x 0.36 = pg/mL, vasopressin values x 0.99 = pmol/L, norepinephrine values x 5.9 = µmol/L, epinephrine values x 5.45 = µmol/L.

Figure legends

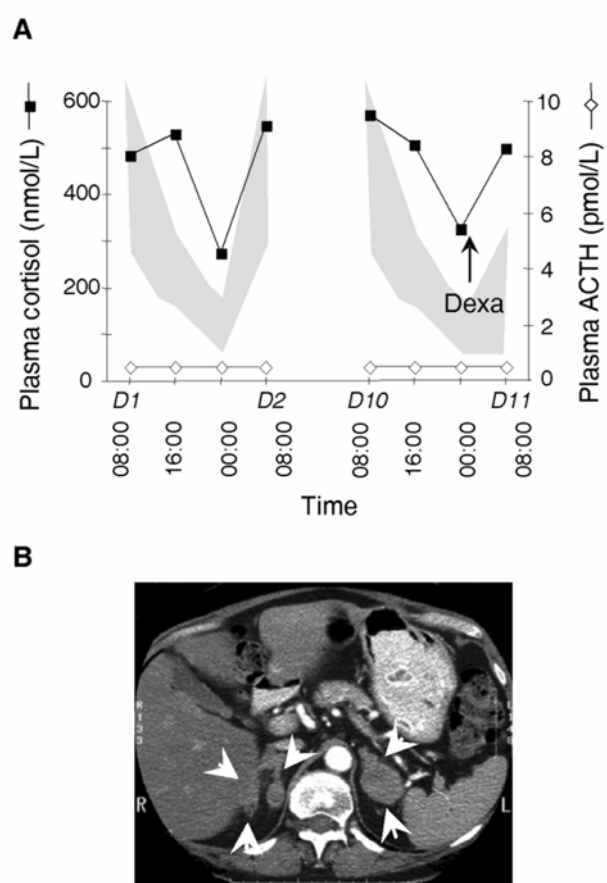
FIG. 1. Initial investigations: cortisol circadian cycle followed by 1mg overnight dexamethasone suppression test and radiological assessment. A, Plasma cortisol and ACTH concentrations were measured at the indicated time points in two consecutive 24 hours-cortisol cycles with one week interval; at the end of second cycle, 1 mg overnight oral dexamethasone test was performed (Dexa, as indicated by the arrow). Days 1, 2, 10 and 11 are represented by D1, D2, D10 and D11. Shaded areas indicate the normal range of cortisol values in circadian cycle and under dexamethasone. To convert cortisol or ACTH plasma concentrations to $\mu\text{g/L}$ or ng/L respectively, divide values by 2.76 or 0.22. B, Plan abdominal computed tomographic scan showing bilateral adrenal enlargement (arrows).

FIG. 2. Orthostatic variation of plasma cortisol concentrations. Plasma cortisol and ACTH were measured at the indicated time points in three different days. The patient was initially upright for at least 2 hours before blood collection; subsequently, changes from upright to supine and return to upright posture were performed each 2 hours interval immediately after blood collection.

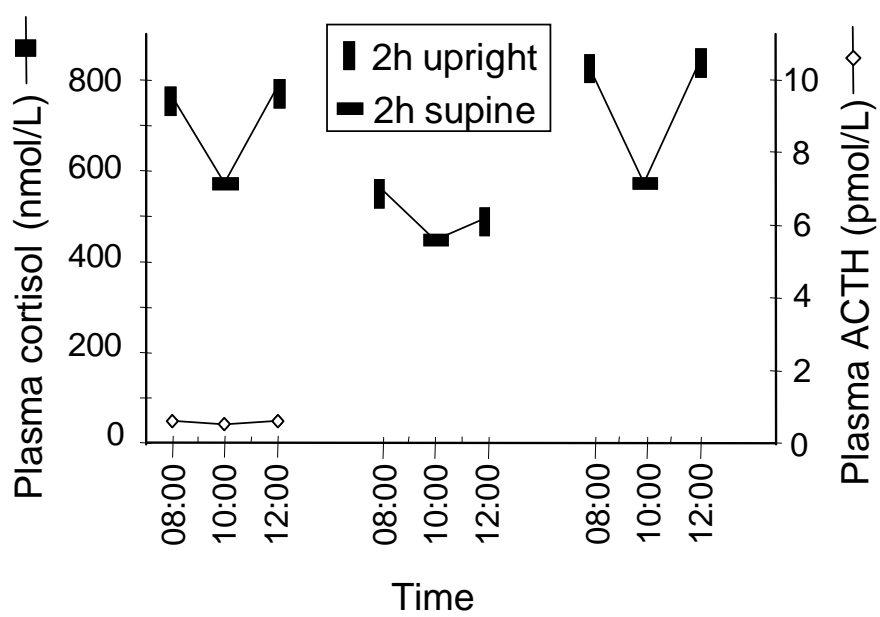
FIG. 3. Evolution of hypercortisolism under different treatments since 2001. Urinary cortisol excretion was measured in initial diagnostic analysis, under propranolol test and during medical and surgical treatments, at the indicated months. Stripped area represents normal urinary cortisol values (65 to 290 nmol per day).

FIG. 4. Morphologic evolution of AIMAH under beta-adrenergic blockade therapy and after surgical resection. A, Comparison of adrenal bilateral enlargement in abdominal computed tomographic scans performed before treatment or after 9 months beta-blocking treatment. B, Left macronodular adrenal gland was excised; the entire surgical piece was composed of a large polylobulated mass with two satellite nodules smaller than 2 cm. C, Microscopic view of hematoxylin-eosin stained slices shows a hyperplastic tissue with large clear cells arranged in a nodular pattern, interspersed with acidophilic small compact cells (magnification 25x, as indicated); the mass is surrounded by a thin fibrous capsule (cap). Fasciculata-like circumscribed cells with large hyperchromatic nuclei are shown in higher magnification (70x).

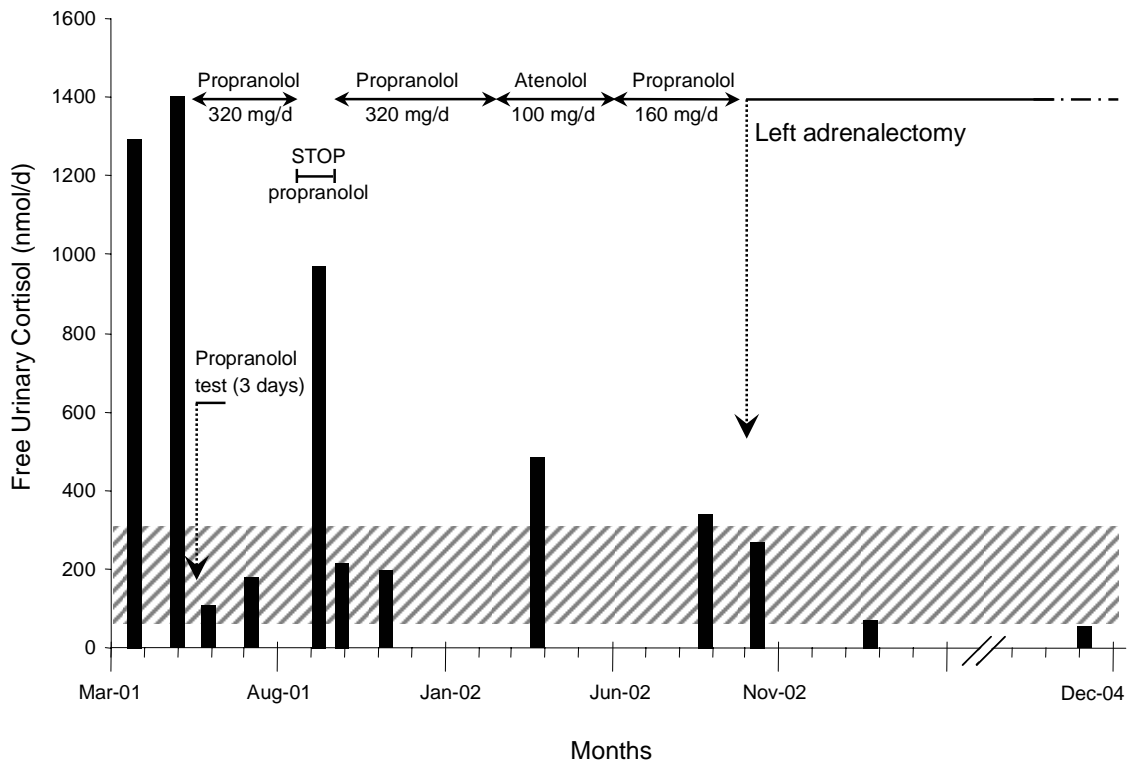
FIG. 5. Cortisol circadian cycle after unilateral adrenalectomy. Plasma cortisol and ACTH concentrations were measured at the indicated time points in two consecutive days, three months after surgical treatment. Orthostatic variation of plasma cortisol concentrations were searched for, as indicated by upright and supine symbols. Free urinary cortisol excretion was 83 nmol/day (normal 65 – 290 nmol/d). An overnight suppression test was performed by 1 mg oral dexamethasone administration as indicated (Dexa). Shaded areas specify the normal range of cortisol values in circadian cycle and in response to suppression test.



(Figure 1)



(Figure 2)

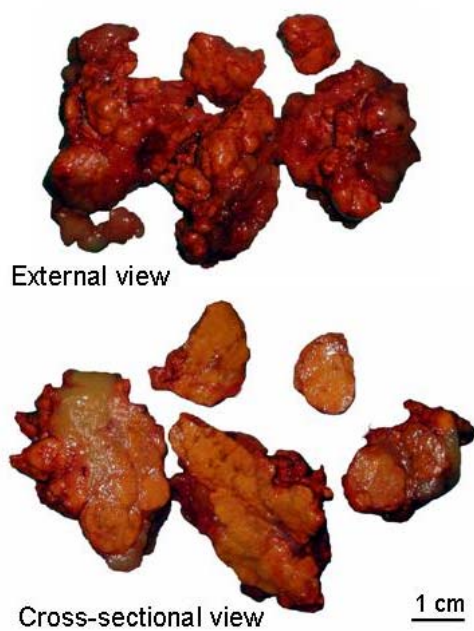


(Figure 3)

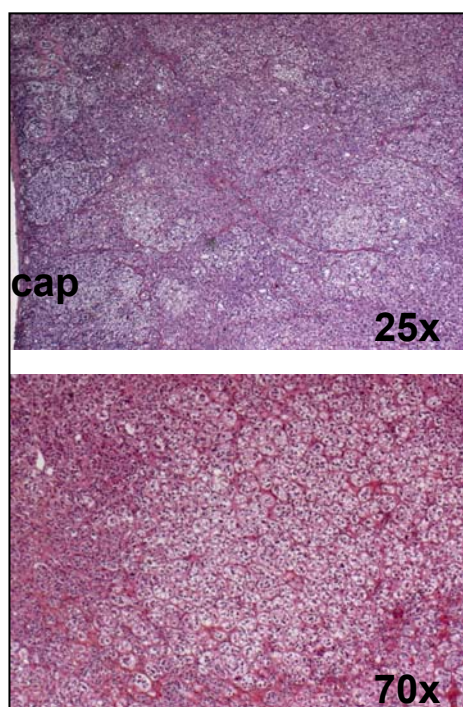
A



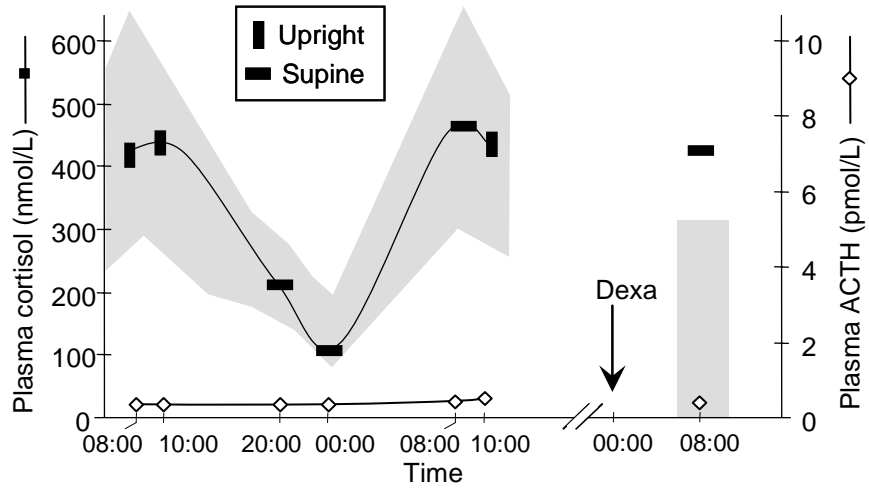
B



C



(Figure 4)



(Figure 5)

Article IV**Characterization of the molecular defects of a macronodular
adrenal hyperplasia causing a β -blocker-sensitive
Cushing's syndrome**

(Article soumis à publication)

Tânia L. Mazzuco^{1,2}, Michaël Thomas¹, Monique Martinie², Nadia Cherradi¹,
Nathalie Sturm³, Jean-Jacques Feige¹ & Olivier Chabre^{1,2}

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Equipe Mixte 105, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France;

² Service d'Endocrinologie, Département de Diabétologie Urologie Néphrologie Endocrinologie (DUNE) and ³ Laboratoire de Pathologie Cellulaire, Département d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble, France.

Keywords : beta-adrenergic receptor, vasopressin receptor, serotonin receptor, ACTH, adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome

Introduction

Several observations indicate that Cushing's syndrome caused by corticotrophin (ACTH)-independent tumors or macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) can be accounted for aberrant responsiveness of the tissue to various hormones or neurotransmitters, including gastric inhibitory polypeptide (GIP), epinephrine, vasopressin (AVP) or serotonin (5-HT) (1). Catecholamine-dependent Cushing's syndrome is a rare condition that has been clinically reported in six cases at present (2-7). Previous *in vitro* reports have provided evidence for abnormal responses to β -adrenergic stimuli on adrenocortical tumors, as summarized in Table 1.

These adrenal β -adrenergic responses were first studied in the rat adrenocortical carcinoma 494 in which abnormal activation of adenylate cyclase (AC) by catecholamines (8) and the presence of isoproterenol binding sites (which are absent in membranes of normal adrenal tissue) were characterized (9). In human adrenocortical tissues, activation of AC by norepinephrine and/or epinephrine was observed in adenomas (10), in adrenocortical carcinomas (11) and in one case of AIMAH (2) but not in normal tissues (11). The presence of β -adrenergic binding sites was also shown in that same case of AIMAH (2), in cortisol-producing adenomas (12) and in adrenocortical carcinomas (11). Prior to these *in vitro* studies, a catecholamine-dependent Cushing's syndrome was clinically characterized in only two cases (2, 6). These include a case with a simultaneous expression of several aberrant hormone receptors, a mild cortisol response to isoproterenol *in vivo* and an absence of β -adrenoceptor mRNA detection by RT-PCR (6).

We have previously described a clinical case of bilateral AIMAH with hypercortisolism sensitive to β -blockade (4), characterizing a catecholamine-dependent Cushing's syndrome that was well controlled by β -adrenergic antagonist treatment. Clinical screening tests performed to search for cortisol elevation in response to several ligands revealed other potential abnormal adrenal receptors expression, such as 5HT₄ and AVP receptors. Later on, the occurrence of pharmacological therapy intolerance led to the surgical excision of the larger adrenal gland of this patient. Hyperplastic tissue could thus be obtained for *in vitro* assays that allowed us to study the abnormal response to β -adrenoceptor stimulation and to determine which type of β -receptor is implicated in this response.

Here we report the compared analysis of the cortisol responses of AIMAH cells to diverse *in vitro* pharmacological tests and of the *in vivo* responses obtained in clinical

screening tests searching for aberrant adrenal receptors expression. Our findings indicate that the abnormal clinical responsiveness to catecholamines was a result of abnormal expression of β 2-adrenoceptors in the hyperplastic tissue. Comparison with normal tissue suggested β 2-adrenoceptor overexpression rather than ectopic expression as mentioned in the literature. *In vitro* assays showed cellular hyperresponsiveness to 5-HT and AVP, confirming the results of the clinical assays. Finally, basal overproduction of cortisol by AIMAH cells led us to identify an autocrine loop of ACTH production.

Materials and Methods

Tissue collection and cell culture

The hyperplastic left adrenal gland was collected from the patient at surgery and tissue fragments were either fixed in formalin for further paraffin inclusion and hematoxylin-eosin staining, or immediately transported to the laboratory in ice-cold culture medium for primary culture. Fresh tissue were dissected and separated from fat and tissue adjacent to the central vein, in order to eliminate the adrenal medulla. Adrenocortical tissue fragments (12 g of diffuse adrenal hyperplasia and two small nodules of 1 and 0.4 g) were minced with scissors and washed three times in Ham's F-12-DMEM (1:1) medium containing 10 mmol/L HEPES, 14 mmol/L NaHCO₃, and antibiotics (20 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, and 20 U/mL nystatin) (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Cells were enzymatically dispersed in 50 mL of culture medium containing adding 3 mg/mL collagenase A (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) and 0.1 mg/mL deoxyribonuclease (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), for 30 min at 37 C under stirring. The suspension was then filtered on sterile nylon sieve (100 μ m mesh), completed with culture medium up to 50 mL and centrifuged for 10 min at 400 x g. Cells prepared from different fragments were pooled because the number of cells from small nodules was insufficient to perform individualized culture experiments. Adrenocortical cells were then seeded in Petri dishes at a density of 10⁶ cells/dish with supplemented Ham's F-12-DMEM (1:1) medium containing 10% horse serum (Eurobio, Les Ulis, France) and 2.5% fetal calf serum (FCS) (Life Technologies) with antibiotics, 0.5 % insulin-transferrin-sodium selenite medium supplement (ITS) (Sigma), and incubated at 37 C in a 5 % CO₂-95 % air atmosphere. The culture medium was renewed 24 h later. Normal adrenal cells were prepared from a normal gland collected from a brain-dead

patient undergoing nephrectomy for renal transplantation, following the same procedure as above.

In vitro cortisol production

Confluent cultured cells were trypsinized and plated in supplemented medium in multiwell dishes (12 wells, 2×10^5 cells/well). Twenty-four hours later, the medium was replaced by serum-free Ham's F12/DMEM (1/1). On the next day, various concentrations of the following agonists were added in fresh serum-free culture medium: ACTH₁₋₂₄ (Neosystem, Strasbourg, France), isoproterenol, BRL 37344, 5-hydroxytryptamine (5-HT), Arg8-vasopressin (AVP), human chorionic gonadotropin (hCG) (all purchased from Sigma), GIP (Bachem, Voisins-le-Bretonneux, France), dobutamine (Merck, Lyon, France), salbutamol (GlaxoWellcome, Parma, Italy), desmopressin (Ferring, Gentilly, France), glucagon (Novo Nordisk, Puteaux, France) and cisapride (kindly provided by Prof. H. Lefebvre, University Hospital of Rouen, France). After an incubation period of 2 h, aliquots of the culture medium were taken and frozen at -20°C until determination of cortisol by RIA. The elevation of cortisol in response to the increased concentrations of some agonists reached a plateau, revealing the maximal effect (E_{max}) of each agonist. Cultured normal adrenocortical cells were incubated with the same agonists at concentrations providing the maximal response of AIMAH cells. The effect of the non-selective β -adrenergic antagonist propranolol (Zeneca Pharma, Cergy, France) on cortisol secretion was tested in a set of experiments of AIMAH cells.

Hormone Assays

Cortisol concentrations in conditioned culture media were determined by radioimmunoassay (Immunotech, Marseille, France). Plasma ACTH concentration was measured by immunoradiometric assay (Nichols Institute Diagnostics, San Clemente, CA), with a detection limit of 0.5 pmol/L.

RT-PCR analysis

After surgical resection and tumor dissection, 4 small tissue samples (around 10 mg each) were individualized before enzymatic digestion of all tumor fragments for cell culture. These samples were collected from the diffuse hyperplastic area (Fig 2, A and B) and from the two major nodules of 1 and 1.2 cm diameter (Fig. 2, C and D). These tissue samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. Thawed tissues were homogenized with the MagNA Lyser Instrument and total RNA was extracted using the High Pure RNA Tissue Kit (both from Roche Applied Science, Penzberg, Germany). The integrity of RNA was confirmed on ethidium bromide-stained agarose gels

and spectrophotometrically, using the 260/280 nm absorption ratio. RNA quantitation was performed by measuring the absorption at 260 nm. Two μg of total RNA were reverse-transcribed with ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega, Madison WI) and 0.5 μg of random hexamer DNA primers, according to the conditions recommended by the manufacturer. Aliquots of 100 ng cDNA were subjected to semi-quantitative PCR in a final volume of 25 μL containing 2.5 U Taq DNA polymerase (Qbiogene, Illkirch, France), and 14 pmol of each oligonucleotide primer. First, amplification of a DNA fragment of ribosomal protein L27 (RP-L27) was performed using the following pair of primers: 5'-GAACATTGATGATGGCACCTC-3' and 5'-GGGGATATCCACAGAGTACC-3'. All cDNA samples were adjusted to yield equal amplification of RP-L27 DNA fragment as internal standard and were analyzed in duplicate. The amplification parameters were 2 min at 94 C, then 35 cycles each consisting of 1 min at 94 C, 1 min at 55 C, and 2 min at 72 C. PCR reactions were also performed in RNA samples before RT, to exclude DNA contamination. A commercial preparation of adult human adrenal cortex RNA pooled from 11 normal glands (Human Adrenal Cortex Poly A⁺ RNA, Clontech, Palo Alto, CA) was used as a normal control. Amplified products were separated by agarose gel electrophoresis (2%). For RT-PCR positive control, RNA from other tissues (human placenta and normal adrenal cortex adjacent to adenoma) was extracted using the same procedure.

Primers design

To amplify the single exon of the β 1-adrenoceptor (AR) gene, the primer pair 5'-TCGTGTGCACCGTGTGGGCC-3' and 5'-AGGAAACGGCGCTCGCAGCTGTTCG-3' was designed, corresponding to nucleotides (nt) 638 – 860 of the reference sequence NM 000684. For the single exon of the β 2-AR gene, the primer pair 5'-ACCCACCAGGAAGCCATCAACTG-3' and 5'-AACTTCCTTACGGATGAGGTTATCC-3' was designed to amplify the nt 770 – 1116 fragment of the reference sequence NM 000024. For the β 3-AR gene amplification, the primer pair 5'-GCTCCGTGGCCTCACGAGAA-3' and 5'-CCCAACGGCCAGTGGCCAGTCAGCG-3' was designed to amplify the nt 220 – 490 fragment of exon 1 according to the reference sequence NM 0000025. For the single exon of MC2R gene, we used the primer pair 5'-GGAGTTTTGGAGAATCTGATCG-3' and 5'-ATGGTGATGTAGCGGTCCCGCAG-3' (corresponding to nt 112 – 396). Amplification of AVP receptors V1-R, V2-R and V3-R genes was performed using previously published sequences of nucleotides (13). For 5-HT₄ receptor gene, we used previously published sequence of primers that hybridize to all receptor splice variants (14).

Immunohistochemistry

Deparaffinized sections of the hyperplastic tissue were incubated with the following primary antibodies: mouse monoclonal antibody against a C-terminal peptide of ACTH (1:500; Biodesign International, Saco, ME), rabbit polyclonal antibody against β -melanocyte-stimulating hormone (β MSH, 1:10000; Prof. Bachelot, Grenoble, France) and rabbit polyclonal antibody for β -endorphin (1:300; Prof Bugnon, Lyon, France). Bound antibodies were detected using the labeled streptavidin-biotin-peroxidase method (DAKO Corp., Trappes, France). Negative controls of the immunohistochemical reactions were performed by replacing the primary antibody with preimmune serum.

Statistical analysis

Descriptive data are shown as mean \pm SEM. Variables showing normal distribution were analyzed using a two-tailed Student's t-test, whereas analyses of variance were used for variables with nonparametric distribution. P values less than 0.05 were considered as statistically significant, P values less than 0.01 were considered as highly significant. E_{\max} of each agonist on cortisol secretion was expressed in percentage of basal cortisol production (without agonist). If a dose-dependent stimulation was observed, the concentration that led to 50% maximal response (EC_{50}) was calculated using BioDataFit 1.02 online (Chang Bioscience, Castro Valley, CA) and values were presented as a negative base 10 logarithm of the molar concentration (pEC_{50}).

Results

Cortisol response of cultured cells to hormone challenge

The steroidogenic effect of several receptor ligands was studied by incubating cultured adrenocortical cells with increasing concentrations of agonists (data not shown). Cells from both the AIMAH catecholamine-dependent Cushing's syndrome and normal adrenal cortex (control cells) were studied. The maximal steroidogenic effect (E_{\max}) of each agonist is shown in Figure 1 and compared to the response of control cells to the same agonist concentration. Incubation of AIMAH cells with 10 nM ACTH elicited a non-significant increase in cortisol levels (E_{\max} 132 \pm 53 %) whereas control cells were significantly stimulated with a pEC_{50} of 10.1 \pm 0.2 M (Fig. 1A). It should be noted however that the basal level of cortisol production was 30 times higher in AIMAH cells (122 nmol/10⁶cells/h) than

in normal cells ($4.1 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells/h}$). Both the non selective β -adrenoceptor agonist isoproterenol and the β_2 -agonist salbutamol induced a significant stimulation of only the AIMAH cells with pEC_{50} 5.6 ± 0.6 and $5.9 \pm 0.1 \text{ M}$, E_{max} $178 \pm 67 \%$ and $180 \pm 58 \%$ respectively. Other specific agonists of β -adrenoceptors (dobutamine, β_1 ; BRL 37344, β_3) did not induce any significant increase in cortisol production (Fig. 1A).

A significant stimulation of cortisol secretion was also obtained in AIMAH cell following incubation with 5-HT and the 5-HT₄ receptor agonist cisapride (pEC_{50} 6.1 ± 0.2 and $7.5 \pm 0.8 \text{ M}$ respectively) (Fig.1B). Moreover, AVP elicited a dose-dependent stimulation of cortisol secretion with pEC_{50} $9.6 \pm 0.1 \text{ M}$ in the same cells. Regarding 5-HT and AVP receptor agonists, no significant stimulation of cortisol secretion was obtained in normal cells at the E_{max} concentrations determined for AIMAH cells (Fig.1B). None of the other agents (glucagon, GIP, hCG) induced any significant increase in medium cortisol levels in both cell types.

Identification of β_2 -adrenoceptor mRNA in adrenal tissues

These positive cortisol responses to various agonists in the AIMAH cells prompted us to examine the expression of their respective receptors by semi-quantitative RT-PCR. The analysis was carried out in various tissue samples: diffuse hyperplastic area (B and D) and major nodules (A and C) of AIMAH, normal adrenal cortex (a commercial preparation of RNA) and some positive control tissues as indicated in the legends of Figures 2 and 3. RT-PCR amplification of β_2 -AR produced a positive signal in all AIMAH fragments, while no or very weak amplification product were obtained for β_1 -AR and β_3 -AR (Fig. 2). Curiously, normal adrenal tissue also expressed the β_2 -AR. The ratios of β_2 -AR to RP-L27 RT-PCR signals indicated a slight increase in the expression level of β_2 -AR in AIMAH tissues as compared to normal cortex, without statistically significant differences. β_2 -AR expression in normal tissue was confirmed by RT-PCR analysis with the same set of primers in several human tissues: two adrenal cortex fragments adjacent to Conn's adenomas, one adrenal cortex fragment adjacent to a cortisol-producing adenoma and another fragment adjacent to a silent adenoma (data not shown). The expression of the ACTH receptor MC2R was observed in both AIMAH tissue fragments (Fig. 2). The MC2R/RP-L27 ratio was slightly lower in AIMAH than in normal adrenal cortex or in an adrenocortical tissue fragment adjacent to a Conn's adenoma (not shown).

Analysis of AVP receptor expression showed that only the adrenal receptor V1-R was present in AIMAH tissues (Figure 3). Surprisingly, a V3-R amplification product was observed with normal cortex but was not observed in AIMAH tissue. Specific signals of different sizes were detected for 5-HT4 receptor amplification from the AIMAH and the normal adrenal cortex, which could correspond to the splice variants for this gene. It must be noted that normal mRNA was originated from a pool of 11 human adrenal glands, explaining the presence of multiple bands in the lane N (Figure 3).

Demonstration of ectopic autocrine ACTH secretion

Although ACTH stimulation of AIMAH cells did not elicit any significant increase in cortisol production, the expression of the ACTH receptor MC2R was well demonstrated by RT-PCR in AIMAH tissue fragments. This discrepancy led us to perform several *in vitro* experiments in order to document more precisely the cortisol response of normal and AIMAH cultured cells challenged with ACTH. Under basal condition, a highly significant difference between basal cortisol levels of both cell types was observed (AIMAH cortisol levels were 15-fold higher than control cell cortisol levels, $P < 0.001$) (Fig.4A). This raised the possibility that a ligand for a steroidogenesis-coupled receptor might be secreted by AIMAH cells. Hypothesis of a local production of catecholamines by contaminating medullary cells or even ectopic adrenocortical synthesis of catecholamines was eliminated by the incubation of cultured medium with propranolol, a non-selective β -adrenoceptor antagonist, which did not alter cortisol secretion (Fig.4A).

We then analyzed the effect of the conditioned medium from AIMAH cultured cells on cortisol production of normal cells. Addition of AIMAH conditioned medium to normal cells resulted in a strong increase (20 times) of cortisol production, after subtracting the concentration of cortisol in the added medium (Fig. 4A). The same effect was observed on primary cultures of bovine adrenocortical cells (not shown). We then assumed that ACTH could be locally produced by AIMAH cells. After 2 h of culture, samples of conditioned medium from normal and AIMAH cells were taken for ACTH assay. IRMA using an antiserum specifically directed against ACTH 1-39 revealed detectable ACTH levels in AIMAH medium (1.51 ± 0.26 pmol/L) which were significantly different from the undetectable levels in control medium (Fig. 4B).

This prompted us to confirm this ectopic expression of ACTH in AIMAH tissue by immunohistochemical methods. AIMAH tissue slices containing both medulla and cortex

(Fig. 5A) were labeled with antibodies against tyrosine hydroxylase, a marker of medullary cells (Fig. 5B) and against the following pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides: β -endorphin, α -MSH and ACTH. Immunohistochemistry for ACTH revealed a diffuse cellular distribution in hyperplastic adrenal cortex but not in medulla (Fig. 5C). ACTH-positive cells had a typical aspect of spongiocytes and presented heterogeneous degrees of immunoreactivity, with some unlabelled cortical cells distributed in the tissue (Fig. 5C, *inset*). In contrast, no immunoreactivity was observed in the adrenocortical tissue from a normal gland (data not shown). Immunohistochemical detection of β -endorphin and α -MSH were negative in AIMAH tissues (not shown).

Discussion

This study of tissue fragments and cultured cells from an autonomously secreting adrenal macronodular hyperplasia sensitive to β -blockade allowed us to identify an abnormal expression of β 2-adrenoceptors, combined with cell hyperresponsiveness to 5-HT4 and AVP, in agreement with our previous observations from the clinical investigation. Moreover, a local ectopic ACTH production by AIMAH cells was observed, which probably contributes to their high level of basal cortisol production measured *in vitro*. Our results thus support the emergent notion that adrenal macronodular hyperplasia can present a mosaic of alterations, as already stated in few studies (3, 6, 15).

Under clinical investigation, abnormal stimulation of cortisol secretion in both upright posture and insulin-induced hypoglycaemia tests suggested an aberrant expression of catecholamine receptors (4). Despite a slight cortisol stimulation obtained in these tests, administration of a high dose of β -adrenergic antagonist (propranolol) induced a strong inhibition of cortisol secretion. Long term propranolol treatment allowed the normalisation of urinary cortisol levels after 3 days and within 9 months of treatment. Treatment by atenolol (a β 1-adrenoceptor antagonist) was less efficient than propranolol but it also significantly reduced cortisol levels (4). This observation could lead to the conclusion that β 1-adrenoceptors are implicated in AIMAH steroidogenic aberrant responses. Nevertheless, in the current work, we demonstrate *in vitro* cortisol responses to both a non-selective adrenoceptor agonist (isoproterenol) and a β 2- selective (salbutamol) agonist in AIMAH cultured cells, but no response to β 1- or β 3-adrenoceptor agonists. These data are in

agreement with the results of RT-PCR analysis which revealed mRNA expression of β 2-AR in all the AIMAH fragments studied. The identification of the precise β -AR type implicated in AIMAH catecholamine-dependent hypercortisolism may allow the use of specific beta-blocking treatment that will minimize the risk of side effects. Eventhough a treatment with β 1-AR antagonist had some inhibitory effect on the *in vivo* cortisol secretion, the present *in vitro* studies rule out its involvement as an ectopic receptor and clearly establish the role of β 2-AR. Clinical cortisol reduction obtained with high doses of the selective β 1-AR antagonist atenolol in this case of β 2-AR dependent AIMAH might be explained by the loss of selectivity of beta-blockers, which is often observed at maximal therapeutic doses (16, 17).

A novel aspect of aberrant β -AR expression is raised by the detection of β 2-AR mRNA in normal adrenal cortex. This result was confirmed by performing successful RT-PCR amplification of this product with mRNA samples from 4 specimens of normal human adrenal cortex. It leads to conclude that β 2-AR was overexpressed rather than ectopically expressed (1, 11) in this AIMAH tissue. Most studies reporting β -AR expression in adrenocortical tissues used functional assays (Table 1) and indicated no response of normal human adrenocortical cells to catecholamine stimulation. Besides the human species, cultured bovine adrenocortical cells show steroidogenic stimulation through the β -adrenergic receptors according to our unpublished results and to other authors (18). Concerning molecular studies, the presence of β 2-AR mRNA in human adrenal gland was demonstrated by one group (19). However, the total RNA used in these experiments could have been contaminated by medullary tissue which expresses β -ARs (20). Furthermore, β 1- β 2- and β 3-AR mRNA were detected in human adrenal tumor-derived cells (21). If β 2-AR is present in normal adrenal cortex, it does not seem to be coupled to steroidogenesis, as we observed no *in vitro* steroidogenic response to salbutamol at pharmacological concentrations. Only isoproterenol elicited an unexpected cortisol response in normal cells. Finally, this subject is quite controversial and requires extensive functional and molecular explorations to decipher the biological role of β 2-adrenoceptor in normal adrenal cortex.

In addition to the upright posture and insulin-induced hypoglycaemia tests performed in this study, systematic *in vivo* search for the expression of aberrant adrenal hormone receptors has been successful with other pharmacological agents: terlipressin (a V1-vasopressin receptor agonist) and combined glucagon-cisapride administration (4). Further clinical explorations led to consider these responses as minor in comparison to the β -adrenergic response. In fact, in normal subjects, these tests do not increase plasma cortisol

levels. The incubation of cultured AIMAH cells with 5-HT, cisapride and AVP resulted in significant cortisol stimulation, but treatment with glucagon did not. As analyzed by RT-PCR, expression of AVP receptors and 5-HT₄R were not increased in AIMAH tissues. As expected, V1-R and 5-HT₄R were expressed in normal adrenal cortex. Overexpression of the mRNAs encoding the eutopic V1a and 5-HT₄ receptors has been described in tissue explants removed from AIMAHs responsive to AVP and cisapride *in vivo*, respectively (22-25). Conversely, the present AIMAH tissue presented serotonin and vasopressin hyperresponsiveness unrelated to the degree of mRNA V1-R and 5-HT₄R expression, which could be explained by differences in receptor sensitivity or in corticosteroidogenesis coupling. In particular, the 5-HT₄R gene is normally expressed in adrenal cortex while the receptor stimulation by serotonin triggers aldosterone secretion (26). Variants of this receptor may exhibit different coupling efficiencies (27). According to the present AIMAH, few patients with 5-HT₄-dependent AIMAH have presented levels of mRNA expression similar to normal glands (24). In addition, in a study of vasopressin-responsive adrenocortical tumors, it was demonstrated that only a minority of tissues expressed large amounts of the V1-R (28).

Cortisol secretion of cultured AIMAH cells did not significantly increase in response to ACTH stimulation, although the MC2R was expressed in all AIMAH tissue fragments. Similarly to *in vitro* stimulation, *in vivo* administration of synthetic ACTH₁₋₂₄ resulted in a rather moderate cortisol response (4) as compared to the strong plasma cortisol increase (about 300 - 600 %) published in several cases of AIMAH (2, 3, 29-31). In fact, AIMAH cells in culture produced very elevated cortisol levels even under basal conditions. We tested the effect of propranolol on AIMAH cells and observed no effect on basal cortisol secretion, excluding an eventual autocrine β -adrenergic stimulation loop. Increased cortisol levels observed in normal cells incubated with AIMAH conditioned medium supplied further evidence that an autocrine factor/s produced by AIMAH cells was/were secreted in the culture medium and could stimulate normal cells even without any aberrant receptor expression. As no ACTH antagonist is currently available, we tried to detect ACTH in culture medium by specific IRMA. We could measure ACTH concentrations about 1.5 pmol/L. Although it is not a very high concentration, it can be related to a recent study that showed intra-adrenal ACTH production of about 3 – 5 pmol/L in perfused adrenocortical explants (32). As ACTH plasma levels of these Cushing's patients were suppressed, the amount of local ACTH production is probably insufficient to be detected at the systemic level.

ACTH is derived by cleavage from its precursor, POMC. In order to authenticate ACTH adrenal production, we performed immunohistochemistry (IHC) analysis to detect POMC-derived peptides. It had been demonstrated that ACTH can be synthesized and released by adrenochromaffin cells (33, 34), so we first identified the presence of medullary cells in the hyperplastic adrenal mass. ACTH immunodetection in adrenocortical hyperplasia is quite common when the adrenochromaffin cells are ectopically distributed in the middle of the adrenocortical mass, being able to produce ACTH (35). According to our results, ACTH immunoreactivity of AIMAH cells was unrelated to medullary cells. Taken together, IRMA and IHC detection of ACTH confirm the hypothesis of local factor(s) able to stimulate normal adrenocortical cells, demonstrating an ectopic autocrine ACTH production by AIMAH cells. It agrees with recent evidence indicating a local production of ACTH, AVP or 5-HT in adrenocortical cortisol-producing hyperplasias that can act as ectopic ligands (15, 32). This autocrine mechanism should contribute to maintain a basal adrenal cortisol production.

Finally, the present *in vitro* study of adrenal cortisol autonomy due to a bilateral hyperplasia demonstrates that the so-called ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) can actually present an atypical form of ACTH-dependency by local ectopic production. Moreover, we demonstrate that abnormal clinical responsiveness to catecholamines is a result of abnormal expression of β 2-adrenoceptors in this case of adrenal hyperplasia which also shows 5-HT₄ and AVP hyperresponsiveness. This association of mediators of adrenal response supports the recent observations that AIMAH may simultaneously express multiple illegitimate membrane receptors and/or present paracrine/autocrine regulatory signals.

References

1. **Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J** 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:375-82
2. **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* 337:1429-34
3. **Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, et al.** 2000 Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 85:3531-6
4. **Mazucco TL, Martinie M, Favre S, Bachelot I, Chabre O** ACTH-independent Cushing's Syndrome treated solely with propranolol therapy. The Endocrine Society's 84th Meeting, San Francisco, CA, 2002, pp Abstract P25-2

5. **Imohl M, Koditz R, Stachon A, et al.** 2002 [Catecholamine-dependent hereditary Cushing's syndrome - follow-up after unilateral adrenalectomy]. *Med Klin (Munich)* 97:747-53
6. **Miyamura N, Tsutsumi A, Senokuchi H, et al.** 2003 A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: simultaneous expression of several aberrant hormone receptors in the adrenal gland. *Endocr J* 50:333-40
7. **Pignatelli D, Rodrigues E, Barbosa AP, Medina JL** Cushing Syndrome Due to the Ectopic Expression of Adrenergic Receptors in the Adrenal Cortex. A Case of ACTH Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH). The Endocrine Society's 86th Meeting, New Orleans, LA, 2004, p 611
8. **Schorr I, Rathnam P, Saxena BB, Ney RL** 1971 Multiple specific hormone receptors in the adenylate cyclase of an adrenocortical carcinoma. *J Biol Chem* 246:5806-11
9. **Williams LT, Gore TB, Lefkowitz RJ** 1977 Ectopic beta-adrenergic receptor binding sites. possible molecular basis of aberrant catecholamine responsiveness of an adrenocortical tumor adenylate cyclase. *J Clin Invest* 59:319-24
10. **Matsukura S, Kakita T, Sueoka S, et al.** 1980 Multiple hormone receptors in the adenylate cyclase of human adrenocortical tumors. *Cancer Res* 40:3768-71
11. **Katz MS, Kelly TM, Dax EM, Pineyro MA, Partilla JS, Gregerman RI** 1985 Ectopic beta-adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 60:900-9
12. **Hirata Y, Uchihashi M, Sueoka S, Matsukura S, Fujita T** 1981 Presence of ectopic beta-adrenergic receptors on human adrenocortical cortisol-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 53:953-7
13. **Perraudin V, Delarue C, De Keyzer Y, et al.** 1995 Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2661-7
14. **Lefebvre H, Cartier D, Duparc C, et al.** 2002 Characterization of serotonin(4) receptors in adrenocortical aldosterone-producing adenomas: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1211-6
15. **Bertherat J, Contesse V, Louiset E, et al.** 2004 In Vivo and in Vitro Screening for Illegitimate Receptors in ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH) Causing Cushing's Syndrome: Identification of Two Cases of Gonadotropin/Gastric Inhibitory Polypeptide-Dependent Hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* Dec 7; [Epub ahead of print]
16. **Smith C, Teitler M** 1999 Beta-blocker selectivity at cloned human beta 1- and beta 2-adrenergic receptors. *Cardiovasc Drugs Ther* 13:123-6
17. **Wood AJ** 1984 Pharmacologic differences between beta blockers. *Am Heart J* 108:1070-7
18. **Kawamura M, Nakamichi N, Imagawa N, Tanaka Y, Tomita C, Matsuba M** 1984 Effect of adrenaline on steroidogenesis in primary cultured bovine adrenocortical cells. *Jpn J Pharmacol* 36:35-41
19. **Thomas RF, Liggett SB** 1993 Lack of beta 3-adrenergic receptor mRNA expression in adipose and other metabolic tissues in the adult human. *Mol Pharmacol* 43:343-8
20. **Boksa P** 1986 Studies on the uptake and release of propranolol and the effects of propranolol on catecholamines in cultures of bovine adrenal chromaffin cells. *Biochem Pharmacol* 35:805-15

21. **Kosti O, King PJ, Hinson JP** 2002 Tumour-derived human adrenocortical cells express beta-adrenergic receptors: steroidogenic effects of beta-adrenergic input. *Endocr Res* 28:363-7
22. **Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, et al.** 2004 Vasopressin responsiveness of subclinical Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60:192-200
23. **Mannelli M, Ferruzzi P, Luciani P, et al.** 2003 Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4616-22
24. **Cartier D, Lihmann I, Parmentier F, et al.** 2003 Overexpression of serotonin4 receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:248-54
25. **Mune T, Murase H, Yamakita N, et al.** 2002 Eutopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5706-13
26. **Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, et al.** 1993 Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1662-6
27. **Pindon A, van Hecke G, van Gompel P, Lesage AS, Leysen JE, Jurzak M** 2002 Differences in signal transduction of two 5-HT4 receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with Galphas- and Galphai/o-proteins. *Mol Pharmacol* 61:85-96
28. **Arnaldi G, Gasc JM, de Keyzer Y, et al.** 1998 Variable expression of the V1 vasopressin receptor modulates the phenotypic response of steroid-secreting adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2029-35
29. **Daidoh H, Morita H, Hanafusa J, et al.** 1998 In vivo and in vitro effects of AVP and V1a receptor antagonist on Cushing's syndrome due to ACTH-independent bilateral macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 49:403-9
30. **Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, et al.** 2000 Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab* 85:3531-6.
31. **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* 337:1429-34.
32. **Lefebvre H, Duparc C, Chartrel N, et al.** 2003 Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3035-42
33. **Willenberg HS, Bornstein SR, Hiroi N, et al.** 2000 Effects of a novel corticotropin-releasing-hormone receptor type I antagonist on human adrenal function. *Mol Psychiatry* 5:137-41
34. **Suda T, Tomori N, Tozawa F, et al.** 1984 Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 58:919-24
35. **Pereira MA, Araujo RS, Bisi H** 2001 Síndrome de Cushing associada à hiperplasia macronodular das adrenais: apresentação de um caso e revisão da literatura. *Arq Bras Endocrinol Metab* 45:619-27

TABLE 1. Summary of *in vitro* studies of β -adrenoceptor expression in adrenocortical tissues.

Tissues	Catecholamine-dependent Cushing's syndrome	<i>In vitro</i> studies				mRNA expression	Ref.s
		AC activation by β -agonists	Detection of β -adrenergic binding sites	Cortisol stimulation by epinephrine			
Rat							
Adrenocarcinoma 494	ND	Yes	ND	ND	ND	ND	(8)
Adrenocarcinoma 494	ND	ND	Yes	ND	ND	ND	(9)
Normal adrenal cortex	ND	ND	No	ND	ND	ND	(9)
Human							
Adenomas (n=5)	ND	Yes (n=3)	ND	ND	ND	ND	(10)
Adenomas (n=4)	ND	ND	Yes (n=2)	Yes (n=1)	ND	ND	(12)
Normal adrenal cortex	ND	ND	No	ND	ND	ND	(12)
Adrenocarcinomas (n=6)	ND	Yes (n=3)	Yes (n=3)	ND	ND	ND	(11)
Normal adrenal cortex (n=3)	ND	No	No	ND	ND	ND	(11)
Macronodular hyperplasia	Present	Yes	Yes ($\beta_{1,2}$ not β_3)	ND	ND	ND	(2)
H295R tumor-derived cells	ND	ND	ND	ND	ND	$\beta_1, 2, 3$	(21)
Macronodular hyperplasia	Present	ND	ND	ND	ND	Absent	(6)

ND, not defined.

Number of positive cases (n) are shown in parenthesis, when total of cases > 1.

Legends of figures**FIG. 1. Maximal cortisol responses of adrenal hyperplasia cultured cells to stimulation by several agonists.**

Hyperplastic (AIMAH) and normal human adrenocortical cells were exposed for 2 h to different concentrations of agonists and the maximal cortisol responses (E_{\max}) were determined and shown in the figure. Histograms represent the mean + s.e.m. of cortisol concentration in conditioned medium as percentage of basal cortisol production (from cells incubated with agonist-free medium). **A**, Cells were incubated with ACTH and with the following β -adrenergic agonists: isoproterenol (non-selective agonist), dobutamine (β_1 -agonist), salbutamol (β_2 -agonist) or BRL 37344 (β_3 -agonist); **B**, Other agonists were tested to compare *in vitro* stimulation with previously described *in vivo* responses: serotonergic agonists 5-HT (non-selective) and cisapride (5HT₄ receptor agonist); glucagon, vasopressin (AVP), gastric inhibitory peptide (GIP) and human chorionic gonadotrophin (hCG). Incubations were performed in triplicate wells in 2 or 3 different experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs. control, except when indicated.

FIG. 2. Expression of beta-adrenoceptors genes in human adrenal hyperplasia.

β_1 -, β_2 -, β_3 -AR, MC2R and the control housekeeping RP-L27 mRNA were amplified by RT-PCR as described in *Material and Methods*. Samples from AIMAH tissue fragments (A, B, C, D; shown in the right inset) were used for separate RT-PCR reactions and compared to normal adrenal cortex mRNA (lane N, obtained from a pool of 11 human glands). Negative (lane -) controls were performed by omitting the reverse transcription step. Positive controls (lane +) were performed using human placental RNA for the β -AR and RP-L27 reactions and RNA from normal adrenal cortex adjacent to a Conn's adenoma for MC2R reaction. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, revealed by ethidium bromide and photographed under UV light. DNA markers were run in parallel to determine the sizes of amplified products shown on the right (indicated in base pairs, bp). The quantitation of the β_2 -adrenoceptor mRNA relative to RP-L27 mRNA signal ratio is shown in the bottom right panel.

FIG. 3. RT-PCR amplification of vasopressin receptors and 5-HT₄ receptor genes.

V1-R, V2-R, V3-R, 5-HT₄R and the control housekeeping RP-L27 mRNA were amplified by RT-PCR as described in *Material and Methods*. Samples from AIMAH tissue fragments (A, B, C, D; inset of Fig.2) were used for separate RT-PCR reactions and compared to normal

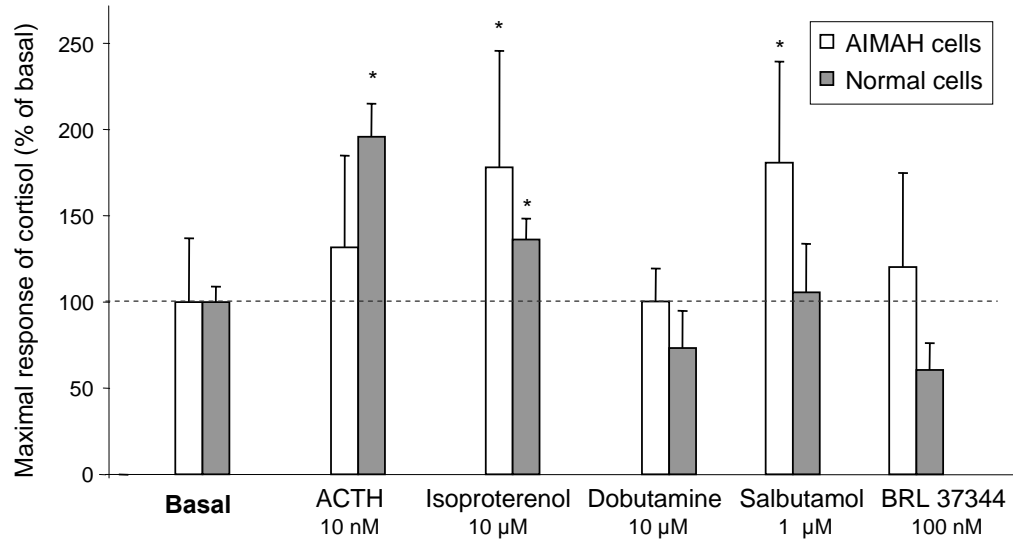
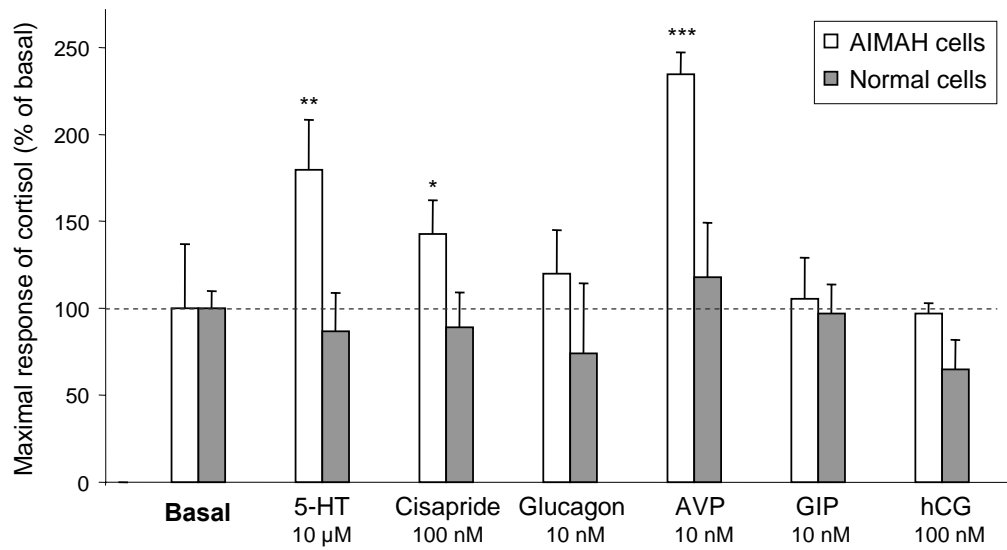
adrenal cortex mRNA (lane N, obtained from a pool of 11 human glands). Negative (lane -) controls were performed by omitting the reverse transcription step. Positive controls (lane +) were performed using RNA from an adrenocortical tissue adjacent to a Conn's adenoma for V1-R and 5-HT₄R gene amplification and from human placenta for V2-R and V3-R gene amplification. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, revealed by ethidium bromide and photographed under UV light. DNA markers were run in parallel to determine the sizes of amplified products shown on the right (indicated in base pairs, bp).

FIG. 4. Cortisol production and ACTH detection in conditioned medium from human adrenocortical cells.

A, AIMAH cells were incubated for 2 h in the absence (basal) or the presence of 10 nM ACTH or 1 μ M of the non selective β -adrenergic antagonist propranolol. Cortisol concentrations present in the conditioned media collected after 2 h of culture of AIMAH cells (white bars) were determined as described in *Material and Methods*. Normal human adrenocortical cells were incubated for 2 h in the absence (basal) or the presence of AIMAH conditioned medium and cortisol secretion was then measured in the normal cell conditioned media (grey bars). For determination of the steroidogenic response of normal cells to AIMAH conditioned medium, the concentrations of cortisol initially present in the conditioned medium were subtracted from those present at the end of the incubation. Histograms represent the cortisol concentration mean + s.e.m. of quadruplicate experiments. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **B**, ACTH quantitation was performed by IRMA on conditioned media from control and AIMAH cells, collected after 2 h of culture. Dashed lines represent the interval below detection limit as described in *Material and Methods*.

FIG. 5. Immunohistological analysis of AIMAH tissue.

Consecutive histological sections of AIMAH were analyzed. **A**, Histological staining with hematoxylin & eosin shows adrenocortical cells (AC) distributed in homogeneous nodules and in internodular zones, in the vicinity of medullary cells (M). **B**, The localization of medullary cells is determined by immunohistochemical determination of tyrosine-hydroxylase (dark staining). **C**, Immunohistochemical detection of ACTH in adrenocortical AIMAH tissue. A heterogeneous staining and a diffuse distribution of positive cells are observable. Medullary cells are not stained. Bars (A,B,C), 1000 μ m. **D**, Higher magnification picture of the inset shown in panel C. Bar, 200 μ m.

A**B****Figure 1.**

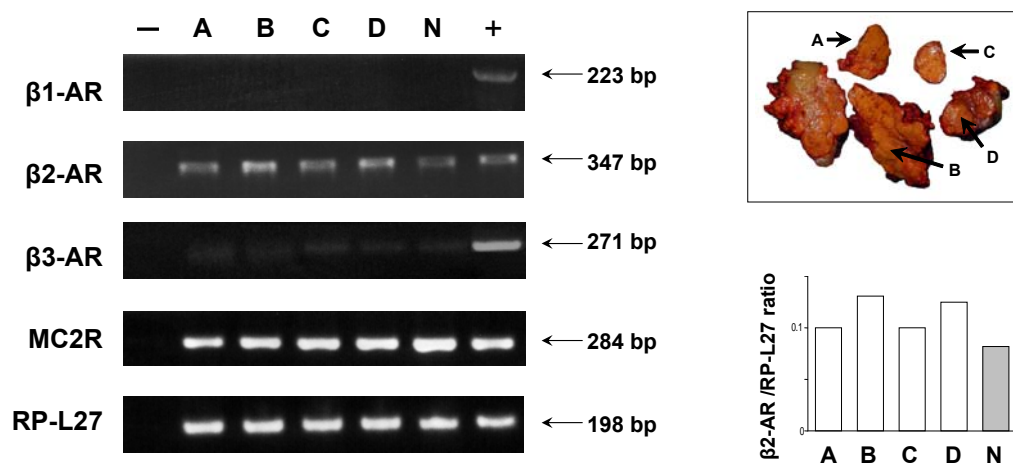


Figure 2.

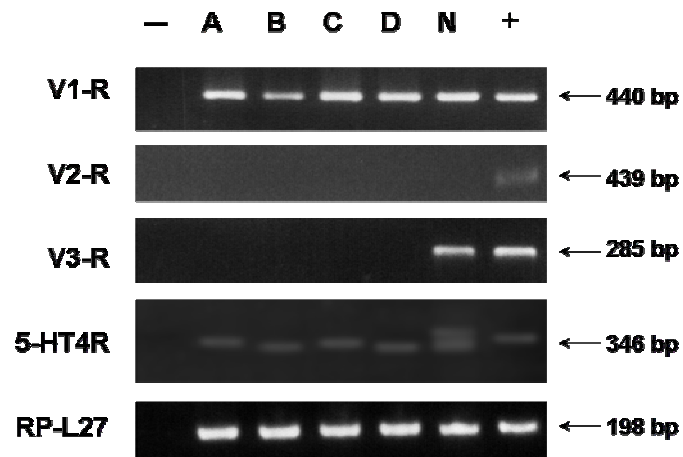


Figure 3.

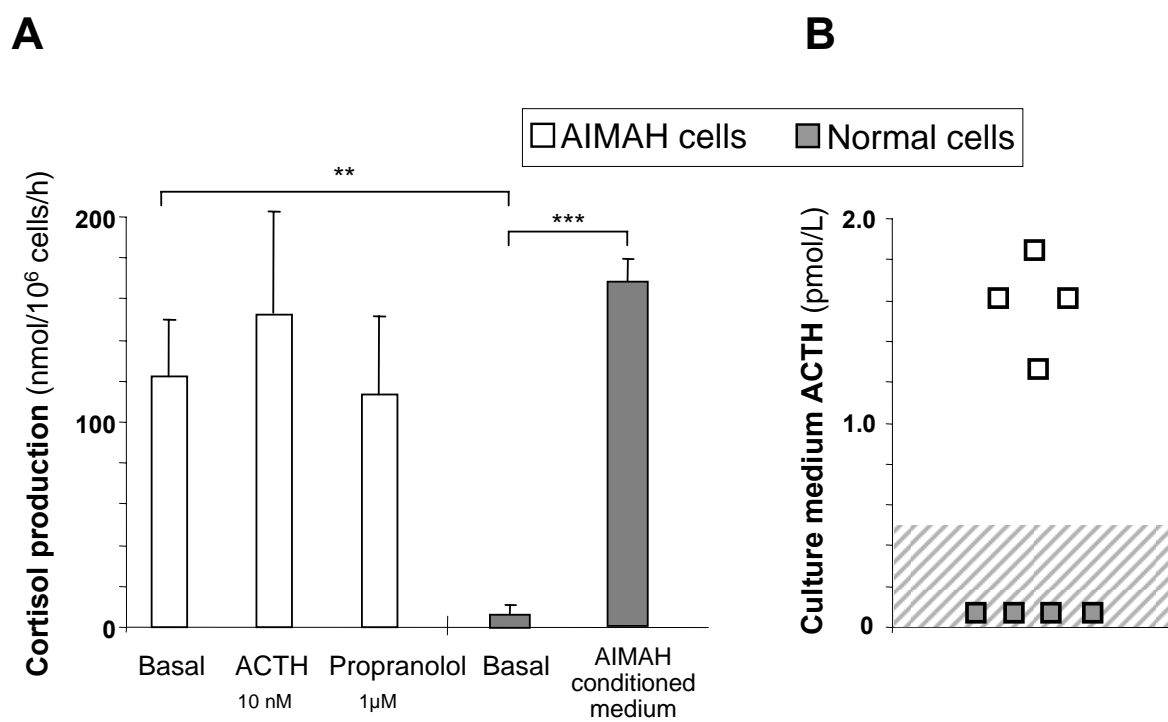


Figure 4.

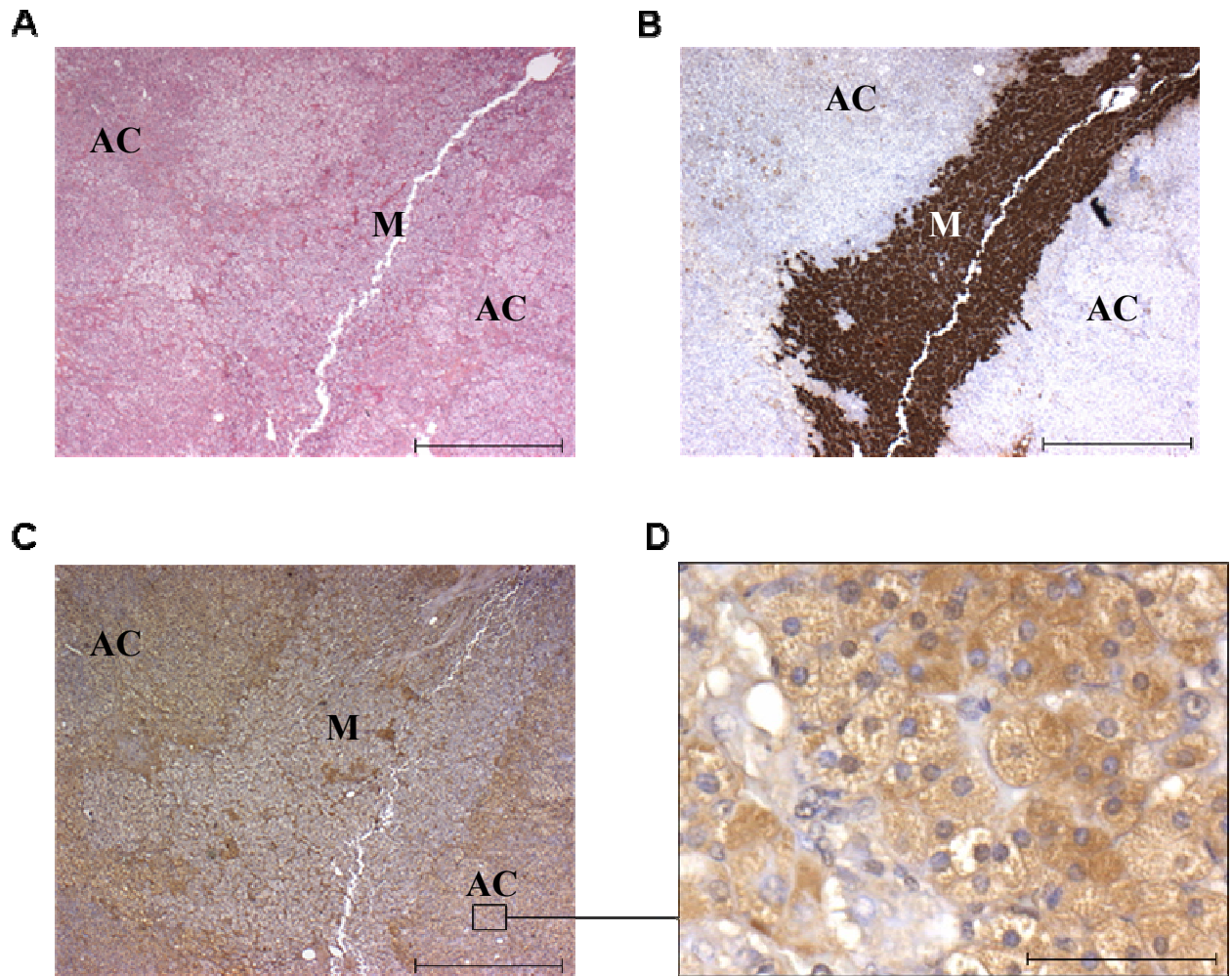


Figure 5.

Discussion

Nous avons étudié le cas d'une patiente qui a présenté un tableau clinique d'un Syndrome de Cushing atypique. Cette observation illustre l'intérêt de la recherche systématique d'une stimulation anormale du cortisol chez les patients porteurs d'un syndrome de Cushing ACTH-indépendant, en particulier ceux liés à une hypertrophie surrénalienne macronodulaire bilatérale. Ces explorations doivent être en particulier dirigées vers la recherche de récepteurs pour lesquels il existe des agents pharmacologiques utilisables en thérapeutique. Notre observation suggère que, pour la mise en évidence de récepteurs β -adrénergiques, un test diagnostique au propranolol pourrait être plus sensible que les tests de stimulation par l'orthostatisme et l'hypoglycémie insulinique, avec l'avantage de présenter moins de contre-indications du point de vue cardiovasculaire que le test de stimulation par l'agoniste β -adrénergique isoprotérenol. En particulier, le test proposé, en fonction de son résultat, peut amener à un traitement de l'hypercortisolisme par propranolol.

Dans cette observation, le traitement par de fortes doses de propranolol n'a pas pu être poursuivi à long terme en raison de problèmes de tolérance, ce qui nous a conduit à envisager une surrénalectomie unilatérale. Cette procédure a été capable de normaliser la sécrétion de cortisol, sans besoin de traitement complémentaire par antagoniste β -adrénergique. Ainsi, il est important de considérer ces deux options thérapeutiques comme une alternative à la surrénalectomie bilatérale avec insuffisance surrénale définitive. A partir de la pièce de surrénalectomie, les études fonctionnelles de cellules *in vitro* et l'identification des gènes par RT-PCR nous a permis de reconnaître le récepteur β_2 -adrénergique comme étant le responsable de la réponse anormale du cortisol au catécholamines. La connaissance du type du récepteur peut permettre un traitement pharmacologique spécifique en réduisant le risque d'effets indésirables. Un autre aspect nouveau de ce travail a été la démonstration de l'expression faible du récepteur β_2 -adrénergique dans des cellules cortico-surréaliennes normales. A priori, ce récepteur ne semble pas être couplé à la stéroïdogénèse dans le cortex surrénal normal et sa fonction dans ce tissu est inconnu.

D'autres mécanismes capables de stimuler la sécrétion de cortisol par les cellules tumorales ont été décelés. La faible élévation de la cortisolémie en réponse au test clinique

avec la vasopressine ou encore le test combiné cisapride/glucagon a été compatible avec les résultats obtenus *in vitro*. Ceux-ci ont révélé une stimulation de la sécrétion du cortisol par l'AVP et par la 5-HT ainsi que le cisapride. Ces données, en même temps que l'analyse par RT-PCR des ARNs extraits de l'hyperplasie cortico-surrénalienne permettent de conclure à la présence des récepteurs V1 et 5-HT4 couplés à la stéroïdogénèse dans cette AIMAH. De plus, la démonstration d'une production autocrine d'ACTH par ces cellules hyperplasiques complète le tableau complexe d'altérations exhibées par cette hyperplasie.

Dans le cas particulier de syndrome de Cushing présenté, il existe une dépendance aux catécholamines via l'activation des récepteurs β 2-adrénergiques anormalement exprimés. Les résultats démontrent clairement que ces récepteurs sont couplés à la stéroïdogénèse dans le tissu hyperplasique mais pas dans le tissu normal. Les mécanismes impliqués dans le couplage anormal de ces récepteurs exprimés par le tissu tumoral restent à élucider. L'utilisation de la technique de la PCR à temps réel nous permettra de quantifier exactement l'expression du récepteur β 2-adrénergique et de préciser si son expression est plus élevée dans le tissu tumoral par rapport au tissu normal.

En conclusion, l'hypercortisolisme retrouvé dans un cas d'AIMAH s'est avéré dépendent de la stimulation β 2-adrénergique et aussi sensible à la stimulation vasopressinergique et sérotoninergique. De plus, ceci peut être, d'une façon non classique, considéré comme dépendant de l'ACTH secrété de manière illégitime par les cellules tumorales.

B) Expression aberrante du récepteur de la LH dans un modèle animal

Situation du sujet

La précédente démonstration de la participation directe du récepteur ectopique du GIP dans la formation de tumeurs corticosurréaliennes bénignes nous a amené à poser la question de l'implication des autres GPCRs dans la tumorigenèse. Pour y répondre, la méthode utilisée pour le développement d'un tissu transgénique était déjà mise en place et les conditions d'expérimentations étaient bien maîtrisées, permettant ainsi de reproduire de cette approche pour l'investigation de la transduction d'autres gènes codant des récepteurs surréaliens aberrants.

Nous avons choisi le gène du récepteur de la LH qui reconnaît également la hCG. Le contrôle pharmacologique et physiologique de la sécrétion des ligands de ce récepteur apparaît plus facile que pour le GIP. L'ADN complémentaire du LHR nous a été fourni par le Dr. Rodien (Rodien, Cetani *et al.*, 1998). Ce gène a été utilisé pour le créer un vecteur rétroviral codant le LHR (Figure 21), capable d'être transfecté à des cellules productrices de particules virales, suivant la procédure validée dans le travail précédent (Résultats – Partie A).

Des cellules corticosurréaliennes bovines exprimant le LHR humain ont été créées et utilisées pour la transplantation chez les souris immunodéficientes. Ce travail est présenté dans **l'Article II**, qui démontre l'expression anormale du LHR par ces cellules, l'aspect phénotypique intéressant des souris transplantées, ainsi que le résultat obtenu dans le néo-tissu formé. L'obtention de souris LHR a permis de caractériser cliniquement et histologiquement une situation très proche du syndrome de Cushing sensible à la LH chez l'humain.

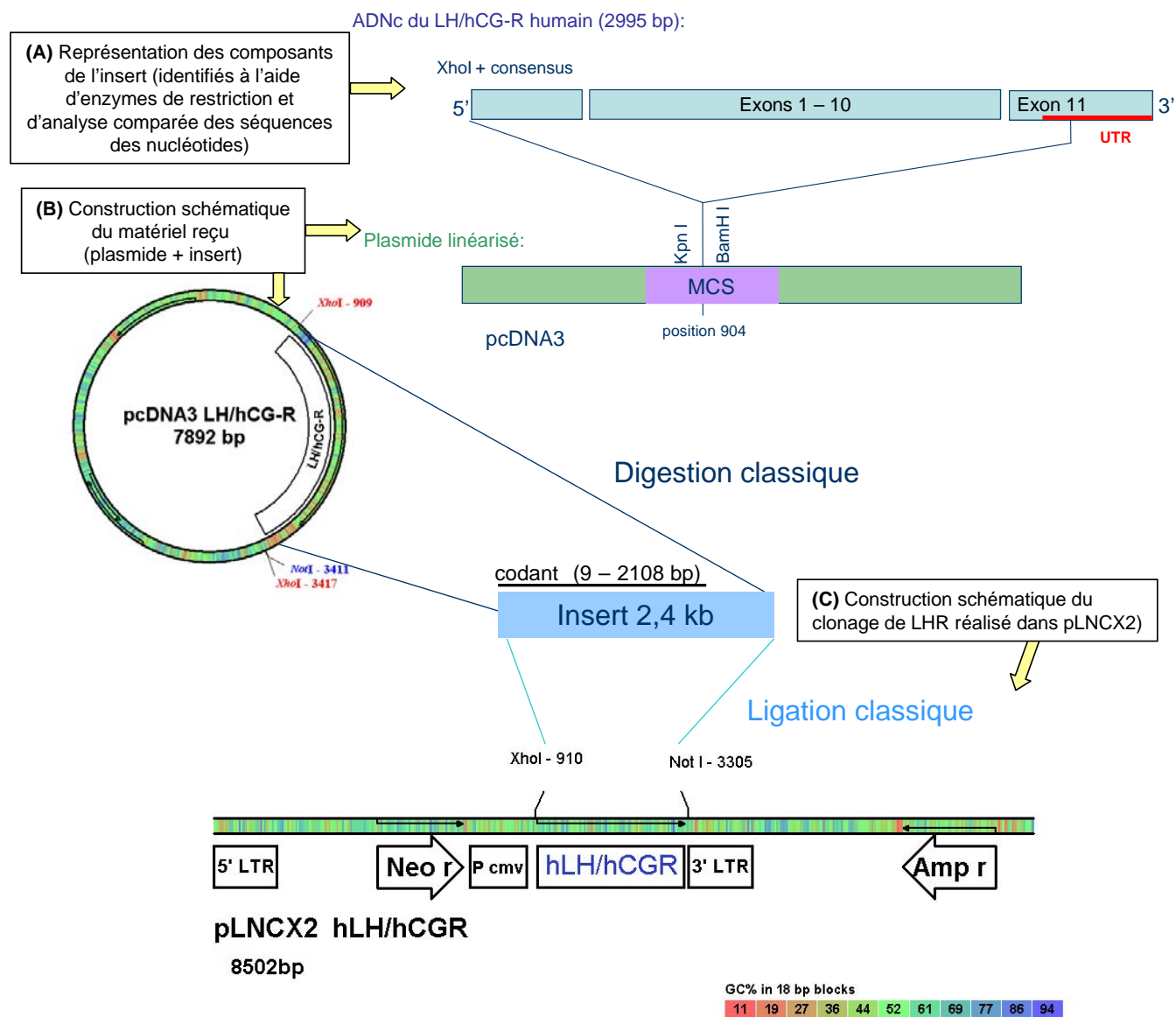


Figure 21. Schéma résumé de l'approche moléculaire utilisé pour obtention d'un rétrovirus codant le gène du récepteur de la LH/hCG. Les étapes indiquées par A,B,C ont été réalisées permettant de comprendre l'organisation structurale du gène d'intérêt obtenu afin de planifier les procédures nécessaires au clonage dans le vecteur rétrovirale pLNCX2.

La manifestation clinique de cette maladie a été démontrée en détail dans peu de cas; la preuve de l'expression aberrante du LHR comme anomalie moléculaire associée a été encore plus rarement démontrée. Dans la grande majorité des cas, c'est la réponse clinique aux tests de stimulation de la sécrétion du cortisol qui a établi le diagnostic, sans confirmation par des analyses *in vitro*.

Un nombre important de cas de réponse surrénalienne anormale à la LH n'était pas lié à un tableau de syndrome de Cushing, mais plutôt à un syndrome virilisant. Ceux-ci étaient associés à la présence d'un adénome surrénalien unilatéral. Parmi les cas décrits d'hyperplasie surrénalienne macronodulaire responsive à la LH, de l'étude des cas dans la littérature révèle une association très fréquente de l'expression multiple de récepteurs aberrants. Ainsi, l'expression du LHR a été associée à celle du récepteur de la 5HT₄ (5 cas), aux récepteurs de la 5HT₄ et de la vasopressine (2 cas), et au GIPR (2 cas), mais jamais le LHR seul.

Par conséquent, dans ce travail nous avons voulu savoir si l'expression anormale du gène du récepteur de la LH isolé serait capable d'induire la transformation tumorale cortico-surrénalienne, sans l'associer avec d'autres gènes. Nous avons aussi exploré la possibilité de obtenir des souris transplantées exhibant des altérations phénotypiques compatibles avec la situation clinique chez l'homme, due à une stimulation surrénalienne anormale via ce récepteur.

Article II

(Article soumis à publication)

Anomalous expression of the single human luteinizing hormone receptor
by adrenocortical cells induces *in vivo* hyperplasia
and Cushing's syndrome features.

Tânia L. Mazzuco^{1,2}, Olivier Chabre^{1,2}, Jean-Jacques¹ Feige & Michaël Thomas¹.

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Equipe Mixte 105, Département
Réponse et Dynamique Cellulaires, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble, France.

Service d'Endocrinologie, Département de Diabétologie Urologie Néphrologie
Endocrinologie (DUNE), Centre Hospitalier Universitaire A. Michallon, Grenoble, France.

Keywords :

LH/hCG receptor ; hypercortisolism ; adrenal tumorigenesis ; hyperplasia;
xenotransplantation

Short title :

Single LHR expression induces adrenocortical hyperplasia.

INTRODUCTION

Adrenal Cushing's syndrome (CS) can be secondary to benign adrenocortical tumors in which the cortisol secretion regulation is mediated by anomalous expression of membrane receptors for gastric inhibitory peptide (GIP), vasopressin, luteinizing hormone/human chorionic gonadotrofin (LH/hCG), catecholamines, serotonin (5-HT), interleukin-I or leptin (1). The pathophysiology of some receptors in cortisol hypersecretion is now established. For example, the ectopic GIPR expression leads to the food-dependent CS mediated by GIP secretion (2), or the LH receptor (LHR) overexpression induces a CS developed during pregnancy and after menopause, mediated by elevated levels of hCG and LH respectively. Their role in adrenal tumor formation was unclear until the recent demonstration that GIPR ectopic expression could be an early event in the initiation of benign tumors (3).

In normal adrenal cortex, adrenocorticotropin (ACTH) regulates both cortisol secretion and trophicity, acting mainly through the activation of the ACTH receptor (MC2R), a G protein-coupled receptor (GPCR) that activates adenylyl cyclase (AC) (4). Glucocorticoids exert a feedback inhibition on corticotrophin-releasing hormone, ACTH and cortisol. Ectopic adrenal expression of another GPCR, the GIPR, can be coupled to steroidogenesis without the naturally occurring cortisol-mediated feedback control and induces formation of an adrenal adenoma-like tissue (3). The role of GIPR expression on adrenal tumorigenesis raises the possibility that the expression of other receptors linked to atypical cortisol secretion in adrenal Cushing's syndrome could induce adrenal tumors.

The LH/CG-R gene encodes the receptor for both luteinizing hormone and choriogonadotropin. This receptor belongs to the structurally unique glycoprotein hormone receptor subfamily of the GPCRs and plays a crucial role in the development of the gonads in both sexes and ovulation in females (5). There is current evidence that the LHR may be present in extra-gonadal tissues. This receptor was detected in human uterus, skin, prostate, breast, adrenal, thyroid and neuroendocrine cells (6-9), but its physiological role is rather subtle or absent (5). In adrenal cortex, it was shown that human tissues normally express the LHR gene in the zona reticularis and stimulates the production of dehydroepiandrosterone sulfate by the fetal adrenal gland early in gestation (10, 11). The most definitive evidence for the extra-gonadal expression of the functional LH/CG-R comes from studies carried out on a post-menopausal woman with a CS and bilateral ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH). The aberrant function of LH/CG-R in adrenal cortex was identified

because she developed a transient CS during her pregnancies and persistent CS several years after menopause (12). Thereafter, the overexpression of LH/CG-R has been identified in *in vitro* studies of adrenal macronodular hyperplasia, adenoma and carcinoma that secreted steroids (13-16). The vast majority of the LH/hCG dependent CS cases reported so far show an aberrant co-expression of several GPCR: LH/CG-R and 5-HT4 receptor in five AIMAH (12, 17, 18); LH/CG-R and GIPR in 2 AIMAH (19) and LH/CG-R, 5-HT4 receptor and AVP receptor in 2 AIMAH (20). The expression of at least two GPCRs made it difficult to draw any conclusions on the relative importance of either receptors or a possible GPCR cooperation on the development of this disease.

In the present experiments, we continued the approach using cell transplantation techniques for investigating the phenotypes of individual genes in the context of transplant tissues in a host animal. Here we show that cells transduced with a retrovirus encoding the LH/CG-R were able to induce phenotypic changes that form adrenal hyperplasia with overt Cushing's syndrome features in a recipient animal.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid construction and retroviral particles production

The plasmid pcDNA3 containing the hLH/CG-R complementary DNA (cDNA) inserted between KpnI and BamHI restriction sites (a generous gift from P. Rodien, University of Angers, France) was used to subclone the gene in a retroviral plasmid. This cDNA originated from a fragment of the human transcription sequence of the most prevalent LH/CG-R allelic variant (21) with a XhoI site and a consensus sequence added in the 5' flank (22), not sequenced at 3' flank after pcDNA3 insertion. By comparative analysis of restriction enzyme digestions, the fragment sequence was identified as a 2.4 kilobases (kb) portion of the entire transcription sequence of human LH/CG-R gene (Accession number NM_000233), consisting of the first 10 exons and the last exon 11 without a 3'UTR fragment of approximately 500 bp. The pcDNA3 hLH/CG-R was then digested with XhoI and NotI and the resulting 2.4 kb fragment was subcloned in a Moloney mouse leukemia virus-derived vector pLNCX2 (Clontech), downstream of its immediate early CMV promoter. pLNCX2 hLH/CG-R and corresponding empty retroviral vectors were used to singularly transfect the amphotropic packaging cell line PT67 (Clontech). Transfection was performed by the LipofectAMINE

transfection reagent (Invitrogen Life Technologies), according to instructions of the manufacturer. The cells underwent selection with 400 µg/ml G418 for 10 days. Then, the viral supernatant was collected and filtered through a 0.45 µm syringe filter to obtain cell-free viruses for adrenocortical cell infection.

Culture of bovine adrenocortical cells and retroviral transduction

Primary adrenocortical cells were prepared by careful dissection and enzymatic digestion of adrenal glands from 2 year-old steers, as previously described (23). Primary cell suspensions were stored frozen in liquid nitrogen. Frozen cells were thawed and replated in Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F-12 1:1 with 10% fetal calf serum, 10% horse serum and 1% (vol/vol) UltroSer G (Bioppra). Cultures were incubated at 37°C in a moist 5% CO₂-95% air atmosphere. The medium was changed every 2 days after plating. Reaching 60 – 70% confluence, adrenocortical cells were infected by adding the filtered retroviral supernatant at a ratio of 1:1 with fresh culture medium, for 6 hours. Infected cells were selected with G418 for at least 7 days to obtain stable cell lines and 1-2 passages were required depending on cell confluence. Transductions of the pLNCX2 hLH/CG-R construction or the pLNCX2 vector without insert generated LHR cells or control cells respectively. Non modified primary adrenocortical cells were used in some experiences to compare with the control cells (transduced with the empty pLNCX2 vector) in order to exclude any changes due to the infection procedure.

Immunocytochemical study

The monoclonal antibody LHR 29 (a generous gift from G. Méduri, Hôpital Bicêtre, France) raised against the human LH receptor was used for immunocytochemistry. The specificity of this antibody has been previously verified by immunohistochemical studies (7). Transduced LHR adrenocortical cells were cultured in Labtek chambers glass slide (Nalge Nunc) until approximately 70 % confluence and then fixed with acetone (10 min at -20°C). The primary antibody LHR 29 was used at a concentration of 2.5 µg/mL, incubated overnight at 4°C. A biotinylated goat anti-mouse (Dako) was used as secondary antibody (60 min at room temperature) and visualized using horseradish peroxidase (ABCComplex, Dako) according to the manufacturer's instructions. After color development, the sections were lightly counterstained with hematoxylin. Images were captured on a Zeiss microscope equipped with a camera interfaced with Axiovision Image Analysis software.

Functional characterization of LHR transduced cells

To test cyclic AMP production and cortisol secretion of control and LHR transduced cells, 2 h incubation with the agonists 10 nM ACTH (1-24) (Neosystem) and 10 IU/mL hCG (Sigma) or fresh medium was performed on cultured cells. Determination of cAMP levels was performed in presence of 1mmol/l IBMX. Homogenized cells were centrifuged; the supernatant was collected to measure cAMP concentration using a cAMP ELISA kit (Neogen) and cell pellets were used for a Bio-Rad Bradford total protein assay in order to estimate cell number. In another set of experiments using the same agonists, culture medium was collected to determine cortisol production by radioimmunoassay (RIA) using cortisol antiserum (Endocrine Sciences) and cells were harvested for cell number estimation by measuring protein concentration.

Transplantation of cells in RAG2 -/- mice

Immunodeficient mice used for transplantation were deficient for the recombination activating gene (RAG2 -/-), originally purchased from CDTA (France). Animals were maintained in an animal facility as a breeding colony, housed under controlled temperature and 12h light-dark cycle conditions with regular unrestricted diet. All procedures were approved by the institutional guidelines and the European Community for the Use of Experimental Animals. Under tribromoethanol anesthesia, 10 weeks old mice (~22 g body weight) were adrenalectomized and received transplants of adrenocortical cells in the same surgical procedure, as previously described (24). Some mice were also bilaterally ovariectomized. Control or LHR adrenocortical cells (2×10^6) were then introduced into subrenal capsule space, together with 4×10^5 FGF-secreting 3T3 cells treated with 2 μ g/ml mitomycin C (Sigma) to prevent further cell division. Post-operative care for animals consisted of an analgesic and antibiotics mixture administrated in the drinking water for 7 days.

In vivo experimentation and monitoring

After transplantation, mice were weighed daily during the first week and weekly afterwards. From week 5, tail blood samples were taken under anaesthesia at basal time and 15 min after the injection of ACTH (1-39) (Neosystem, 42 pmol/g body weight) or hCG (Sigma, 0.5 IU/g body weight) as stimulation test. At basal time, plasma ACTH and LH concentrations were measured by immunoradiometric assay (IRMA, Nichols Institute Diagnostics) and

enzymeimmunoassay (Biotrak EIA System, Amersham Biosciences) respectively. Cortisol values were determined directly on plasma samples by RIA as described above. Blood glucose values were determined from whole blood at basal time using an automatic glucose monitor (Accu-Chek Active, Roche). Blood samples were collected in the afternoon, during physiological fast period that matches nadir of cortisol level.

Morphological studies

Animals were sacrificed at various times up to 50 days after transplantation and subjected to necropsy. Kidney bearing the adrenocortical transplant was excised for macro and microscopy analysis. Pictures showing kidney tissue and transplant gross morphology were taken with a Canon PowerShot S50 digital camera through a Leica MZ6 modular stereomicroscope. In addition, representative pieces of dorsal skin, quadriceps muscle (proximal segment), spleen and liver were excised. The tissue formed from bovine adrenocortical cells lying on the mouse renal surface (control transplants, n = 5; LHR transplants, n = 7) and all pieces of organs were fixed in 4 % paraformaldehyde and paraffin-embedded using standard techniques. Sections 6µm thick were prepared with a microtome and stained with hematoxylin and eosin for microscopic analysis. Immunohistochemistry was performed using the monoclonal antibody MIB-1 that recognizes the proliferation-associated Ki-67 antigen in bovine transplanted cells but does not react with mouse Ki-67. Incubation with biotin-conjugated secondary antibody was performed as required with detection using avidin-biotin-peroxidase complex and DAB (Dako) followed by hematoxylin counterstaining.

The number of Ki-67-positive cells per 100 adrenocortical cells was designated as the labelling index. Counting was performed manually, using two non consecutive tissue sections per tissue sample, selected at random, n= 5 sections of each group (control mice and LHR mice). Overall comparison was performed with graphic statistical summary and student's *t*-test. All images were captured on a Zeiss microscope equipped with a camera interfaced with Axiovision Image Analysis software.

RESULTS

Functional expression of LHR gene in bovine adrenocortical cells

The human LHR cDNA was subcloned in a retroviral vector and transduced in bovine adrenocortical cells. After LHR stable infection, cells were cultured for several days including 2 cell passages. The expression of the human luteinizing receptor in bovine adrenocortical cells was confirmed by immunocytochemistry using the monoclonal antibody LHR 29 (Fig. 1A). The specific brown cytoplasmic staining was absent in negative control provided by omitting the primary antibody (Fig. 1B). Cultured transduced cells did not show phenotypic changes *in vitro* due to retroviral infection as compared to primary cells and control cells (transduced with empty vector conferring an antibiotic resistance) (results not shown).

As the main signalling pathway activated by the eutopic LHR on Leydig and granulosa cells is the Gs/AC/cAMP/PKA pathway (5), we sought verify if the transduced LHR in adrenocortical cells was likewise coupled to this pathway. Thus, we observed that the LHR activation by 10 UI/ml hCG induced a 8 fold elevation of cAMP in LHR cells, but not in control cells (Fig. 1C). Upon 10 nM ACTH stimulation, both adrenocortical cells types showed elevated cAMP production (Fig. 1C). In adrenocortical cells, the activation of Gs/AC/cAMP/PKA pathway leads to the phosphorylation of proteins that regulate steroids biosynthesis and, ultimately to a rise of cortisol secretion. We then measured the cortisol production in transduced cells subjected to similar treatments (no agonist, 10 nM ACTH or 10 UI/ml hCG). Adrenocortical cortisol synthesis mediated by ACTH treatment was confirmed in both control and LHR cells (Fig. 1D). By contrast, only LHR cells responded to the hCG treatment with an approximately 2.5 fold elevation of the cortisol concentration in the culture medium. In summary, LHR transduced adrenocortical cells but not control cells display functional luteinizing hormone receptors coupled to steroid synthesis.

LHR cells transplantation induces Cushing's syndrome phenotype

To study the phenotype of LHR cells in an *in vivo* environment we transplanted the bovine adrenocortical cells into adrenalectomized immunodeficient mice, by injection of control or LHR cells beneath the kidney capsule. Some mice were also ovariectomized (OVX) at the time of cell transplantation. Following surgery, no steroid hormone replacement was used. All animals that received transplants of control or LHR cells survived following surgery, until they were sacrificed at 45 – 50 days. Transplanted animals had measurable

levels of cortisol in plasma. Because bovine adrenocortical cells secrete cortisol rather than corticosterone, the major glucocorticoid in mice, the appearance of cortisol in plasma is a useful indicator of the successful development of functional tissue from the transplanted cells. Blood plasma samples taken in the afternoon after 7 weeks of transplantation was used to measure basal cortisol concentration. There was no difference between OVX and non-OVX LHR mice, with mean plasma cortisol levels of 15.7 ± 5 (n = 4) and 25.4 ± 9.7 ng/mL (n = 3), respectively. Bilateral ovariectomy did not induce significant differences in plasma LH levels of OVX and non-OVX LHR mice at 7 weeks post-surgery (17.9 ± 4.3 and 12.9 ± 2.2 ng/mL, respectively; $P = 0.11$). Therefore, both OVX and non-OVX LHR mice were pooled in the same group (LHR mice) as presented in the figure 2. Basal plasma cortisol levels were statistically higher in LHR mice than in control mice ($P = 0.017$) (Fig. 2A). Mean plasma ACTH concentration in LHR mice was inhibited by 68 % in comparison with control mice ACTH concentration, which is consistent with the observed hypercortisolism (Fig. 2A). When stimulation tests were performed, both control and LHR mice responded to the ACTH administration by increasing cortisol secretion (Fig. 2B). Injection of hCG had no effect on control mice cortisol levels, but significantly raised cortisol synthesis in the LHR mice ($P = 0.034$) (Fig. 2B).

Since hypercortisolism may result in glucose metabolism abnormalities, we performed blood glucose tests during physiological fasting period of mice after 35 days of transplantation. All LHR mice displayed moderate hyperglycemia as compared to control mice (blood glucose mean of 10.5 ± 2.2 vs 5.9 ± 1.2 mmol/L, $P = 0.0005$) (Fig 3A).

Body weight progression was surveyed from the time of cell transplantation until sacrifice. As surgery was performed after reaching adult age, mice transplanted with control adrenocortical cells exhibited a slight growth, as indicated by linear regression of weight gain (Fig. 3B). Control mice (male and female) were age matched. Whereas female are smaller than male, both present the same percentage of weight gain in adulthood. As expected, control mice did not present significant gender difference in ponderal progression (results not shown). The mice transplanted with LHR cells were not obese. Post-transplantation body weight evolution in LHR mice revealed significant weight loss few days before the time of sacrifice, if compared to control mice ($P < 0.001$) (Fig. 3B). Hypercortisolism-related catabolic changes in LHR mice might explain this weight lost. Hence, no alterations in distribution of body fat such as buffalo hump or intra-abdominal fat deposits were observed at necropsy. When representative specimens of several organs were histologically analyzed, other

hypercortisolism signs were depicted. These include dermal atrophy, skeletal muscle atrophy and spleen size reduction with loss of normal architecture (Fig. 3C). With the restriction of the liver parenchyma showing normal features (Fig. 3C), all tissues alterations as well as the hyperglycemia and weight loss are characteristic of Cushing's syndrome with catabolic signs.

LHR gene induces the formation of an adrenocortical mass

Following sacrifice, the kidney with transplanted cells were excised and analyzed macroscopically. Transplantation of control cells formed a thin tissue beneath the kidney capsule while transplanted LHR cells developed a prominent yellow mass immediately adjacent the renal cortex (Fig 4A). Microscopically, control adrenocortical cells formed a small tissue contrasting to the voluminous mass formed by LHR cells (Fig 4B). As mentioned, 2×10^6 cells had been initially transplanted in both cases. Control transplants presented a uniform structure of regular eosinophilic adrenocortical cells in close contact with the kidney parenchyma on its lower side and the renal capsule on its upper side. Conversely, LHR transplants had the aspect of a non-encapsulated hypercellular mass constituted by both lipid-laden (fasciculata type) cells and eosinophilic lipid-depleted (reticularis type) cells interspersed with a minimal stroma, without any sign of necrosis. LHR tissues showed an irregular architecture with cellular pleomorphism and some nuclear atypia. The contact between adrenocortical cells and the kidney surface was preserved (Fig 4B).

The proliferation rate of control and LHR cells in the transplant tissues at day 50 following transplantation was assessed by staining for the Ki-67 proliferation-associated protein. Ki-67 is expressed in all phases of the active cell cycle (G1, S, G2 and M phase) and absent in resting (G0) cells. We observed nuclear brown staining in both control (Fig. 5A) and LHR transplants and (Fig. 5B), but proliferative cells were marked more frequently in LHR transplants. The Ki-67 labeling index, which is the number of Ki-67 positive cells per 100 adrenocortical cells, was significantly higher in LHR cells (Fig. 5C) confirming that hyperplasia in adrenocortical LHR tissues was at least due to a growth advantage induced by overexpression of LHR gene.

DISCUSSION

Here we show the development of adrenocortical hyperplasia by the single transduction of the human hLH/CG-R cDNA in primary bovine cells. It was associated with an abnormal cortisol production by stimulation of aberrant LHR, resulting in the development of CS in the transplanted mice.

Adrenal macronodular hyperplasia leading to a Cushing's syndrome mediated by LH or hCG secretion was first described in a patient that have manifested marked Cushing's features during her pregnancies and after menopause (12). Occurrence of Cushing's syndrome under excessive plasmatic concentration of hCG during pregnancy was suggested in other cases (25-27). This condition was believed to be caused by aberrant expression of LHR associated with ligand excess, because *in vivo* inhibition of hypercortisolism was obtained either by pharmacological suppression of LH levels or naturally by post-partum hCG suppression. Clinical studies using hormonal screening tests were speculative without molecular proof of abnormal expression of receptors in the adrenocortical lesions. A recent *in vitro* study of 2 cases of LH-responsive CS demonstrated the presence of LHR mRNA in hyperplastic adrenals with a slightly higher level than in normal adrenal cortex (17). However, only one of these cases presented adrenocortical cells responsiveness to hCG through elevated cortisol secretion. The constitutively expression of the LHR in normal adrenal gland emphasizes the hypothesis that LH-responsive CS may be caused by an up-regulation of the weakly expressed LHR and that a threshold for the LHR expression must be reach to induce hypercortisolism. In our experiments using transduced cultured cells, LHR was efficiently coupled to AC pathway and steroidogenesis, as demonstrated by cAMP and cortisol responses to hCG in LHR cells but not in control cells. Evidence is accumulating on the regulatory effect of LH on adrenal steroidogenesis. In women with the polycystic ovary syndrome, elevated LH levels correlate with increased adrenal androgen synthesis (28). In bLH β -CTP transgenic mice model with elevated serum LH, it has been shown that the mice developed polycystic ovaries, ovarian tumors and hyperplastic adrenal glands with increased corticosterone levels (29). Elevated LH concentrations seem to be an absolute requirement for the detection of LHR mRNA and protein. However, gonadectomy of nontransgenic mice did not result in increased corticosterone production while ovariectomized mice expressing the transgene has a cortisol level similar to the nontransgenic mice and no adrenal response to hCG was found *in vitro*. To explain their results, the authors suggested that estrogens,

produced by the polycystic ovaries, increased prolactin secretion which in turn induce LHR expression.

Such particular form of CS is not manifested exclusively during pregnancies or after menopause. Abnormal elevation of plasma cortisol in response to hCG or GnRH tests can be detected even in cases of incidentally discovered adrenal masses, asserting a LH-responsive subclinical CS (20). Even if LHR can be expressed by normal adrenocortical cells, it did not stimulate the secretion of steroids in adult human adrenal cortex (10, 30). Likewise in the herein results, mice transplanted with control adrenocortical cells did not show any plasma cortisol elevation after hCG injection.

In our animal model, a hyperplastic adrenocortical tissue was formed in absence of high levels of plasma LH or hCG. Ovariectomized transplanted mice did not exhibit increased plasma LH at the time they were sacrificed (50 days after cell transplantation). In fact, some studies have reported that a significant elevation of LH plasma levels occurred only 3 to 6 months after ovariectomy in mice (29, 31, 32). The hyperplastic adrenal transplant resulting of the LHR expression does not require supra-physiological levels of LH for its development. This substantiates evidence for a direct role of abnormal of LHR gene expression in the development of AIMAH in LH-responsive CS, independently of pregnancy or menopause states. Human adrenal glands overexpressing LHR, diagnosed by response to clinical tests can provoke only a subclinical or mild hypercortisolism because LH is present at basal and cyclical plasmatic levels and might stimulate its own receptor. Therefore, pregnancy- and menopause-dependent CS is more probably manifested by a severe hypercortisolism, since LHR expression is associated with excess of ligand. To evaluate this hypothesis, experiments will be performed using our model to test the effects of a LHR cells in long-time ovariectomized mice.

This work allowed us to answer a question regarding the need of GPCR cooperation on the development of LH-dependent AIMAH. The aberrant co-expression of LHR with other GPCR (5-HT₄, AVP or GIPR receptor) is observed in a majority of described cases (12, 17-20). The use of cell transplantation techniques allows us to study the phenotypes of individual genes in a context of transplant tissues in a host animal. By transducing the LHR gene in adrenocortical cells and performing cell transplantation, we could observe its role on tumorigenesis. The single transduction of LHR gene leads to the development of a highly proliferative mass exhibiting histopathological features of adrenocortical hyperplasia without gene association and lets us envision its crucial role in adrenal tumorigenesis. Moreover,

transplanted LHR mice exhibited several features mimicking a LH-responsive CS (thin skin, muscle atrophy...) and abnormal plasma cortisol response to hCG injection which is a test used to clinical diagnoses confirmation of CS secondary to aberrant receptor expression.

Implication of LHR expression in the process of adrenocortical neoplasia was suggested in specific strain of mice, in response to continuous gonadotropin stimulation (32). Six months after ovariectomy, these mice had high plasma LH levels and developed adrenocortical lesions. This confirms the particular phenomenon of gonadotropin-induced tumorigenesis in different rodent models, as described in the past (33), but it cannot be exactly applied to the human LH-dependent Cushing's syndrome, because it is rather due to the genetic background of the strain of mice used.

Human adrenocortical tumors expressing higher levels of LHR tended to exhibit lower levels of GATA-4, a transcription factor that promote cell proliferation in ovarian granulosa cells (34). According to this observation, it was demonstrated a prevalent expression of LHR at variable degrees on adrenocortical tumors, allowing to calculate a minimal threshold of LHR expression level to be correlated with benignity (35). GATA-4 expression may be investigated in our adrenocortical transplants as soon as bovine sequences will be available.

In conclusion, the single transduction of the human LH/CG-R gene in bovine adrenocortical cells induces adrenal hyperplasia formation in an *in vivo* environment, being an early event in adrenal tumorigenesis. Moreover, the formed tissue has elevated growth rate and hCG-responsive steroidogenesis. Finally, the transgenic LHR tissues recapitulate hypercortisolism features (Cushing's syndrome) even at LH basal levels in an adult animal as occurring in the majority of naturally developing human tumors. This animal model of Cushing's syndrome due to abnormal LHR expression will allow us to study the long-term progression of this disease in experimental conditions and to assess therapeutical alternatives.

References

1. **Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J** 2004 Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 15:375-82
2. **Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, et al.** 1992 Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 327:974-80.
3. **Mazzuco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M** 2004 Démonstration du potentiel transformant du gène du récepteur du GIP dans les cellules du cortex surrénalien: un pas vers l'étiologie du syndrome de Cushing lié à l'alimentation. *Ann Endocrinol-Paris* 65:267
4. **Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD** 1992 The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 257:1248-51
5. **Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL** 2002 The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23:141-74
6. **Frazier AL, Robbins LS, Stork PJ, Sprengel R, Segaloff DL, Cone RD** 1990 Isolation of TSH and LH/CG receptor cDNAs from human thyroid: regulation by tissue specific splicing. *Mol Endocrinol* 4:1264-76
7. **Meduri G, Charnaux N, Loosfelt H, et al.** 1997 Luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in breast cancer. *Cancer Res* 57:857-64
8. **Rao CV** 1996 The beginning of a new era in reproductive biology and medicine: expression of low levels of functional luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in nongonadal tissues. *J Physiol Pharmacol* 47(Suppl 1):41-53
9. **Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL** 1990 The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70:421-30
10. **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* 81:2397-400
11. **Seron-Ferre M, Lawrence CC, Jaffe RB** 1978 Role of hCG in regulation of the fetal zone of the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 46:834-7
12. **Lacroix A, Hamet P, Boutin JM** 1999 Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone--dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 341:1577-81
13. **Matsukura S, Kakita T, Sueoka S, et al.** 1980 Multiple hormone receptors in the adenylate cyclase of human adrenocortical tumors. *Cancer Res* 40:3768-71
14. **Goodarzi MO, Dawson DW, Li X, et al.** 2003 Virilization in bilateral macronodular adrenal hyperplasia controlled by luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 88:73-7
15. **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)* 34:31-5
16. **Wy LA, Carlson HE, Kane P, Li X, Lei ZM, Rao CV** 2002 Pregnancy-associated Cushing's syndrome secondary to a luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor-positive adrenal carcinoma. *Gynecol Endocrinol* 16:413-7
17. **Feelders RA, Lamberts SW, Hofland LJ, et al.** 2003 Luteinizing hormone (LH)-responsive Cushing's syndrome: the demonstration of LH receptor messenger

- ribonucleic acid in hyperplastic adrenal cells, which respond to chorionic gonadotropin and serotonin agonists in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 88:230-7
18. **Cartier D, Lihmann I, Parmentier F, et al.** 2003 Overexpression of serotonin₄ receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:248-54
 19. **Bertherat J, Contesse V, Louiset E, et al.** 2004 In Vivo and in Vitro Screening for Illegitimate Receptors in ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH) Causing Cushing's Syndrome: Identification of Two Cases of Gonadotropin/Gastric Inhibitory Polypeptide-Dependent Hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* Dec 7; [Epub ahead of print]
 20. **Bourdeau I, D'Amour P, Hamet P, Boutin JM, Lacroix A** 2001 Aberrant membrane hormone receptors in incidentally discovered bilateral macronodular adrenal hyperplasia with subclinical Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86:5534-40.
 21. **Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, et al.** 1990 Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 172:1049-54
 22. **Rodien P, Cetani F, Costagliola S, et al.** 1998 Evidences for an allelic variant of the human LC/CG receptor rather than a gene duplication: functional comparison of wild-type and variant receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4431-4
 23. **Duperray A, Chambaz EM** 1980 Effect of prostaglandin E1 and ACTH on proliferation and steroidogenic activity of bovine adreno-cortical cells in primary culture. *J Steroid Biochem* 13:1359-64
 24. **Thomas M, Northrup SR, Hornsby PJ** 1997 Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med* 3:978-83.
 25. **Wallace C, Toth EL, Lewanczuk RZ, Siminoski K** 1996 Pregnancy-induced Cushing's syndrome in multiple pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 81:15-21
 26. **Sheeler LR** 1994 Cushing's syndrome and pregnancy. *Endocrinol Metab Clin North Am* 23:619-27
 27. **Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P** 2001 Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 22:75-110
 28. **Franks S** 1995 Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 333:853-61
 29. **Kero J, Poutanen M, Zhang FP, et al.** 2000 Elevated luteinizing hormone induces expression of its receptor and promotes steroidogenesis in the adrenal cortex. *J Clin Invest* 105:633-41
 30. **Piltonen T, Koivunen R, Morin-Papunen L, Ruokonen A, Huhtaniemi IT, Tapanainen JS** 2002 Ovarian and adrenal steroid production: regulatory role of LH/HCG. *Hum Reprod* 17:620-4
 31. **Luo S, Sourla A, Labrie C, et al.** 1998 Effect of twenty-four-week treatment with the antiestrogen EM-800 on estrogen-sensitive parameters in intact and ovariectomized mice. *Endocrinology* 139:2645-56
 32. **Bielinska M, Parviainen H, Porter-Tinge SB, et al.** 2003 Mouse strain susceptibility to gonadectomy-induced adrenocortical tumor formation correlates with the expression of GATA-4 and luteinizing hormone receptor. *Endocrinology* 144:4123-33
 33. **Russfield AB** 1975 Experimental endocrinopathies. *Methods Achiev Exp Pathol* 7:132-48

-
34. **Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, et al.** 1997 Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138:3505-14
 35. **Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ** 2004 Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord* 4:3

Legends of Figures

Figure 1. Demonstration of protein expression and steroidogenesis-coupled function of LH/hCG receptor in genetically modified cells.

A, After transduction with the retroviral construction encoding the LH/hCGR gene, cultured bovine adrenocortical cells (LHR cells) were stained with an antibody against LH receptor. **B**, Control negative-IHC staining of the same cultured cells was performed without primary antibody. **C**, Cultured control and LHR adrenocortical cells were incubated with culture medium alone (basal) or with hCG or ACTH. After 30 min, cAMP levels were measured and cell number estimated by cell protein content determination. Results show mean values \pm s.e.m. of duplicate determinations. **D**, The same conditions described in **C** were applied to both cell types for 2 h. Cortisol secretion was measured and the cell number was determined. Results show mean values \pm s.e.m. of triplicate determinations. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ vs basal level values of the corresponding cell type.

Figure 2. Biochemical features of a Cushing's syndrome secondary to abnormal expression of the LH receptor in the transplant tissues.

A, Basal plasma cortisol and ACTH were measured on the nadir of physiological circadian corticotrope activity in mice with transplanted adrenocortical cells at the time of sacrifice at 50 days. Mice transplanted with adrenocortical cells expressing the LHR (LHR mice) exhibited basal plasma cortisol levels statistically higher than mice transplanted with cells transduced with the empty vector (control mice). *, $P < 0.05$. Plasma ACTH levels were moderately suppressed in the LHR mice; statistical analysis between the two groups of mice indicates a $P = 0.06$. Horizontal lines represent mean values of plasma cortisol and ACTH. **B**, *In vivo* tests were performed in control and LHR mice. Mean relative changes in plasma cortisol levels in response to ACTH (2 pmol/g of weight) or hCG (0.5 IU/ g of weight) i.p. injection vs basal levels. Blood samples were taken at 0 and 15 min after administration of ACTH or hCG. Plasma cortisol elevation after 15 min was calculated and reported as fold of basal (0 min) cortisol levels. *, indicates a statistical difference ($P < 0.05$) between groups of mice treated with hCG.

Figure 3. Clinical features of hypercortisolism on mice transplanted with adrenocortical cells expressing the LH/hCG-R gene.

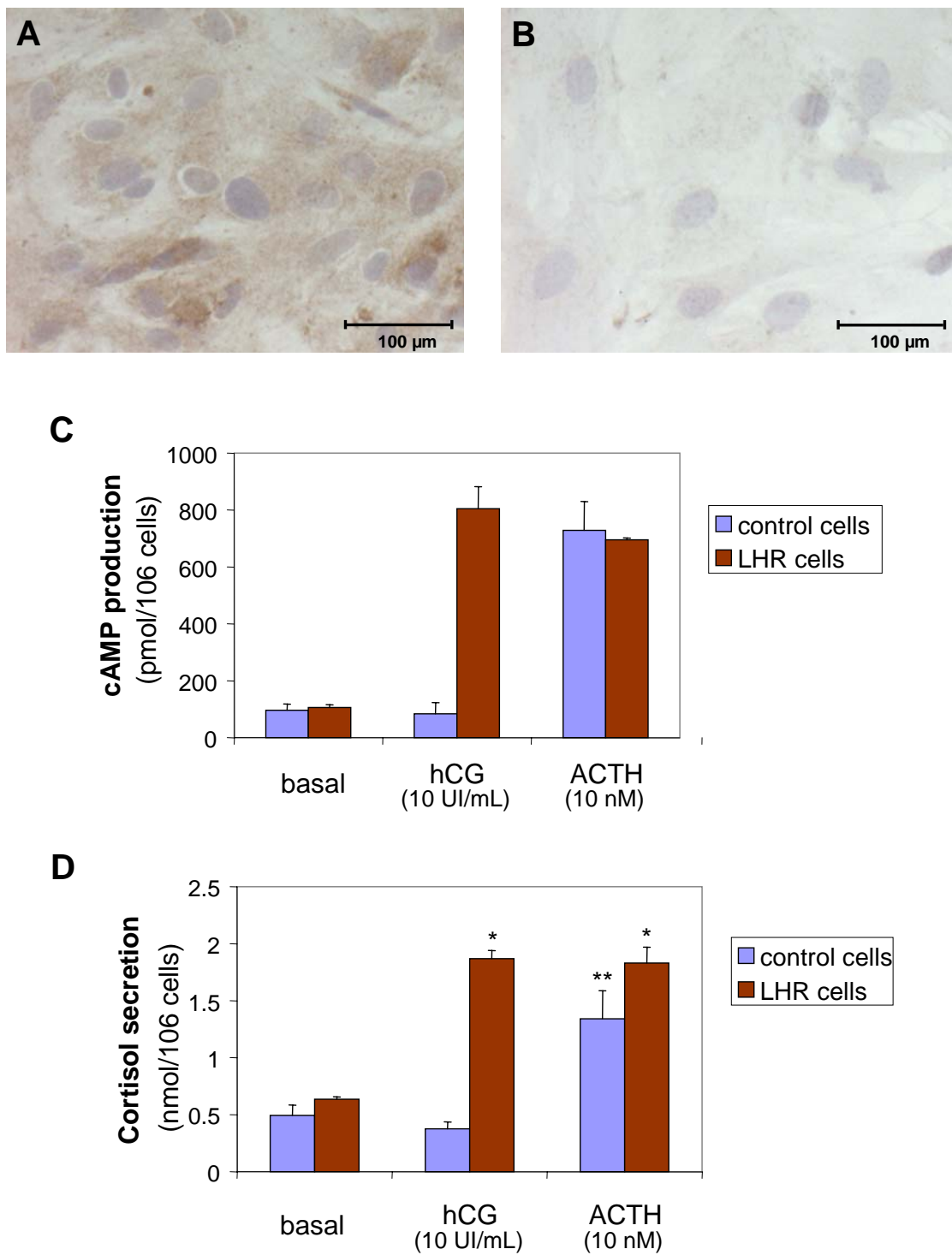
A, Mice blood glucose levels were measured during the rest period, 35 - 50 days after transplantation of control and LHR cells (control mice, $n = 9$; LHR mice, $n = 11$; ***, $P < 0.001$). **B**, Body weight evolution of adult mice was monitored from the day of adrenocortical cell transplantation to week 11. Ponderal progression is represented as a percentage of the weight at the time of surgery. Lines indicate the linear regression of weight percentual variation of each group. **C**, Fifty days after cell transplantation, skin, muscle, spleen and liver were examined for morphological features of hypercortisolism. Hematoxylin and eosin stains of paraffin sections revealed histopathologic alterations in LHR mice. The skin showed a dermal thinning with atrophic collagen fibers as compared to normal skin of control mice. A cross-section of the LHR mice skeletal muscle exhibited myofibers with reduced size, surrounded by enlarged endomysial and perimysial areas. Splenic lymphoid atrophy was observed in LHR mice, as evidenced by spleen red pulp depletion and poorly distinguishable lymphatic nodules in comparison to the normal spleen in control mice. However, liver sections of LHR mice, as represented by the hepatocytes surrounding hepatic central vein, had tissue morphology identical to the control liver. Bars, 300 μm .

Figure 4. Morphology and histology of hyperplastic adrenocortical LHR transplants.

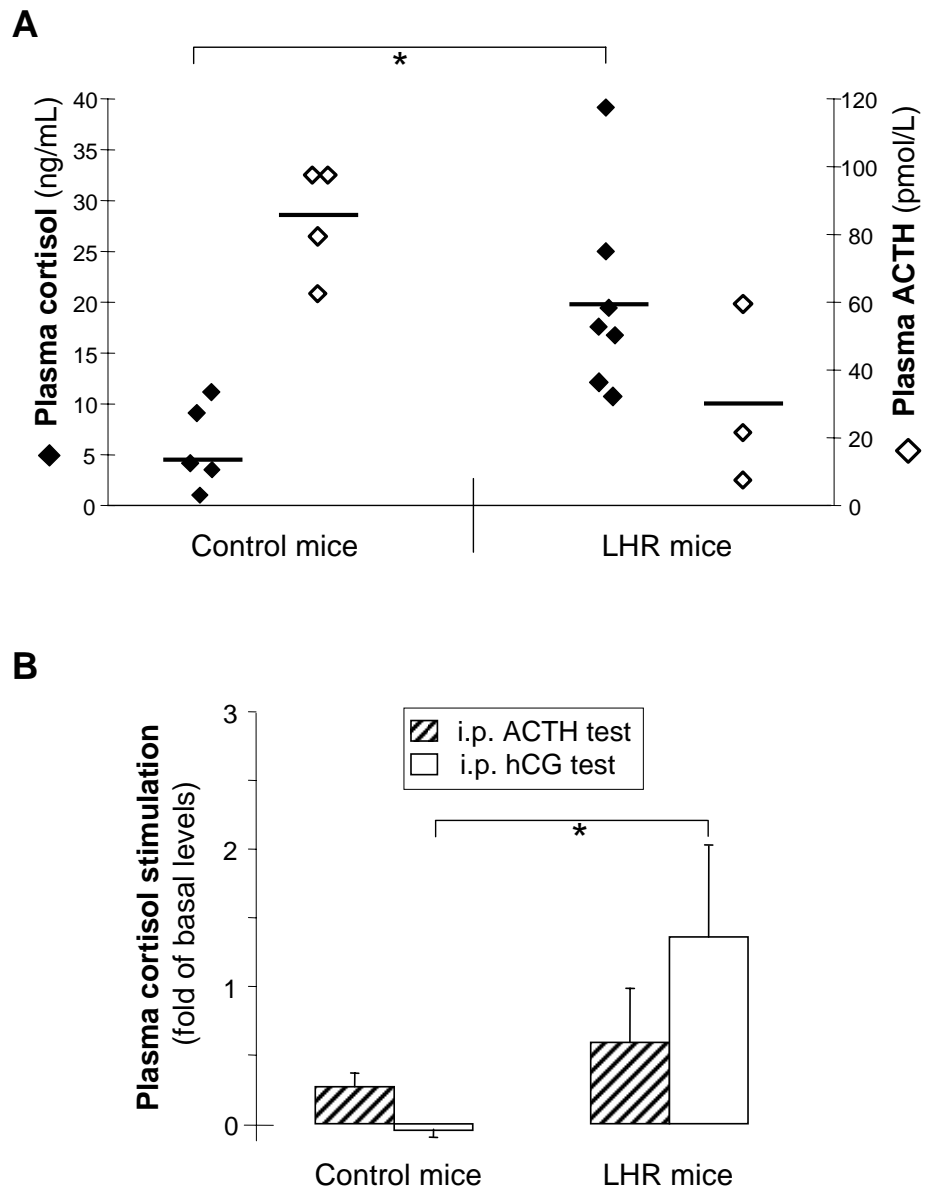
A, At the time of sacrifice, the kidney with the adrenocortical transplant was excised. Figure shows representative tissues obtained from transplantation of control cells or LHR cells beneath the renal capsule, 50 days after cells transplantation. Both control transplant and the LHR transplant were cut transversally as indicated by the dotted line in the top view, showing tissue internal expansion in axial view (arrows). Bars, 5 mm. **B**, Histology of tissues formed from adrenocortical cells, hematoxylin-eosin-stained. Control cells formed a small transplant tissue above the mouse kidney and below the thick renal capsule. Histological examples of three LHR transplants show the hyperplastic tissue formed from bovine adrenocortical cells expressing the human LH/hCG-R gene. Left panels show LHR transplant tissues bounded by the kidney parenchyma on the lower surface and the capsule on the upper surface. Right panels show detailed histology of the inset. Bars, 100 μm . A, adrenocortical tissue; C, renal capsule; K, kidney.

Figure 5. Adrenocortical LHR transplants are highly proliferative.

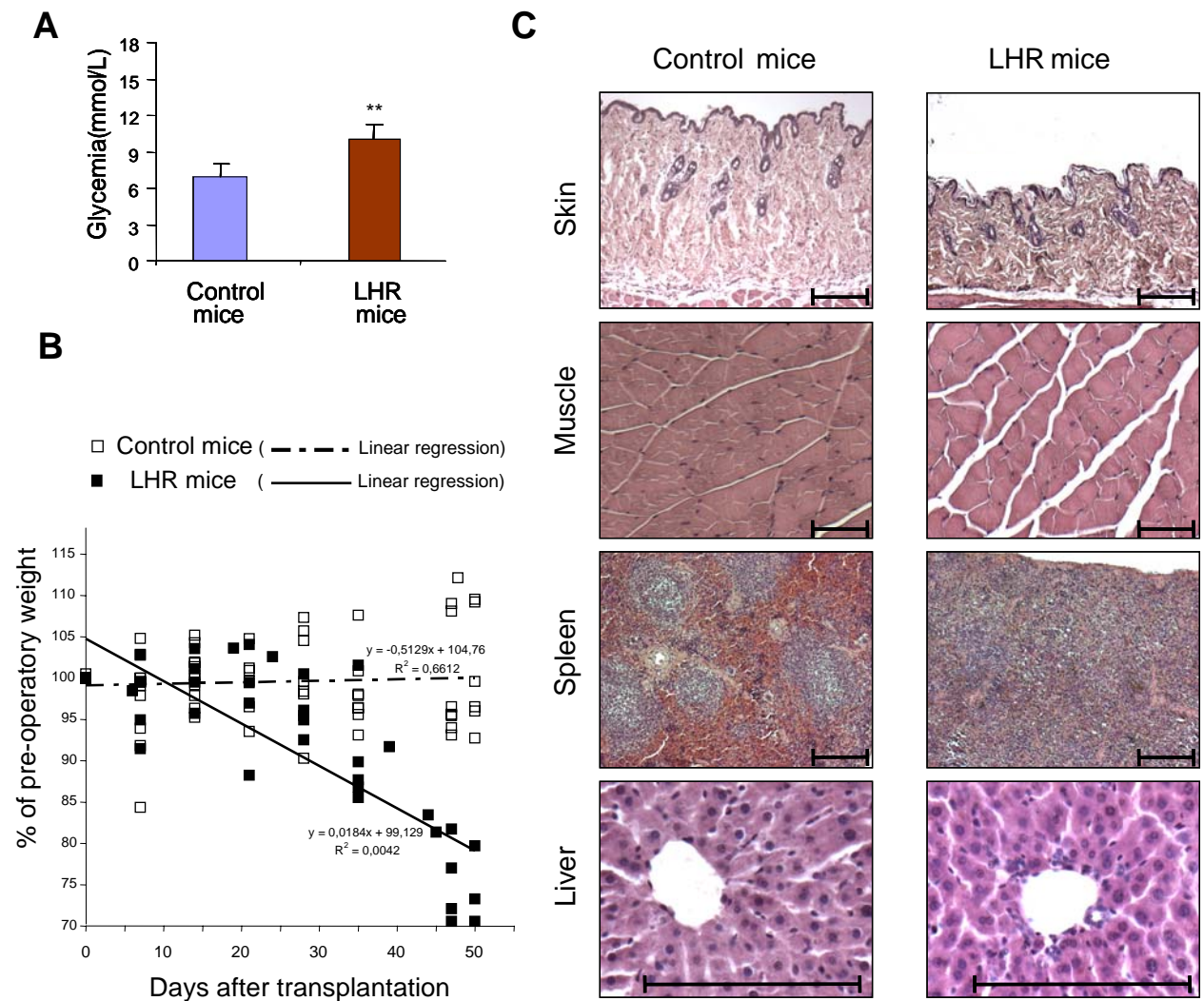
A and **A'**, Representative sections of tissue formed from control cells showing expression of Ki-67 in rare cell nuclei. **B** and **B'**, Representative sections of transplant formed from LHR cells showing many Ki-67 positive cells throughout the tissue. The brown nuclei depicted the Ki-67 antigen expressing cells. Bars, 100 μ m. **A**, adrenocortical tissue; **C**, renal capsule; **K**, kidney. **C**, Comparison of cell proliferation in control and LHR transplants. Labeling index corresponds to the number of Ki67 positive cells per 100 adrenocortical cells.



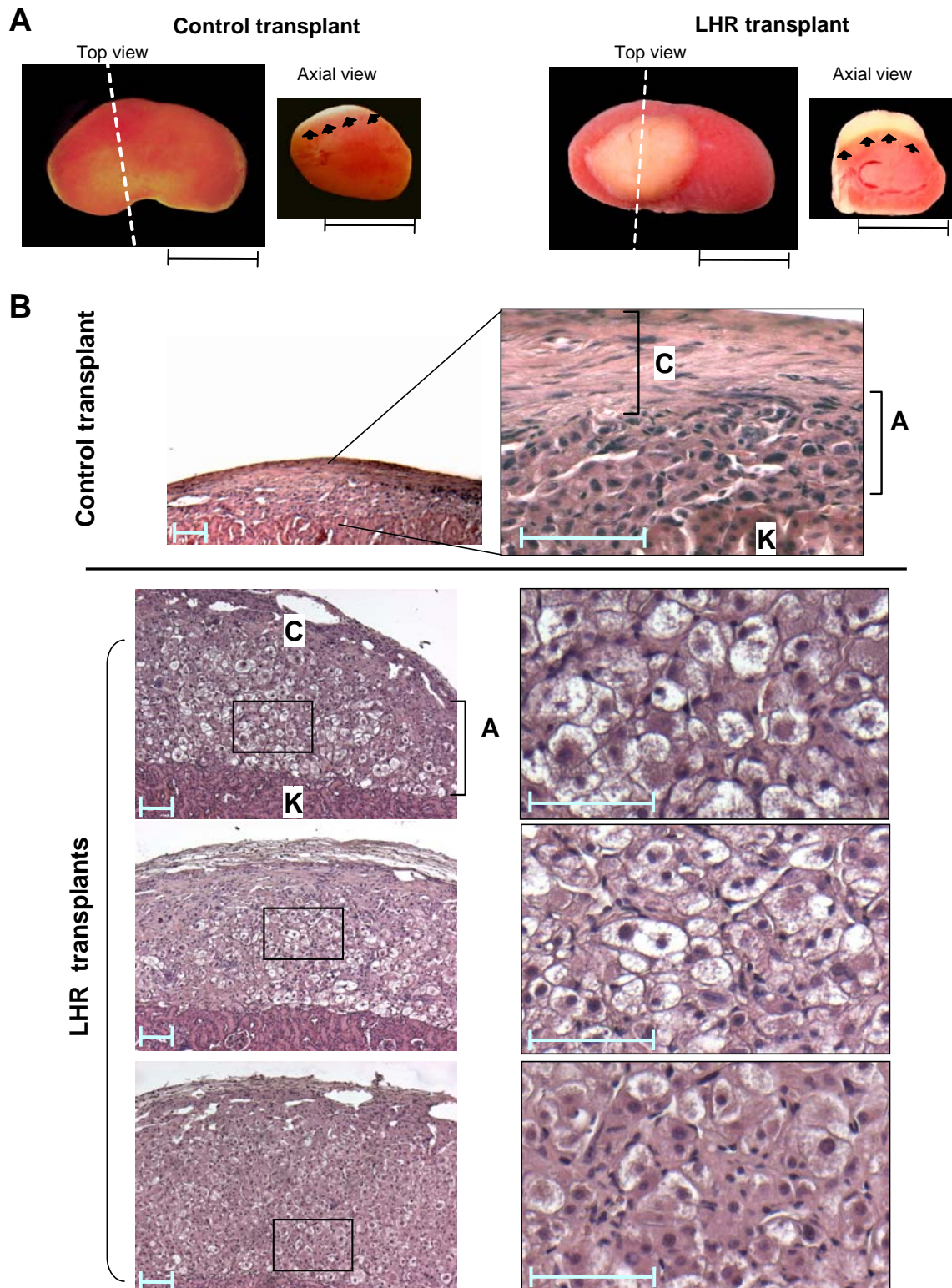
(Fig. 1)



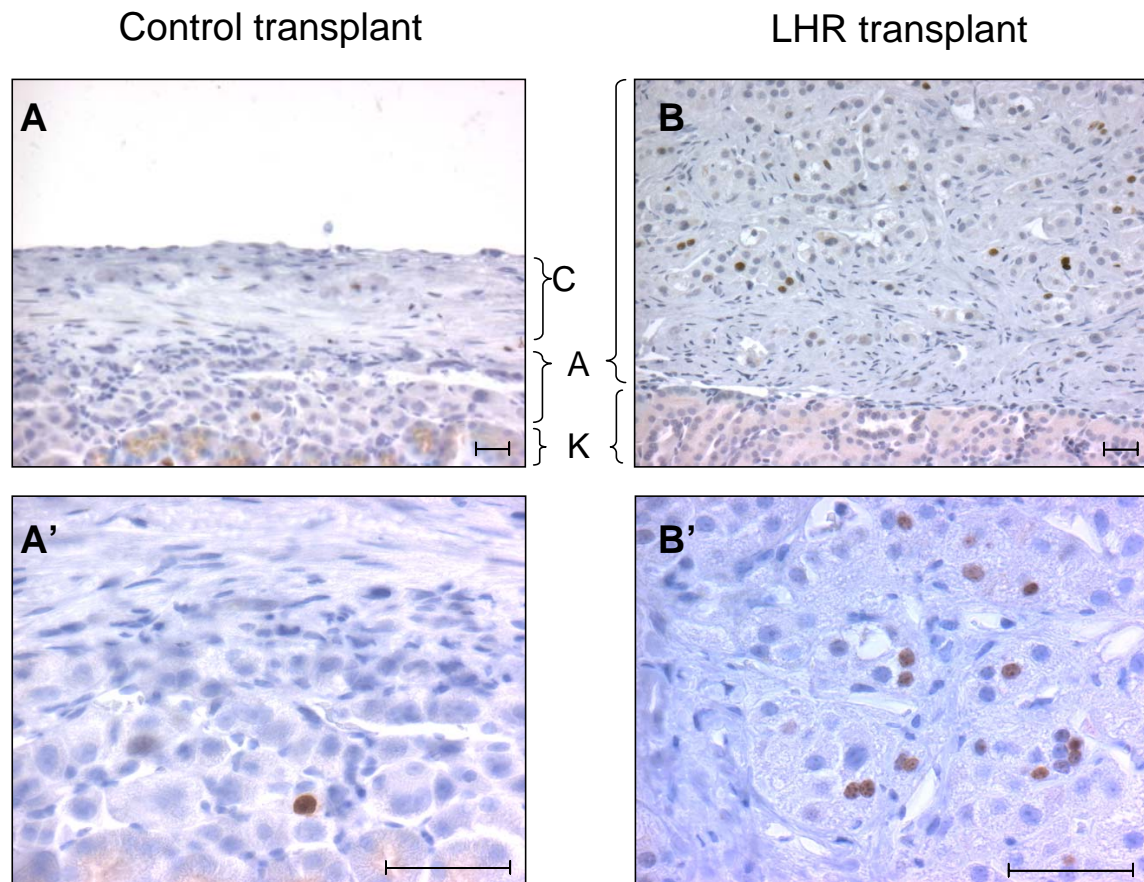
(Fig. 2)



(Fig. 3)



(Fig. 4)



C

Transplants	Ki-67 Labeling Index					n	P
	Arithmetic mean	95% CI for the mean	Lowest value	Highest value	s.e.m.		
Control	3.5	0.57 to 6.34	1.10	6.70	1.04	5	0.002
LHR	13.3	8.24 to 18.40	7.46	17.95	1.83	5	

(Fig. 5)

Discussion

Nous avons démontré, en utilisant un modèle animal, le pouvoir transformant du gène du récepteur de la LH dans le cortex surrénalien. Ce récepteur peut être exprimé dans certaines cellules du cortex, en particulier les réticulées, mais il n'a pas d'effet sur la stéroïdogénèse chez l'adulte, qui est réalisé principalement dans la fasciculée. Ainsi, dans notre travail, des souris transplantées avec des cellules cortico-surréaliennes normales (exprimant juste un gène de sélection antibiotique) ne présentaient pas de réponse anormale du cortisol à la stimulation par la hCG, confirmant les résultats de stimulation cellulaire obtenus *in vitro*. Au contraire, les souris transplantées avec des cellules qui exprimaient le LHR (expression confirmée par des études *in vitro*) ont développé des caractéristiques biologiques et cliniques compatibles avec un syndrome de Cushing associé à une réponse anormale du cortisol plasmatique au test par l'injection de l'hCG.

Certaines souris de cette étude ont été ovariectomisées pendant le même acte opératoire de la transplantation. Toutefois, lors du sacrifice réalisé devant une hyperglycémie et des signes cataboliques suggérant un hypercortisolisme, le dosage des taux plasmatique de LH n'a pas révélé des différences entre les souris ovariectomisées et celles non ovariectomisées. En fait, les souris ont été sacrifiées avant compléter le deuxième mois post-opératoire. Ainsi, la transformation tumorale observée dans le greffon formé à partir des cellules LHR a précédé la probable élévation des taux plasmatiques de LH suite à l'ovariectomie. Chez l'homme, il existe des cas décrits de lésions surréaliennes responsables d'une réponse anormale du cortisol à la LH en absence d'une situation physiologique d'élévation de LH ou hCG. Ceci veut dire que le syndrome de Cushing dépendant de la LH n'est pas obligatoirement dépendant de la grossesse ou de la ménopause et que l'expression du LHR activé par son ligand à sa concentration basale et pulsatile suffit pour induire le développement d'une hyperplasie surrénalienne.

Suite aux résultats obtenues avec le GIPR, l'expression d'un autre gène non muté codant pour un GPCR apporte une deuxième démonstration de la transformation tumorale

bénigne comme conséquence de la seule introduction d'un gène. Certaines différences phénotypiques ont été observées dans ce cas d'expression du LHR : les souris ont exhibé un syndrome de Cushing franc et l'aspect des tissus obtenus étaient préférablement en faveur d'une hyperplasie macronodulaire. Les cellules cortico-surréaliennes d'origine bovines, contrairement à celles d'origine murine, sont très similaires aux cellules cortico-surréaliennes humaines. La formation d'une masse hyperplasique et hyperproliférative sans caractéristiques de malignité, à partir de cellules bovines LHR transplantées chez des souris qui développent cliniquement un hypercortisolisme, constitue la démonstration que le gène du récepteur de la LH possède un important rôle comme initiateur du processus de transformation tumorale dans le cortex surrénalien.

La majorité des lésions surréaliennes liées à l'expression du LHR sont bénignes. Toutefois, un cas rare de carcinome cortico-surrénalien sensible à la LH a été décrit, et l'expression du récepteur de la LH a été démontrée (Wy, Carlson *et al.*, 2002). Une étude intéressante de 23 tumeurs cortico-surréaliennes a comparé les critères de malignité avec la détection du LHR. Presque toutes les tumeurs exprimaient le gène du LHR à des niveaux variables, avec une expression plus faible dans les tumeurs malignes et agressives. Cette étude présente une corrélation entre la survie à long terme et l'expression augmentée du LHR dans ces tumeurs (Barbosa, Giacaglia *et al.*, 2004). Ceci suggère que l'expression du gène LHR pourrait représenter un facteur pronostique. Il est possible que, lors de la transformation maligne, la tumeur bénigne (qui sur-exprime le LHR) acquière un phénotype malin et éteint le gène LHR. Cette hypothèse à partir des données des tumeurs humaines pourrait être testée dans notre modèle. Avant cela, le premier pas serait d'observer le phénotype des greffons LHR développés au long des nombreux mois afin de considérer stabilisation ou la progression de la transformation tumorale dans ces tissus.

RESULTATS

A) Expression ectopique du récepteur du GIP dans un modèle animal

Situation du sujet

Le GIPR a été le premier récepteur dont l'expression ectopique a été associée à un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. Il reste encore le type de récepteur le plus fréquent dans ces cas très particuliers de Cushing d'origine surrénalienne. Si le rôle de ce récepteur est bien démontré dans l'élévation du cortisol *in vivo* en réponse au GIP, sa participation dans la tumorigénèse surrénalienne reste incertaine. Pour déterminer si ces récepteurs ont un rôle dans le développement tumoral il faut démontrer que l'acquisition de l'expression de ces récepteurs conduit à une tumeur. Dans ce but, nous avons utilisé le modèle animal précédemment décrit (cf. 1.4.2), dans lequel il est possible d'introduire des cellules cortico-surréaliennes exprimant anormalement ces récepteurs pour étudier leur devenir.

Dans la première partie de ce travail, des expériences de biologie moléculaire ont été menées afin de cloner le ADNc du GIPR dans un vecteur rétroviral. Nous avons pu obtenir l'ADNc du GIPR du rat (fragment XhoI-ApaI de 1,62 kb cloné dans le plasmide modifié pCMV IRES), gracieusement donné par Dr. Usdin (Usdin, Mezey *et al.*, 1993). Les difficultés rencontrées pour le sous-clonage de ce fragment nous ont amené à extraire un fragment de 1,37 kb conforme à celui décrit par Wheeler, Gelling *et al.* (1995) qui correspond à la séquence codante du GIP-R. La stratégie finalement choisie est illustrée dans la Figure 18 qui résume les étapes du clonage. Le choix d'un plasmide rétroviral a été fait en raison de la stabilité de l'expression du gène d'intérêt. Le pLNCX2, comme la plupart des vecteurs rétroviraux, sont basés sur le virus de la leucémie murine de Moloney (« Moloney murine leukemia virus », MMLV). Les gènes du MMLV codant pour les protéines structurales gag, pol et env qui sont les facteurs *trans* nécessaires à la réplication virale, sont absents dans le pLNCX2 et remplacés par la séquence du gène d'intérêt. Le plasmide contient des éléments

cis nécessaires à la réplication et à l'encapsulation des particules virales entre les régions 5' et 3' LTR : le promoteur P_{CMV} et la séquence d'encapsulation ou « packaging » (ψ). Ainsi modifiés, les virus sont incapables de se répliquer, mais peuvent toujours produire des particules rétrovirales défectives.

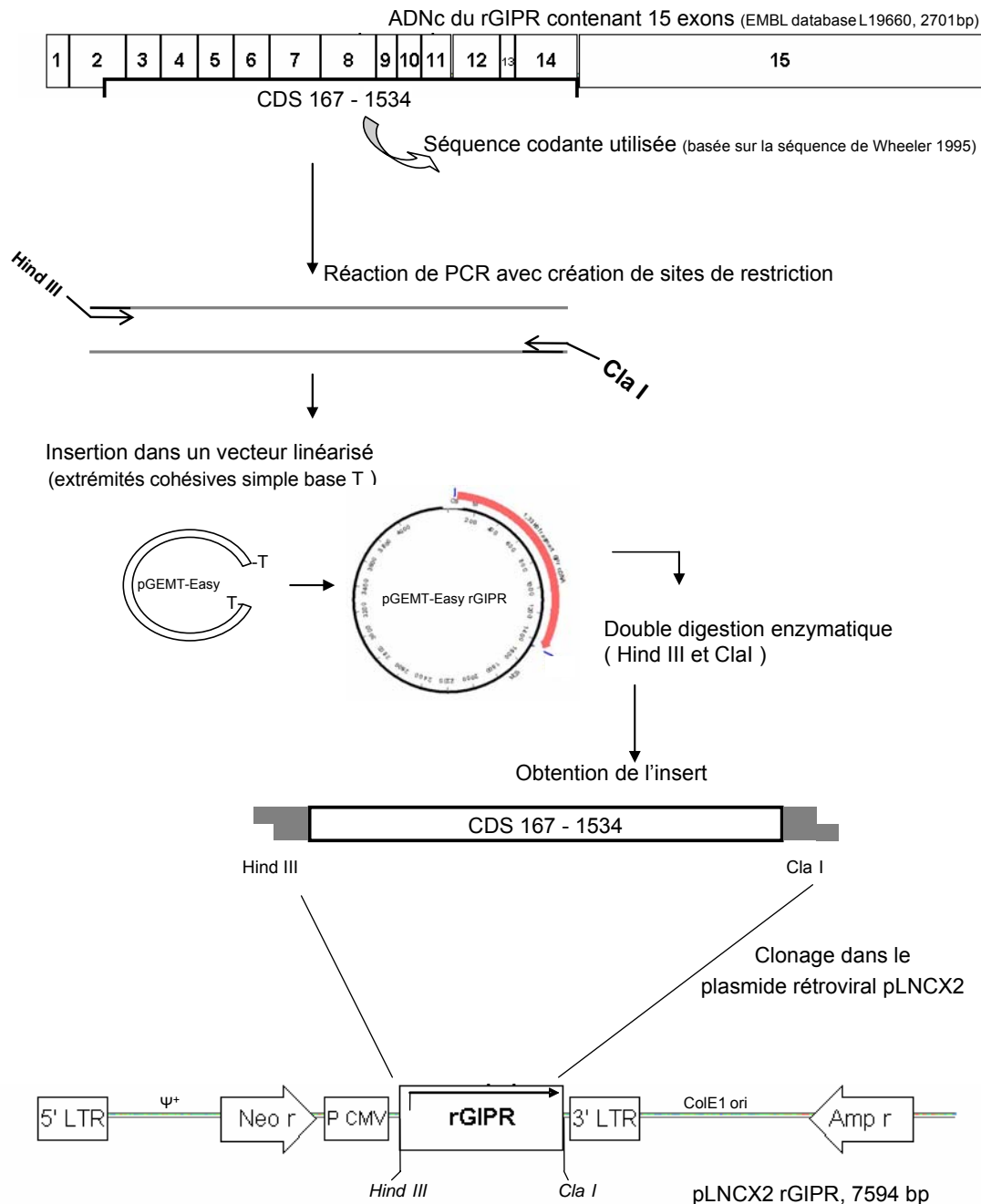


Figure 18. Résumé de la procédure utilisée pour la construction rétrovirale pLNCX2 GIPR. (Voir explication dans le texte).

Afin de pouvoir répliquer le gène d'intérêt, les virus nécessitent une lignée cellulaire particulière contenant les gènes *gag*, *pol* et *env*. La construction rétrovirale pLNCX2 GIPR a été donc transfectée dans des cellules d'encapsulation PT-67 (Figure 19). Ces cellules ont produit des particules rétrovirales qui ont été mises en contact avec les cellules cortico-surréaliennes bovines. Dans ce processus, grâce à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, l'ARN et la transcriptase inverse nécessaire à la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire sont libérés dans le cytoplasme. A l'occasion de la division cellulaire et de la disparition de la membrane nucléaire, la séquence d'ADN virale est intégrée dans le génome de manière aléatoire, transmettant ainsi le gène d'intérêt (GIPR) avec une cassette de résistance à l'antibiotique néomycine (Neo^r) (Figure 18), en absence des gènes de réplication virale. Les meilleures conditions de transfection et d'infection des cellules ont été testées et déterminées dans des expériences initiales avec un rétrovirus codant pour une protéine fluorescente (pLNCX-EGFP). Ceci nous a permis de confirmer l'efficacité de cette procédure tout en visualisant l'expression du gène transfecté.

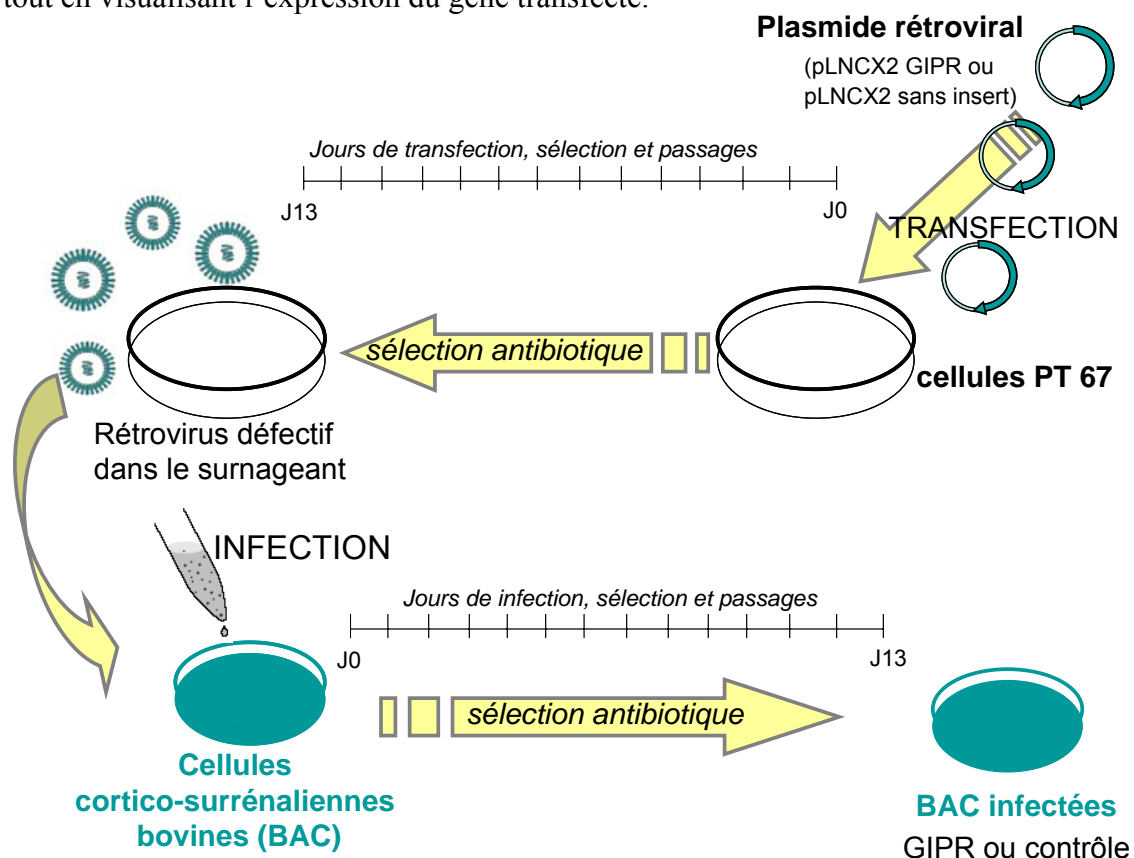


Figure 19. Représentation schématique des étapes pour la transduction cellulaire du GIPR. La transfection des rétrovirus contenant le ADNc du GIPR ou sans insert a été réalisée pour obtenir respectivement des cellules cortico-surréaliennes exprimant le GIPR ou des cellules contrôle.

Subséquentement, les cellules infectées ont été transplantées chez des souris immunodéficientes surrénalectomisées. La lignée de souris transgénique RAG-2^{-/-} a été utilisée (souris invalidée pour le RAG, *recombination activating gene*). Nous avons employé le modèle développé par Thomas, Northrup *et al.* (1997) sans introduction de l'anneau de polycarbonate. Ceci afin d'éviter des difficultés d'analyse du tissu néoformé dans le cas d'une éventuelle croissance exagérée de celui-ci.

Les souris transplantées avec les cellules exprimant le GIPR ont montré une réponse anormale du cortisol, qui s'élevait après injection intra-péritonéale du peptide GIP. Par contre, il n'y avait pas de caractéristiques marquées d'un syndrome de Cushing franc. Le sacrifice des souris a permis de mettre en évidence la formation d'un tissu cortico-surrénalien élargi avec un aspect histologique ressemblant à un adénome cortico-surrénalien. Le tissu hyperprolifératif formé par les cellules GIPR était capable de se développer même en absence d'ACTH, le facteur trophique des cellules du cortex normal. Dans cet article, nous exposons les résultats qui nous ont permis de conclure que l'expression du récepteur du GIP a un rôle causal dans l'initiation du processus de développement tumoral bénin du cortex surrénalien.

Article I

“Development of adrenocortical tumor by single expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene in a xenotransplantation model”.

Tânia L. Mazzuco ^{1,2}, Olivier Chabre ^{1,2}, Nathalie Sturm ³, Jean-Jacques Feige ¹ & Michaël Thomas ¹.

(Article soumis à publication)

¹ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Equipe Mixte 105, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Commissariat à l’Energie Atomique, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, Cedex 09, France; ² Service d’Endocrinologie, Département Endocrinologie Urologie Néphrologie Diabétologie and ³ Laboratoire de Pathologie Cellulaire, Département d’Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Universitaire, Grenoble.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M. T. (e-mail: michael.thomas@cea.fr).

INTRODUCTION

Neoplastic transformation occurs via a series of genetic and epigenetic alterations that ultimately disrupt the complex mechanisms restraining growth. Despite the complexity underlying the correlation between genotype and phenotype, minimal combinations of genes required to trigger malignant transformation of human or bovine cells have been identified¹⁻³. Regarding adrenocortical tumors, a multi-step model has been proposed to explain the progressive transformation of a normal cell or tissue into a polyclonal hyperplasia and/or a monoclonal adenoma and ultimately into a carcinoma^{4,5}. However, the single genetic event sufficient for the first phenotypic alteration leading to a benign tumor is still poorly defined.

Gastric inhibitory polypeptide (GIP, also known as glucose-dependent insulintropic polypeptide) is a gastrointestinal hormone that is released during meals. GIP acts on pancreatic β -cells to stimulate insulin release through binding to a seven-transmembrane domain G protein-coupled receptor (GPCR). Once bound by GIP, this β -pancreatic receptor activates adenylyl cyclase (AC), increases cAMP production and ultimately leads to the elevation of intracellular calcium and insulin exocytosis^{6,7}. Some studies have indicated that GIP may contribute to β -cell growth^{8,9}. Moreover, the GIP receptor (GIPR) gene has been found to be expressed at a lower level in brain, intestine, adipose tissue and heart, but not in normal adrenal cortex¹⁰⁻¹⁶.

Ectopic expression of GPCRs has been recently reported in benign adrenal lesions (bilateral macronodular hyperplasia or unilateral adenomas)^{17,18}. These GPCRs confer inappropriate sensitivity of adrenocortical cells to their ligands, stimulating steroidogenesis by recapitulating the cellular events that are triggered normally by the adrenocorticotrophic hormone (ACTH) receptor¹⁷. Progressively, excessive production of cortisol leads to feedback inhibition of corticotrophin-releasing hormone and ACTH. The first clinical evidence of ectopic GPCR expression was a food-dependent Cushing's syndrome secondary to a benign adrenal tumor¹⁹. Thereafter, the pathophysiology of this syndrome was characterized by a hypercortisolism induced by physiological post-prandial increase in circulating GIP concentrations^{20,21}. Abnormal GIPR expression has been then described in other cases of benign adrenal tumors^{12,13,16,19,22-25} but was not observed in a small cohort of malignant adrenal tissues²⁶. No mutation in GIPR gene coding sequence and promoter could be identified so far^{15,27} and the molecular mechanisms of this ectopic GIPR expression remain unclear.

The implication of adrenal GIPR expression in hypercortisolism has been shown, but its role in the hyperplastic transformation leading to an adrenal benign tumor is quite unknown. Our previous *in vitro* observations have suggested that GIP had a weak stimulatory effect on DNA synthesis of adrenocortical tumor cells from a patient with a food-dependent Cushing's syndrome¹². No *in vivo* data has confirmed this trophic effect. Furthermore, there is no available data to explain whether the GIPR gene is expressed as a secondary response in hyperplastic or adenomatous adrenal glands or whether its expression is the genetic event that initiates tumorigenesis *per se*.

We thus decided to investigate the role of ectopic GIPR expression in the development of benign adrenocortical tumors using an *in vivo* model of cell transplantation and tissue reconstruction²⁸. After generation of adrenocortical cells encoding GIPR and their transplantation in mice, we characterized the profile of GIP-dependent cortisol production and demonstrated that the ectopic GIPR expression is sufficient to trigger the development of a benign tumor.

RESULTS

GIPR expression in adrenocortical cells triggers cortisol secretion

We cloned the GIPR complementary DNA (cDNA) in a retroviral vector for stable gene expression and transduced primary cultures of bovine adrenocortical cells, in order to mimic the ectopic expression of GIPR. The translated region (between the exons 2 – 14) of the rat GIPR cDNA was used for DNA construction (Fig 1a). This rat cDNA¹⁰ encoding the GIP receptor displays 85.5 % of homology with the human receptor coding sequence. Expression of GIPR did not induce phenotypic modifications of the transduced cells as compared to primary cells or cells transduced with an empty vector (specifying only a drug resistance gene). *In vitro*, all cell types had similar morphology and growth and maintained contact inhibition at confluence (Fig. 1b). As shown by RT-PCR analysis, GIPR gene expression was only observed in the GIPR-infected cell population and in a human adenoma responsible for a food-dependent Cushing's syndrome¹² (Fig. 1c). Moreover, no eutopic

expression of GIPR gene was detected in primary and control cells. The expression of the melanocortin 2 receptor (MC2R, the ACTH receptor) was preserved in all three types of cells (Fig. 1c). We also observed that genes encoding the steroid-converting enzymes 3-beta-hydroxy-delta(5)-steroid dehydrogenase isomerase 1, type II (3 β HSD) and steroid 17 α -hydroxylase (CYP17), involved in cortisol biosynthesis, were not affected by gene transduction and were equally expressed in all cell types (Fig. 1c).

Cortisol is the main corticosteroid produced by bovine (and human) adrenocortical cells whereas mouse cells mainly secrete corticosterone. However, long term *in vitro* culture of adrenocortical cells may result in loss of their steroidogenic capacities, despite detectable expression of 3 β HSD and CYP17 genes²⁹. We thus ascertained the ability of our infected cells to be hormonally responsive after 2 weeks in culture (infection + antibiotic selection) by measuring the cAMP production which follows the binding of ACTH and GIP to their respective receptors and the AC activation. Upon ACTH (100 nM) stimulation, we observed a strong (~ 7-fold) elevation of cAMP in both cell types (infected by empty or GIPR-encoding virus), whereas only the GIPR-expressing cells responded (16-fold cAMP elevation) to GIP (100 nM) (Fig. 1d). We finally measured the cortisol secretion in response to ACTH or forskolin (10 μ M, a direct activator of AC), which was preserved in all transduced cells (~ 2-fold basal, Fig. 1d). By contrast, under GIP treatment, only the GIPR-cells showed a 2-fold elevation of cortisol secretion ($P < 0.05$, Fig. 1d). Thus, adrenocortical steroid synthesis was correlated with cAMP production in both cell types in response to either ACTH or GIP and GIPR gene expression was responsible for abnormal GIP-dependent cortisol secretion.

GIPR cell transplantation produces a functional transgenic tissue

We then analyzed the phenotype of the tissues resulting from the implantation of GIPR cells under the renal capsule of adrenalectomized immunodeficient mice²⁸. In a previous study, we have shown that the implantation of primary bovine adrenocortical cells leads to the formation of a vascularized and cortisol-secreting organ that saves mice from the lethal effect of adrenalectomy²⁸. To assess the functional status of the transplanted GIPR-cells, we measured the plasma cortisol levels in response to hormonal challenge. Injection of GIP at physiological post-prandial concentration (50 pmol/g i.p.) increased cortisol levels in the GIPR mice, but not in control mice (Fig 2a). The cortisol stimulation by ACTH injection (2

pmol/g i.p.) was preserved in GIPR mice as well as in control mice, but in the latter, cortisol secretion was not stimulated by GIP injection (Fig 2b).

Since GIPR mice exhibited elevated cortisol levels in response to GIP, we screened some physical and biological features that might occur in a cortisol hypersecretion state, diagnostic of Cushing's syndrome. At 8 weeks, the plasma ACTH levels in GIPR-mice were decreased but not totally suppressed (21.4 ± 6.3 pmol/l), which represented 48% of control mice plasma ACTH levels (44.6 ± 23.5 pmol/l). The GIPR mice phenotype obtained was consistent with a discontinuous inhibition of pituitary corticotrope cells by fluctuating cortisol levels, hence the ACTH production was not completely blocked, as seen in some atypical clinical presentations of CS (mild hypercortisolism, cyclical CS, subclinical CS)³⁰. As these forms of hypercortisolism can develop glucose metabolism abnormalities, resulting in glucose intolerance or overt diabetes mellitus³⁰, we assessed the insulin sensitivity status of transplanted mice by performing glucose blood tests during their physiological fasting period. Glycemia of GIPR mice was significantly higher than that of control mice ($P < 0.001$, $n = 9$, Student's *t*-test) (Fig 2c). We also noticed growth attenuation along with no weight gain in mice transplanted with GIPR adrenocortical cells. A similar growth retardation is encountered in other mice models of Cushing's syndrome, as observed in glucocorticoid-treated mice (our unpublished observations) and in different transgenic mice models of Cushing's syndrome³¹⁻³³. No remarkable changes in distribution of body fat such as the presence of a buffalo hump or intra-abdominal fat deposits were observed at necropsy. Thus, activation of GIPR in the adrenocortical cells disturbs glucocorticoid homeostasis promoting the development of hyperglycemia and growth retardation.

GIPR mice develop adrenal hyperplasia

At the time of sacrifice (~ 8 weeks after transplantation), tissues formed from transplanted adrenocortical cells were fixed and processed for conventional histology and histochemistry. Transplantation of control cells resulted in a thin pale tissue beneath the kidney capsule, spreading over the kidney parenchyma (Fig 3a), while transplanted GIPR cells produced a discrete mass with a prominent yellow central zone surrounded by a white tissue. Cross-sections of this tissue revealed its internal growth with compression of the renal parenchyma (Fig 3a). Histologically, control adrenocortical cells formed a small tissue in

marked contrast to the voluminous encapsulated tissue formed by GIPR cells although 2×10^6 cells had been initially transplanted in both cases (Fig 3b). Control tissue presented a uniform structure of regular eosinophilic adrenocortical cells in close contact with the kidney parenchyma on its lower side and the renal capsule on its upper side (Fig 3b). In contrast, GIPR tissue had an aspect of an encapsulated mass losing the contact between adrenocortical cells and the kidney surface; the tissue showed an irregular architecture with some cellular pleomorphism and nuclear atypia (Fig 3b). Both clear, lipid-laden (fasciculata type) cells and eosinophilic lipid-depleted (reticularis type) cells were dispersed in a stromal reaction, without any sign of necrosis. Up to 53 days, all 14 GIPR tumors showed a clear border between the tumor and the kidney with no sign of invasion. Comparatively, the histological appearance of a human GIPR adenoma¹² is shown in the right panels (Fig 3 b) to illustrate their irregular cellular distribution consisting in sheets of fasciculata type cells interspersed with reticularis type cells. This human adenoma was encapsulated and had some areas composed of tumoral stroma, as revealed by Picro-Sirius Red staining (Fig 3b). A pronounced fibrous stroma in GIPR transplants was confirmed in the same figure, where a framework of connective tissue is underlined by red-stained collagen fibers. In marked contrast, only the renal capsule was stained in control tissue (Fig 3b). The stromal reaction was a result of the *in vivo* development of GIPR tissue; no difference was observed in the levels of alpha 2 type I collagen (Col-I) gene expression by RT-PCR in GIPR cells *in vitro* prior to transplantation (not shown).

Preservation of the steroidogenic phenotype after tissue development of transplanted adrenocortical cells was demonstrated by immunohistochemistry using antibodies against the steroid-converting enzymes 3β HSD and CYP17 (Fig 3c). Interestingly, all cells with adrenocortical aspect were steroidogenic in the GIPR tumor, independently of their pleomorphism, forming islets or nodular regions between unstained stromal cells. The expression of the GIPR gene and the detection of the GIPR protein were confirmed in 8 week-old tissues formed from transplanted GIPR cells, as demonstrated respectively by RT-PCR (data not shown) and by immunohistochemistry (Fig 3c). GIPR gene and protein expression were not detected in tissues formed from control cells (data not shown).

To further characterize the enlargement of GIPR tissue mass as compared to control tissue, we checked whether this hyperplasia resulted from increased proliferation or decreased

apoptosis. Regarding proliferation, we used the antibody Ki-67, which binds a non histone nuclear protein expressed in all cell cycle phases, except G0/early G1. Ki-67 staining was observed throughout the transplant in only $3.5 \pm 1.0\%$ of cells in control tissue, compared with $17.7 \pm 1.3\%$ of cells in GIPR tissue ($P < 0.001$, Student's *t*-test; Fig. 4a and 4b). There was no difference between the apoptotic rates of control and GIPR cells prior transplantation, as demonstrated by the pro-apoptotic index based on expression of BCL2-like 1 gene (Bcl-xL) and BCL2-associated X gene (Bax) (Fig 4c). The detection of apoptotic cells by TUNEL showed no significant differences between both types of tissues (data not shown) indicating that apoptosis was certainly not the cause for the observed remodeling. Thus, cells encoding GIPR gene showed a growth advantage following transplantation in mice, leading to an enlarged adrenocortical mass.

We have compared GIPR transplants features with histological criteria of Weiss, which are routinely employed to differentiate benign from malignant human adrenal tumors³⁴. In all transplanted mice studied, no local invasion or metastatic lesions were observed. Some criteria such as capsular or venous invasion could not be evaluated in our model. Among Weiss criteria applicable to the formed GIPR tumors, only diffuse architecture and elevated mitotic index (Fig 3d and 4b) were observed, suggesting a benign lesion (Weiss score < 3). Therefore, the encapsulated hyperproliferative adrenocortical GIPR tumors formed in adrenalectomized mice had a benign histological aspect.

To investigate whether the growth of the GIPR transplants was ACTH-independent, we used a mouse model of synthetic glucocorticoid-induced ACTH suppression³⁵. In the aforementioned study, we have shown that dexamethasone-induced adrenal atrophy as consequence of ACTH suppression did not result from a direct glucocorticoid effect on the adrenal cortex. Mice were treated by sc perfusion of dexamethasone from the onset of transplantation. Dexamethasone dramatically reduced plasma ACTH concentration to 1.3 ± 0.8 pmol/l, as compared to 277 ± 36 pmol/l in control mice. When dexamethasone-treated animals transplanted with control adrenocortical cells were sacrificed after 14 days, an atrophic transplant tissue was present at the site of injection (Fig 5) with reduced cellularity and disorganized architecture as compared to untreated control mice. In contrast, GIPR transplants developed similarly in the presence or in the absence of ACTH. Two weeks after transplantation, in the absence of circulating ACTH, GIPR transplants already formed a

discrete mass beneath the kidney capsule (Fig 5). The development of GIPR tumors independently of ACTH secretion indicated that physiologically secreted GIP acts as a trophic factor through activation of the adrenal ectopic GIPR.

DISCUSSION

Here we demonstrate that ectopic expression of GIPR induces the development of a benign adrenal tumor. Evidence is now accumulating in favor of a multi-step process of adrenal tumor development, analogous to that proposed for colon and other tumors³⁶. The transition from normal adrenocortical tissue to a benign tumor is not well established, although the majority of evidence suggests that the dysregulation of the imprinted 11p15 region may be responsible for transition from benign to malignant adrenocortical tumors^{37,38}.

Recent attention has been drawn to the ectopic expression of GPCRs in adrenal cortical tumors that may be linked to the development of Cushing's syndrome. This genetic hit might predispose the cells to accumulate further abnormalities that would lead them toward a malignant phenotype. *In vitro* studies have shown in corticosterone-secreting rat adrenocortical carcinoma 494 that AC is stimulated by receptors to hormones other than ACTH, such as catecholamines, thyroid-stimulating hormone, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and prostaglandin E1, through binding to their respective GPCRs^{39,40}. Moreover, in humans, the functional coupling of GPCRs to steroidogenesis has been demonstrated in some adrenocortical malignant tumors^{41,42}.

Our approach to adrenal tumorigenesis is driven by the ability to genetically engineered primary cells and to observe the phenotypic alterations induced by single gene modifications after their transplantation into host animals. In the present study we show that illegitimate expression of the GIPR gene in adrenocortical cells produces a tissue that is continuously expanding but not invasive. These results contrast with those of previous bovine adrenocortical cell transplantation experiments using either normal cells or immortalized cells by the introduction of the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene or cells modified with three genetic changes (hTERT, SV40 large T antigen and oncogenic Ras)^{3,43}.

The retroviral transduction of the GIPR gene allowed the stable expression of an ectopic gene in adrenocortical cells following transplantation in mice. Some studies had demonstrated the difficulty to obtain functional GPCRs in heterologous systems, which could be expressed only in cell lines having a minimal level of endogenous expression of the GPCR studied^{44, 45}. In our system, we have shown that the delivery of GIPR gene in adrenocortical cells was able to trigger normal receptor trafficking to the plasma membrane (as evidenced by immunolabeling, Fig 3d) and normal receptor coupling to Gs protein leading to AC activation and steroidogenic response (Fig 1c).

The control adrenal cells form a functional vascularized tissue that remains at a constant size over long periods and has a low rate of cell division. In contrast, the cells expressing the normal GIPR gene form a tissue with a high proliferative rate that is not balanced by cell death. It is interesting to note that several genes identified in various signal transduction cascades controlling cell growth or differentiation were termed proto-oncogenes because they may be inappropriately activated, resulting in their counterpart oncogenes, which induce cellular transformation⁴⁶. Our data provide evidence that the inappropriate expression of a G-protein coupled receptor gene represents a gain-of-function event leading to cellular transformation of adrenocortical cells. Therefore, the GIPR gene acts as an oncogene in adrenocortical cells interrupting the normal restraints on growth.

We investigated to what extent the establishment of the transplant was dependent on pituitary function. In absence of ACTH, control cells were not able to form a tissue, indicating that the initial phases in the formation of the transplant appear to be absolutely dependent on circulating ACTH. In contrast, the GIPR cells did not require ACTH for the formation of the transplant. It is now highly likely that the presence of ectopic receptors such as GIPR places adrenal cells under stimulation of a trophic factor, GIP, which is not under the main regulatory negative feedback exerted by glucocorticoids, leading to proliferative advantage and hyperplasia. Finally, the understanding of the molecular mechanisms implicated in the ectopic expression of GPCRs and the formation of a benign tumor could point out one of the primary genetic events that elicit adrenocortical tumor development. Moreover, these results offer an opportunity to investigate the downstream GPCR signaling cascade(s) in adrenal tumorigenesis and a unique model to explore therapeutic targets for the treatment of adrenocortical tumors.

METHODS

GIPR vector construction and retrovirus production. The rat GIPR cDNA initially in a modified pCMV IRES¹⁰ was amplified by PCR with primers designed for creation of *HindIII* and *ClaI* restriction sites at 5' and 3' ends respectively. The 1.4-kilobase DNA fragment was subcloned into the pGEM-T Easy cloning vector (Promega); it corresponds to the GIPR cDNA translated region 163 – 1534, which includes part of the exon 2 and exons 3 – 14 (according to sequence number L19660, EMBL database). Primer sequences and PCR conditions are available from the authors on request. The sequence-verified GIPR cDNA was transferred from construct rGIPR-pGEM-T Easy to a pLNCX2 retroviral expression vector (Clontech), downstream of its immediate early CMV promoter. Retroviral vector without insert was used as a negative control. The packaging PT67 cells (Clontech) were transfected with vectors and used for the production of replication-incompetent viruses. After 7 days of 400 µg/ml G418 antibiotic selection, viral supernatant was passed through an 0.45 µm syringe filter to obtain cell-free viruses for adrenocortical cell infection.

Growth of bovine adrenocortical cells in culture and retroviral transduction. Primary adrenocortical cells were prepared by enzymatic digestion of adrenal glands from 2 year-old steers, as previously described⁴⁷. Primary cell suspensions were stored frozen in liquid nitrogen. Frozen cells were thawed and replated in Dulbecco's modified Eagle's medium: Ham's F-12 1:1 with 10% fetal calf serum, 10% horse serum and 1% (vol/vol) UltraSer G (Bioprepa). Adrenocortical cells were infected by adding the filtered medium containing retroviruses at a ratio of 1:1 with fresh culture medium, for 6 hours. Infected cells were selected with G418 for 7 days generating either control cells or GIPR cells.

In vitro studies. The cyclic AMP production and cortisol secretion by transduced cells were measured after 2 h incubation with 10 µM forskolin (Sigma), 100 nM ACTH (1-24) (Neosystem), 100 nM GIP (Bachem) or fresh medium. Cortisol secretion was assayed directly on culture medium by radioimmunoassay (RIA). cAMP production was measured using an ELISA kit (Neogen) following the manufacturer's recommendations.

Gene expression analysis was assessed after total RNA extraction from cultured cells (RNeasy Mini Kit, Qiagen) and cDNA synthesis from 1 µg of RNA with ImProm-II reverse

transcriptase (Promega) using random primers. Semi-quantitative PCR was performed with specific primers for GIPR, bovine MC2R, bovine 3β HSD, bovine CYP17, bovine Bax and bovine Bcl-xL genes. Primer sequences and PCR conditions are available from the authors on request. Amplified products were separated by 2% agarose gel electrophoresis and scanned with FluorImager (Molecular Dynamics) and normalized to RP-L27. Apoptosis index was calculated based on relative absorbance of PCR products determining a proapoptotic Bax/antiapoptotic Bcl-xL expression ratio⁴⁸.

Cell transplantation and animal experimentation. Immunodeficient RAG 2 $-/-$ mice originally purchased from CDTA (France) were maintained in our animal facility as a breeding colony. All animal procedures were approved by the institutional guidelines and the European Community for the Use of Experimental Animals. Under Avertin anesthesia, male and female mice at an age between 8 and 12 weeks (~22 g body weight) were adrenalectomized and received transplants of adrenocortical cells using the surgical procedure previously described^{3, 28}. We transplanted 2×10^6 control or GIPR adrenocortical cells into the subrenal capsule space, together with 4×10^5 FGF-secreting 3T3 cells previously treated by 2 μ g/ml mitomycin C (Sigma). Post-operative care for animals consisted of an analgesic and antibiotics mixture administration in the drinking water for 7 days.

After 4 weeks, tail blood samples were taken at basal time and 15 min after the injection of ACTH (1-39) (Neosystem, 42 pmol/g body weight) or GIP (Bachem, 50 pmol/g body weight). Plasma cortisol and ACTH (at basal time) were measured respectively by RIA and IRMA. Blood glucose values were determined from whole blood at basal time using an automatic glucose monitor (Accu-Chek Active, Roche). Blood samples were collected in the afternoon, during the physiological fast period and nadir of cortisol level. After 8 weeks, animals were sacrificed and the kidneys bearing the adrenocortical transplant were excised for histological analysis.

In some experiments, animals had plasma ACTH suppressed by 1 μ g/g.day dexamethasone (Sigma) delivered by subcutaneous osmotic minipump (Alzet) implanted at the time of cell transplantation. Mice were sacrificed after 14 days of dexamethasone or excipient (cyclodextrin) treatment. Cardiac blood samples were collected and transplants were processed for histological analysis.

Histological studies. Paraformaldehyde-fixed tissues were paraffin-embedded and sectioned using standard methods. Sections were stained with H&E. Picro-Sirius Red stain was used to localize collagen. Tissues were immunostained with antibodies to 17 α -hydroxylase, 3 β HSD, GIPR⁴⁹ and Ki-67 (Dako A/S), with biotin-conjugated anti-mouse or rabbit secondary antibodies as required, and with detection using avidin-biotin-peroxidase complex and DAB (Dako A/S). For 3 β HSD-antibody detection we used the Fast Red chromogen as substrate. DNA fragmentation associated with apoptosis was detected by nick end labeling of sections using the TdT-FragEL kit (Calbiochem).

The number of Ki-67-positive cells per 100 adrenocortical cells was designated as the labeling index. Counter was performed manually, using two non-consecutive tissue sections per tissue sample, selected at random in both groups (control and GIPR tissues), n=10 sections of each group. Overall comparison was performed with graphical statistical summary and Student's *t*-test.

Acknowledgments

We thank T. Usdin for the plasmid pCMV IRES rGIPR, T. Kieffer for the GIPR antibody, C. Guillermet for her assistance in immunostaining, and P. Faure and M. Martinie for performing the ACTH immunoradiometric assay. We are indebted to P.J. Hornsby, J.B. Calixto and P. Rodien for critical reading of the manuscript. This work was supported by INSERM, CEA (DSV/DRDC/ANGIO), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC, France, research grant 4713 to M.T.) and PHRC (Grant AOM 95201, COMETE Network). T.L.M. was sponsored by a doctoral studentship from Agency for the Improvement of Graduate Training of Brazil (CAPES), and by fellowships from ARC and FRM (La Fondation pour la Recherche Médicale, France) in the early development of the research.

Competing interests statement: The authors declare that they have no competing financial interests.

BIBLIOGRAPHY

1. Hahn, W.C. et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**, 464-468 (1999).
2. Orsulic, S. et al. Induction of ovarian cancer by defined multiple genetic changes in a mouse model system. *Cancer Cell* **1**, 53-62 (2002).
3. Thomas, M. et al. Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells. *Neoplasia* **4**, 493-500 (2002).
4. Bernard, M.H. et al. A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 998-1001 (2003).
5. Stratakis, C.A. Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 404-410 (2003).
6. Lu, M., Wheeler, M.B., Leng, X.H. & Boyd, A.E., 3rd The role of the free cytosolic calcium level in beta-cell signal transduction by gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide I(7-37). *Endocrinology* **132**, 94-100 (1993).
7. Volz, A. et al. Molecular cloning, functional expression, and signal transduction of the GIP-receptor cloned from a human insulinoma. *FEBS Lett* **373**, 23-29 (1995).
8. Trumper, A. et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide is a growth factor for beta (INS-1) cells by pleiotropic signaling. *Mol Endocrinol* **15**, 1559-1570 (2001).
9. Kubota, A. et al. Gastric inhibitory polypeptide activates MAP kinase through the wortmannin-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 171-175 (1997).
10. Usdin, T.B., Mezey, E., Button, D.C., Brownstein, M.J. & Bonner, T.I. 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. (1993).
11. Wheeler, M.B. et al. Functional expression of the rat pancreatic islet glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor: ligand binding and intracellular signaling properties. *Endocrinology* **136**, 4629-4639 (1995).
12. Chabre, O. et al. Cushing's syndrome due to a gastric inhibitory polypeptide-dependent adrenal adenoma: insights into hormonal control of adrenocortical tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3134-3143 (1998).
13. Lebrethon, M.C. et al. Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 4514-4519 (1998).
14. Luton, J.P., Bertherat, J., Kuhn, J.M. & Bertagna, X. [Aberrant expression of the GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide) receptor in an adrenal cortical adenoma responsible for a case of food-dependent Cushing's syndrome]. *Bull Acad Natl Med* **182**, 1839-1849; discussion 1849-1850 (1998).
15. N'Diaye, N., Tremblay, J., Hamet, P., De Herder, W.W. & Lacroix, A. Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 2781-2785 (1998).
16. N'Diaye, N. et al. Asynchronous development of bilateral nodular adrenal hyperplasia in gastric inhibitory polypeptide-dependent cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 2616-2622 (1999).
17. Lacroix, A., Ndiaye, N., Tremblay, J. & Hamet, P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* **22**, 75-110 (2001).

18. Lacroix, A., Baldacchino, V., Bourdeau, I., Hamet, P. & Tremblay, J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 375-382 (2004).
19. Hamet, P., Larochele, P., Franks, D.J., Cartier, P. & Bolte, E. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med* **10**, 530-533 (1987).
20. Lacroix, A. et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* **327**, 974-980 (1992).
21. Reznik, Y. et al. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *N Engl J Med* **327**, 981-986 (1992).
22. de Herder, W.W. et al. Food-dependent Cushing's syndrome resulting from abundant expression of gastric inhibitory polypeptide receptors in adrenal adenoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* **81**, 3168-3172 (1996).
23. Pralong, F.P. et al. Food-dependent Cushing's syndrome: possible involvement of leptin in cortisol hypersecretion. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 3817-3822 (1999).
24. Croughs, R.J. et al. GIP-dependent adrenal Cushing's syndrome with incomplete suppression of ACTH. *Clin Endocrinol (Oxf)* **52**, 235-240 (2000).
25. Tsagarakis, S. et al. 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 (2001).
26. Groussin, L. et al. 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 (2002).
27. Antonini, S.R. et al. 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**, 171-177 (2004).
28. Thomas, M., Northrup, S.R. & Hornsby, P.J. Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med* **3**, 978-983. (1997).
29. Negoescu, A. et al. Contribution of apoptosis to the phenotypic changes of adrenocortical cells in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* **110**, 175-184 (1995).
30. Arnaldi, G. et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5593-5602 (2003).
31. Stenzel-Poore, M.P., Cameron, V.A., Vaughan, J., Sawchenko, P.E. & Vale, W. Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology* **130**, 3378-3386 (1992).
32. Yano, H., Readhead, C., Nakashima, M., Ren, S.G. & Melmed, S. Pituitary-directed leukemia inhibitory factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol* **12**, 1708-1720 (1998).
33. Tronche, F. et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet* **23**, 99-103 (1999).
34. Weiss, L.M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* **8**, 163-169 (1984).
35. Thomas, M., Keramidas, M., Monchaux, E. & Feige, J.J. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology* **145**, 4320-4329 (2004).

36. Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**, 159-170 (1996).
37. Gicquel, C. et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 2559-2565 (1997).
38. Gicquel, C. et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* **61**, 6762-6767 (2001).
39. Schorr, I. & Ney, R.L. Abnormal hormone responses of an adrenocortical cancer adenyl cyclase. *J Clin Invest* **50**, 1295-1300 (1971).
40. Schorr, I., Rathnam, P., Saxena, B.B. & Ney, R.L. Multiple specific hormone receptors in the adenylate cyclase of an adrenocortical carcinoma. *J Biol Chem* **246**, 5806-5811 (1971).
41. Millington, D.S. et al. In vitro synthesis of steroids by a feminising adrenocortical carcinoma: effect of prolactin and other protein hormones. *Acta Endocrinol (Copenh)* **82**, 561-571 (1976).
42. Katz, M.S. et al. Ectopic beta-adrenergic receptors coupled to adenylate cyclase in human adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **60**, 900-909 (1985).
43. Thomas, M., Yang, L. & Hornsby, P.J. Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase. *Nat Biotechnol* **18**, 39-42 (2000).
44. Rohrer, D.K. & Kobilka, B.K. G protein-coupled receptors: functional and mechanistic insights through altered gene expression. *Physiol Rev* **78**, 35-52 (1998).
45. Noon, L.A. et al. Failed export of the adrenocorticotrophin receptor from the endoplasmic reticulum in non-adrenal cells: evidence in support of a requirement for a specific adrenal accessory factor. *J Endocrinol* **174**, 17-25 (2002).
46. Ponder, B.A. Cancer genetics. *Nature* **411**, 336-341 (2001).
47. Duperray, A. & Chambaz, E.M. Effect of prostaglandin E1 and ACTH on proliferation and steroidogenic activity of bovine adreno-cortical cells in primary culture. *J Steroid Biochem* **13**, 1359-1364 (1980).
48. Vander Heiden, M.G. & Thompson, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* **1**, E209-216 (1999).
49. Lewis, J.T., Dayanandan, B., Habener, J.F. & Kieffer, T.J. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology* **141**, 3710-3716 (2000).

LEGEND OF FIGURES

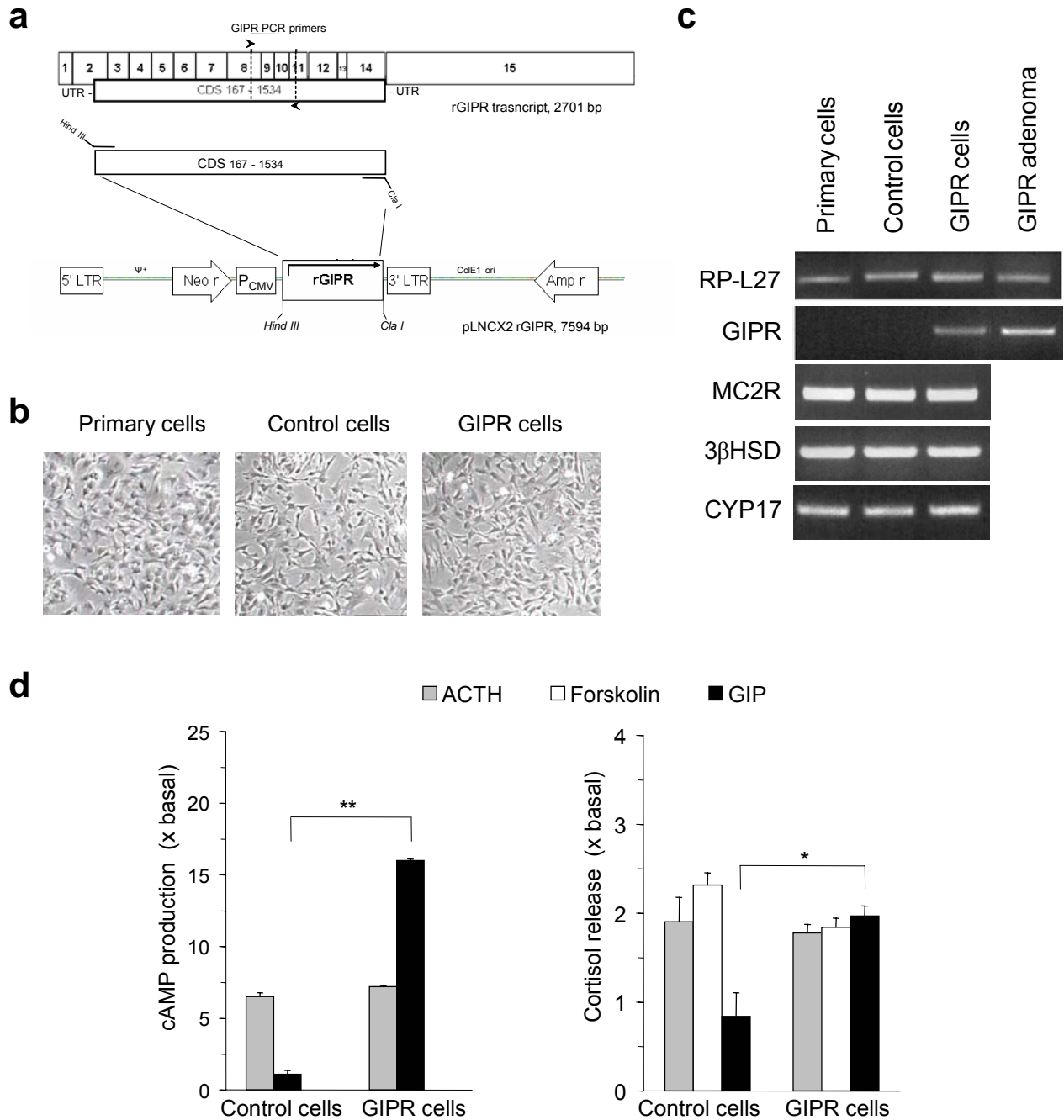
Figure 1 *In vitro* characterization of bovine adrenocortical cells transduced with GIPR retroviruses. **(a)** Diagram of GIPR vector construction. The rat GIPR (rGIPR) transcript sequence is represented by its 15 exons. Translated region (CDS 167 – 1534) with restriction enzymes sites added as indicated was cloned between *cis* elements (5' and 3' long terminal repeat (LTR) sequences) of pLNCX2 retroviral vector. GIPR gene is expressed from the 5'LTR. Expression cassettes of resistance markers for neomycin and ampicilin (Neo r, Amp r) and cytomegalovirus promoter (P_{CMV}) are represented. UTR, untranslated region. **(b)** Phase contrast photomicrographs of normal primary bovine adrenocortical cells, adrenocortical cells transduced with a retrovirus encoding an empty vector (control cells) or with a retrovirus encoding GIPR (GIPR cells). **(b)** RT-PCR analysis on indicated cell types. Specific sets of primers were used to amplify the cDNAs encoding GIPR (see panel **a**), MC2R, 3 β HSD, CYP17. A benign adrenal tumor from a patient with food-dependent Cushing's syndrome was used as a positive control for GIPR expression. Amplified fragment of ribosomal protein L27 gene (RP-L27), as RT-PCR control. **(c)** cAMP production (left) and cortisol secretion (right) by control and GIPR cells. Cells were incubated with ACTH, forskolin or GIP. Data are presented as the fold increase of cAMP production or cortisol secretion as compared with cells incubated with medium. Values represent the means \pm s.e.m. of triplicate determinations, asterisks indicate a statistical difference from basal. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$.

Figure 2 Biological features of GIPR transplanted mice. **(a)** Changes in plasma cortisol levels in mice with transplanted cells. Each set of connected symbols represents data on a mouse transplanted with cells of the indicated type. The first symbol of each set shows the basal plasma cortisol concentration. The second symbol shows the plasma cortisol level after GIP i.p. injection. **(b)** Mean relative changes of plasma cortisol levels in response of ACTH or GIP i.p. injection vs basal levels. P indicates statistical differences between groups of mice transplanted with control or GIPR cells. NS, not significant. **(c)** Blood glucose values of mice transplanted with control or GIPR cells. Blood samples were taken at the indicated days following cell transplantation. Inset shows bars representing mean of glucose values \pm s.e.m. in both groups, asterisks indicate a statistical difference from control group ($P < 0.001$).

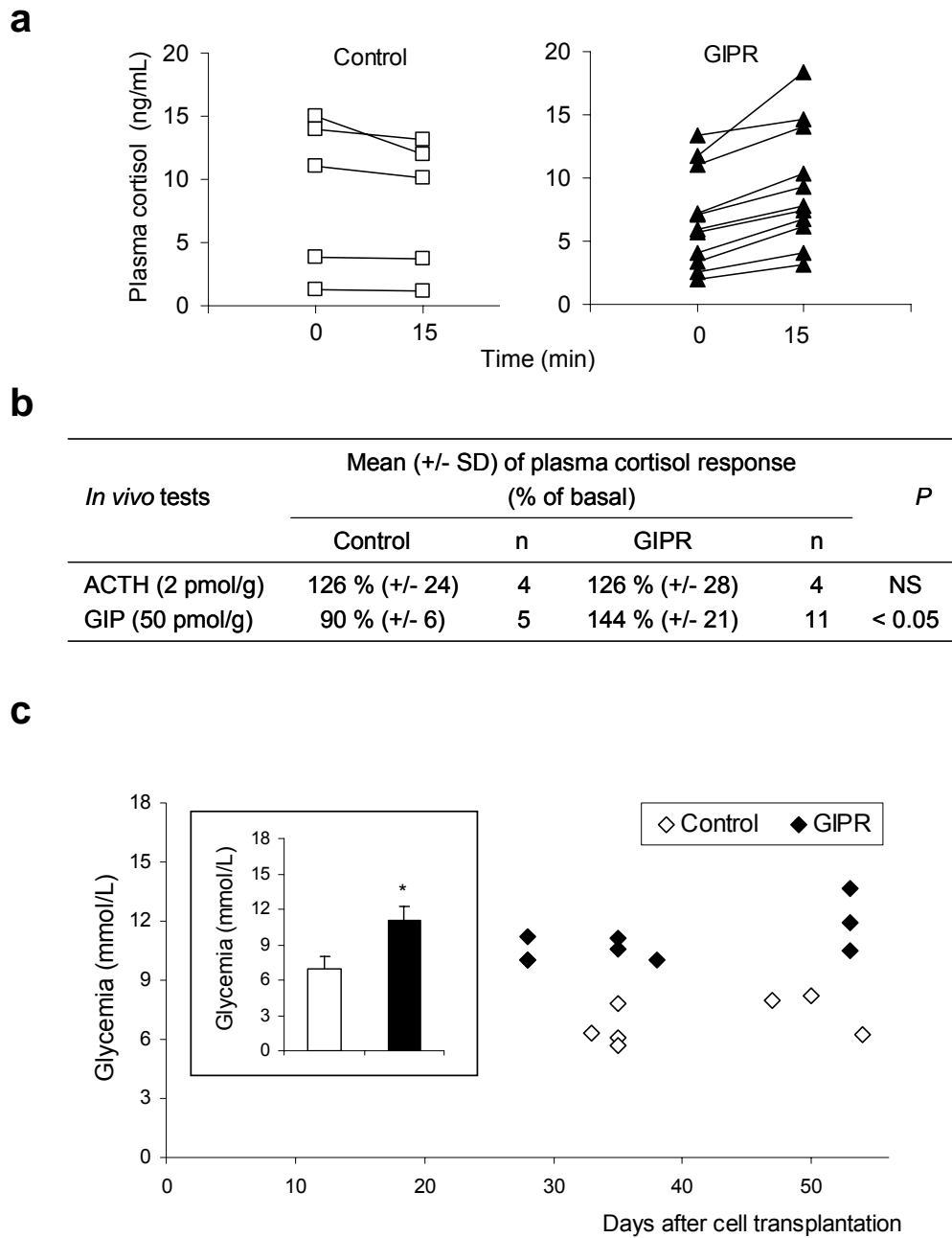
Figure 3 GIPR expression induces hyperplasia of the tissue formed after transplantation. **(a)** Macroscopic examples of kidney and xenografted tissue mass removed from the animals at day 53 following transplantation of either control or GIPR cells. Adrenocortical tissue and kidney were cut transversally as indicated by the dotted line in the top view, showing internal tissue expansion in axial view (arrows). **(b)** Representative H&E stained sections of tissues formed after transplantation of control cells, GIPR cells and of a human GIPR adenoma. The black dotted line marks the border between the mouse kidney (lower) and the adrenocortical transplant tissue (upper). Picro-Sirius red staining for connective tissue (red). C, kidney capsule; A, adrenocortical tissue; K, kidney. **(c)** Sections of tissues formed from transplanted control or GIPR cells probed with antibodies to steroid-converting enzymes 3β HSD and 17α -hydroxylase (red and brown staining, respectively). **(d)** Sections of a GIPR tissue probed with an antibody that recognizes GIPR. Scale bars, 5 mm **(a)**, 100 μ m **(b and c)**, 200 μ m **(d)** and 10 μ m **(d, selected area)**.

Figure 4 GIPR expression induces proliferation and growth of the tissue formed following transplantation. **(a)** Sections of control and GIPR tissues probed for the expression of Ki-67 proliferation-associated antigen. Ki-67 labeling (dark nuclei) was infrequent in the control tissue (left), whereas GIPR tissue (right) showed extensive staining. A, adrenocortical tissue; K, kidney. Scale bars, 100 μ m **(b)** Box-and-whisker plot of labeling proliferation index in control and GIPR tissues, data corresponding to the number of Ki-67 positive cells per 100 adrenocortical cells, graphical statistical summary of 10 tissue sections/variable (*, $P < 0.001$). **(c)** Bax/Bcl-xL ratio is given at the bottom of the panel as pro-apoptotic index.

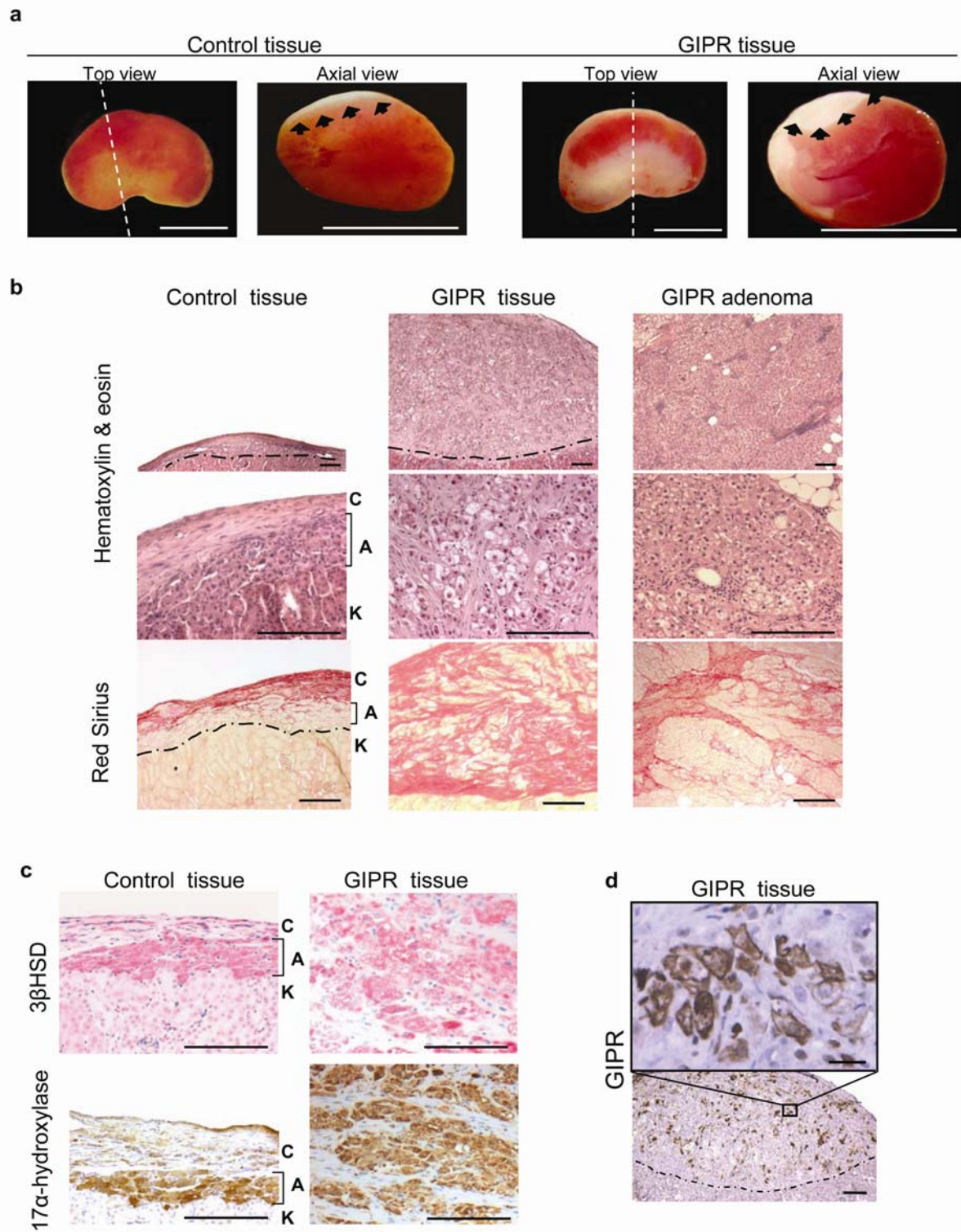
Figure 5 Influence of ACTH suppression on the histological structure of adrenocortical transplants. Control and GIPR cells were transplanted beneath the kidney capsule of adrenalectomized mice that received continuous s.c. dexamethasone perfusion. The development of the transplanted tissues was analyzed on day 14 post-transplantation. C, kidney capsule; A, adrenocortical tissue; K, kidney. Scale bars, 100 μ m.



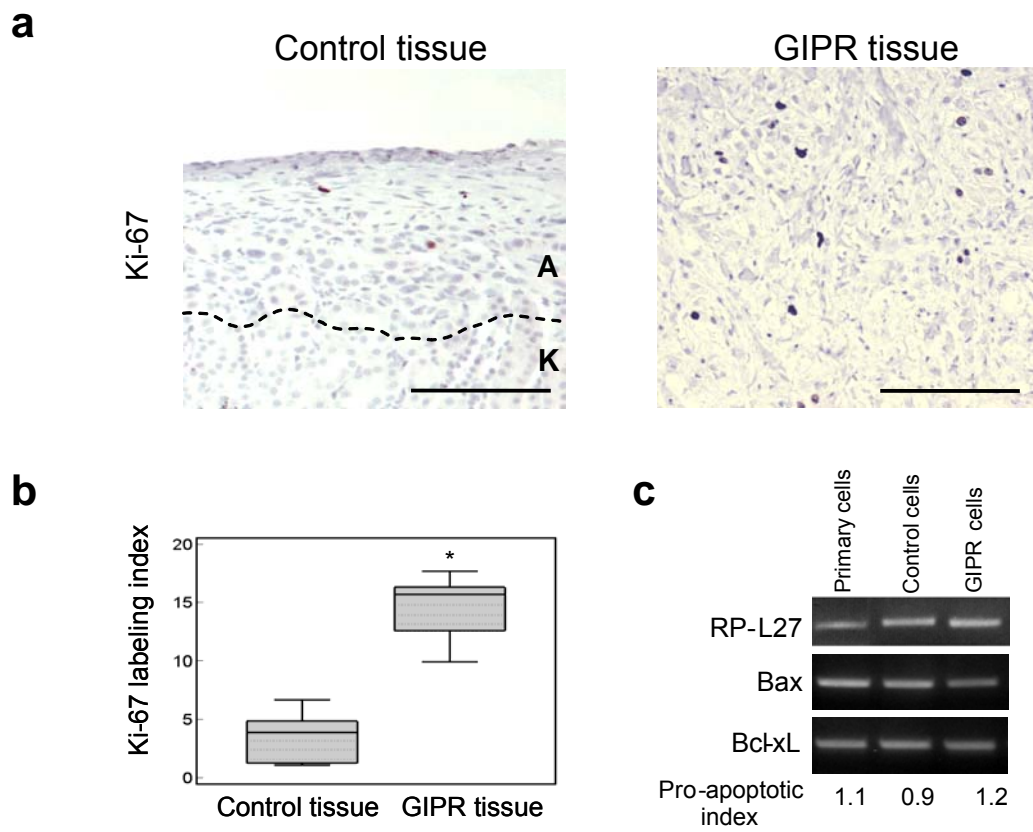
(Fig 1)



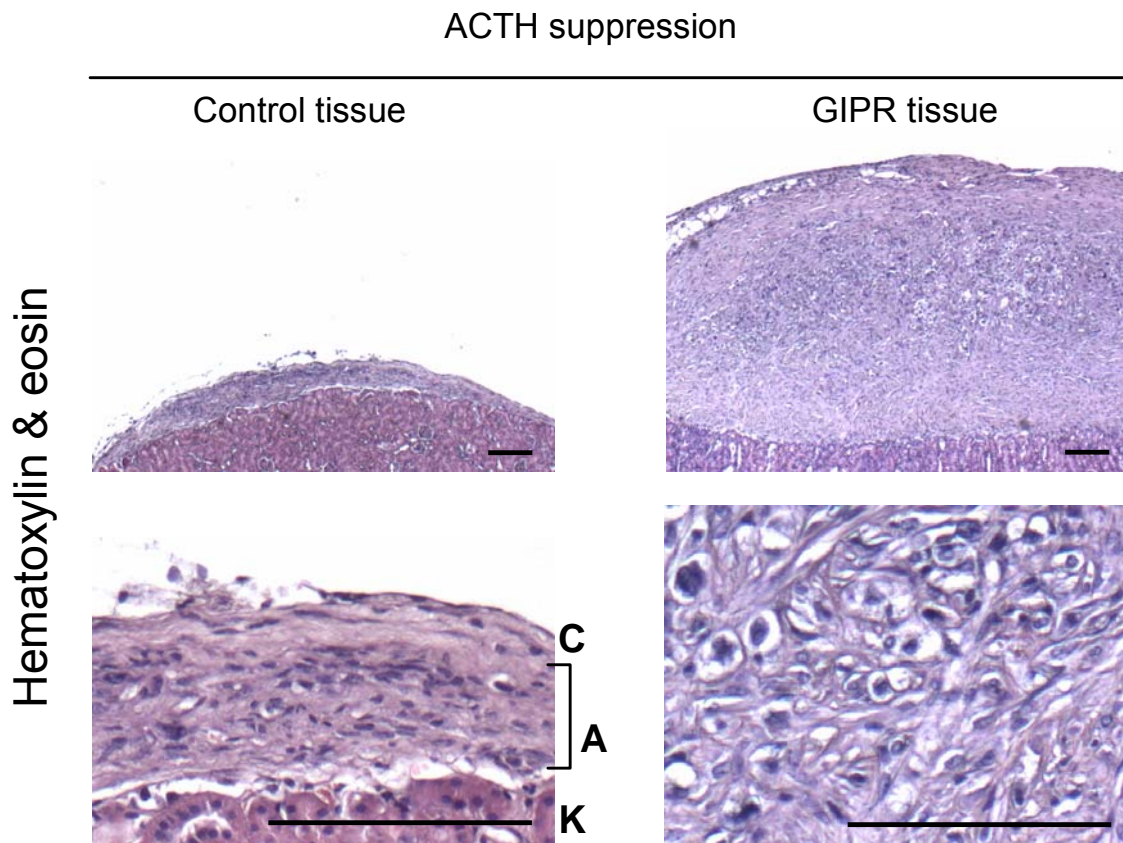
(Fig 2)



(Fig 3)



(Fig 4)



(Fig 5)

Discussion

L'expression surrénalienne des récepteurs ectopiques comme le GIPR est un objet d'intérêt dans l'endocrinologie actuelle, car il peut être lié à un syndrome de Cushing très intéressant du point de vue physiopathologique ajouté au fait de sa détection croissante dans des tumeurs bénignes cortico-surréaliennes. Dans un travail précédent, notre équipe avait mis en évidence l'expression ectopique du GIPR dans un adénome surrénalien. Cependant, la contribution de l'expression ectopique de ce récepteur au processus de prolifération et de transformation cellulaire n'a pas pu être clairement établie. Dans ce travail, nous avons développé un modèle animal dans lequel cette hypothèse a pu être testée directement, en utilisant des cellules surréaliennes primaires normales génétiquement modifiées par infection rétrovirale afin de leur faire exprimer le gène du GIPR.

Nos résultats montrent que la transplantation des cellules BAC/GIP-R chez les souris Rag2^{-/-} surrénalectomisées permet le développement d'un néo-tissu cortico-surrénalien élargi qui exprime le GIPR. Contrairement au greffon contrôle qui exhibe une architecture trabéculaire bien organisée, le greffon BAC/GIPR présente une cellularité hétérogène, avec atypies nucléaires, présence d'un stroma, taux de prolifération élevé et un aspect encapsulé. Certaines caractéristiques histologiques sont retrouvées dans les hyperplasies macronodulaires ainsi que dans les adénomes surréaliens. Cependant, la présence d'un stroma prononcé dans un tissu qui s'isole par une capsule fait plutôt penser à un adénome. Le but de ce travail n'était pas de réaliser une reproduction absolue d'une lésion humaine à partir de cellules bovines transplantées chez la souris, mais de caractériser le néo-tissu obtenu à partir des cellules qui ont acquis un nouveau gène, le GIPR. La nouvelle donnée que cette étude apporte est la démonstration de la transformation tumorale bénigne comme conséquence de la seule introduction d'un gène non muté codant pour un récepteur couplé aux protéines G.

Lors du traitement par de la dexaméthasone des souris transplantées pendant la prise du greffon, un tissu tumoral identique au précédent a été obtenu chez les souris BAC/GIPR. Ceci malgré le freinage complet de la sécrétion d'ACTH, alors que les souris BAC-contrôle transplantées n'ont pas développé de néo-tissu organisé (Figure 20). Si l'ACTH a un rôle important dans la prolifération cellulaire pendant la prise du greffon, il est également

indispensable pour la différenciation de ces cellules restées plusieurs jours en culture avant leur transplantation. Nos résultats suggèrent que chez les souris BAC/GIPR le GIP est capable de substituer les fonctions de l'ACTH et, en plus, d'induire le développement des tumeurs bénignes.

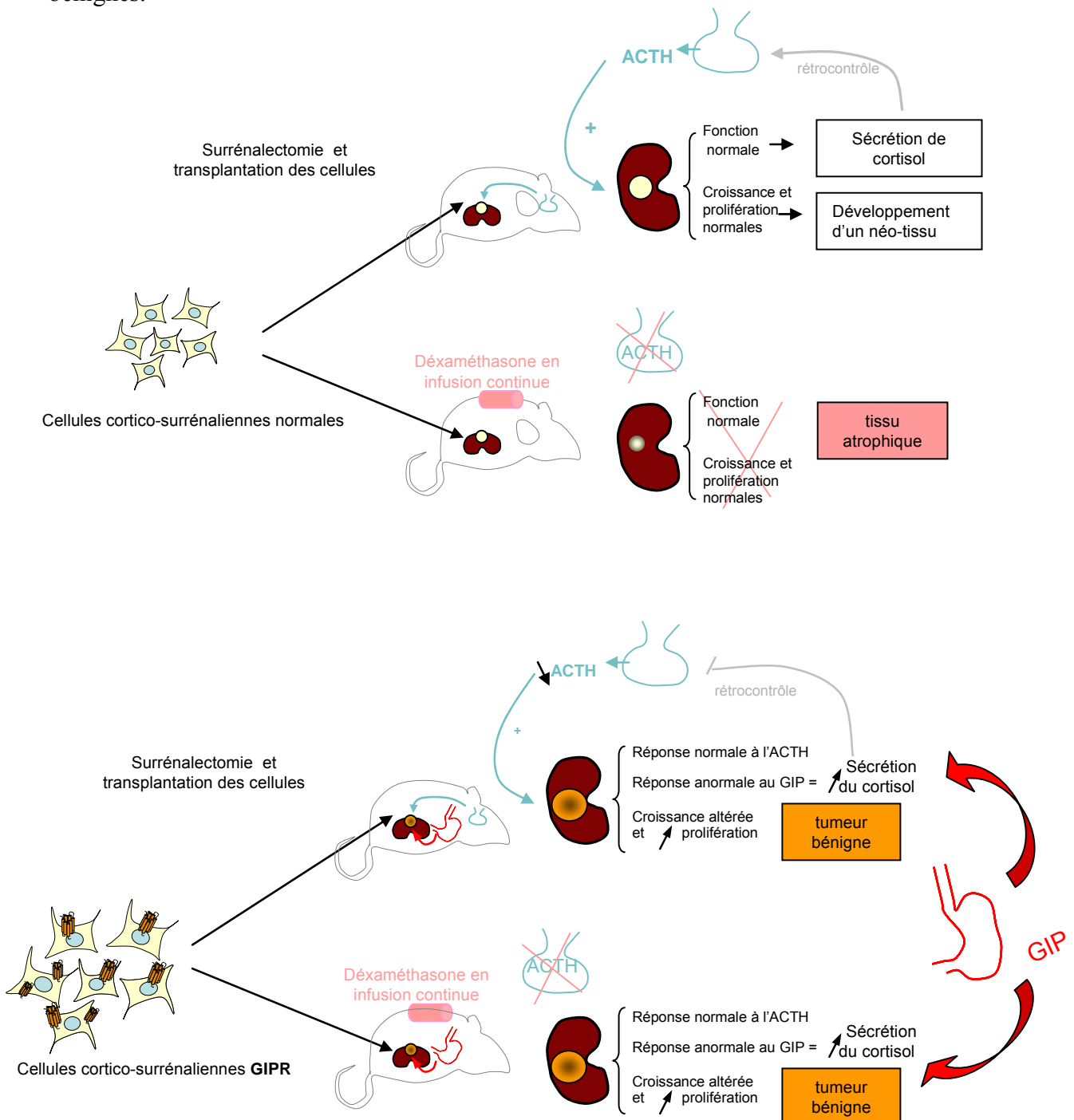


Figure 20. Représentation schématique du modèle d'expression ectopique du GIPR dans le cortex surrénalien. Démonstration de son rôle causal dans la formation tumorale bénigne indépendant de l'ACTH.

Ce travail est la première démonstration du pouvoir transformant de l'expression ectopique du GIPR dans le cortex surrénalien. Ainsi, cet événement génétique unique est responsable à la fois de l'hyperprolifération surrénalienne et du dérèglement de la synthèse du cortisol observé dans le syndrome de Cushing lié à l'alimentation.

But de l'étude

Malgré le nombre croissant de récepteurs surrenaliens aberrants liés au syndrome de Cushing qui sont détectés par des tests cliniques, leur prévalence réelle est probablement encore sous-estimée. Cependant, les données actuellement disponibles permettent de conclure que ces récepteurs sont plutôt exprimés dans des pathologies bénignes de la surrenale. Le processus évolutif de la tumorigénèse cortico-surrénalienne n'a pas été éclairci comme l'a été celui des tumeurs du colon. Celui-ci présente une progression des lésions pré-tumorales en passant par des lésions bénignes pour aboutir aux lésions malignes, progression corrélée à une accumulation progressive d'anomalies génétiques bien identifiées. La notion d'évolution par étapes semble pouvoir être aussi appliquée aux tumeurs cortico-surréaliennes, selon certaines données. Il existe des anomalies génétiques reconnues qui caractérisent le phénotype malin dans le cortex surrenalien (système des IGFs, gènes de la région 11p15). Néanmoins, les facteurs impliqués dans les étapes précoces de la tumorigénèse ne sont pas connus. Le rapport entre l'expression surrenalienne aberrante des récepteurs couplés aux protéines Gs et les lésions surrenaliennes bénignes soulève une question concernant la participation de ces récepteurs au processus de développement tumoral : en sont-ils une cause ou une conséquence ? Basés sur ces données ainsi que sur l'importance de la voie AMPc (devant l'existence de mutations activatrices) dans la formation de certaines tumeurs endocrines, nous avons émis l'hypothèse d'une implication causale de ces récepteurs. Nous avons choisi deux récepteurs dont l'implication dans les manifestations cliniques a été bien démontrée : le récepteur du GIP et celui de la LH. Un modèle de transplantation hétérologue de cellules cortico-surréaliennes venant d'être mis en place dans notre laboratoire, il nous était possible de faire exprimer le gène d'un récepteur donné dans ce système. Au contraire de l'utilisation des cellules tumorales qui peuvent présenter une série d'altérations génétiques inconnues avant la transplantation, la stratégie de modifier génétiquement une cellule cortico-surrénalienne normale crée un système clair qui permet de comprendre l'implication d'un seul gène dans la tumorigénèse cortico-surrénalienne.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail a été d'établir des cellules cortico-surréaliennes bovines génétiquement modifiées, de les caractériser *in vitro* et de valider leur utilisation dans ce modèle *in vivo*. Dans un second temps, nous avons donc étudié l'influence de l'expression anormale des gènes choisis (GIPR et LH/hCGR) dans la formation d'un tissu cortico-surrénalien en s'attachant à l'étude des modifications de la prolifération cellulaire (tissu normal, hyperplasique ou tumeur plus évoluée?) et de la stéroïdogénèse (fonctionnalité du tissu obtenu, présence d'hypercortisolisme clinique?). Ces objectifs ont été accomplis dans la première partie de ce travail (Résultats A et B).

Dans la deuxième partie, j'ai étudié un nouveau cas clinique d'expression de récepteurs aberrants lié à une lésion surrénalienne bénigne, détectée et suivie cliniquement dans le service d'Endocrinologie du CHU de Grenoble. L'exploration clinique laissait conclure à l'expression de récepteurs β -adrénergiques comme décrit dans de rares cas. Ainsi, nous avons réalisé une caractérisation *in vivo* et *in vitro* d'un cas de syndrome de Cushing sensible aux catécholamines, dans le but de mieux comprendre l'implication de l'expression des récepteurs β -adrénergiques dans l'hyperplasie macronodulaire surrénalienne, ainsi que de déterminer le (les) type (s) de récepteur (s) participant dans ce cas spécifique afin d'établir une corrélation entre les données *in vitro* et les données cliniques.

3. Le syndrome de Cushing et les récepteurs surrénaliens aberrants

L'étude *in vitro*, sur différents modèles de lignées cellulaires tumorales de rat, de souris ou sur des tumeurs bénignes ou malignes humaines, avait depuis de nombreuses années laissé supposer l'existence de récepteurs membranaires illégitimes dans le cortex surrénal. A partir de la première description du syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation (Hamet, Larochelle *et al.*, 1987), les constatations *in vitro* ont pu trouver une signification *in vivo*. Par la suite, d'autres récepteurs hormonaux aberrants ont été impliqués dans certains cas particuliers d'hypercortisolisme. Le dépistage systématique par des tests biologiques ainsi que la découverte de plus en plus précoce des incidentalomes surrénaliens révèle actuellement une multitude de situations liées à ces RCPGs illégitimes, comme leur détection à partir de lésions surrénaliennes responsables d'un syndrome de Cushing infra-clinique, la découverte des cas familiaux, ou la présence concomitante de plusieurs récepteurs hormonaux dans les lésions surrénaliennes. Ce chapitre récapitule ces études assez récentes qui composent peut-être la partie visible de l'iceberg des lésions surrénaliennes, découvertes grâce à l'avancement des techniques diagnostiques.

3.1 Syndrome de Cushing surrénalien

Le syndrome de Cushing est le résultat d'une production excessive et chronique de cortisol et d'autres stéroïdes d'origine surrénalienne (Newell-Price, Trainer *et al.*, 1998; Boscaro, Barzon *et al.*, 2001). Parmi les formes endogènes d'hypercortisolisme, les adénomes hypophysaires qui sécrètent de l'ACTH en excès (correspondant à la maladie de Cushing) constituent la plus grande majorité; ceux-ci et les rares formes de syndrome paranéoplasique (sécrétion extra-hypophysaire d'ACTH) forment le groupe du syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH (Figure 13). Les tumeurs surrénaliennes contribuent à 15 - 30 % du total des étiologies du syndrome de Cushing ; l'anomalie dans ce cas est primitivement surrénalienne et l'hypercorticisme, par rétrocontrôle négatif, supprime la sécrétion de CRH et d'ACTH.

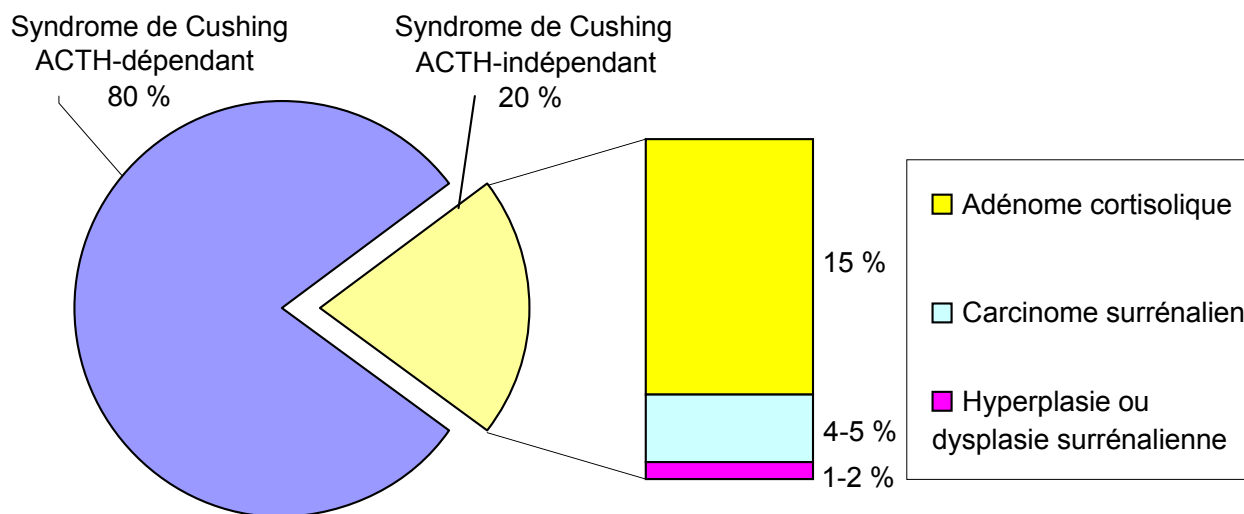


Figure 13. Prévalence des étiologies du syndrome de Cushing de l'adulte.

L'expression clinique du syndrome de Cushing est multiple car les récepteurs des glucocorticoïdes sont présents dans une vaste majorité de tissus (Yanovski et Cutler, 1994). Les autres facteurs à considérer sont l'âge du patient, l'intensité de l'hypercorticisme, son ancienneté, son étiologie et des variations individuelles de sensibilité des tissus à l'hypercorticisme. Plusieurs symptômes et signes n'ont pas de caractère spécifique, comme la prise pondérale, l'hypertension artérielle, les troubles de la glycorégulation, fréquemment rencontrés dans la population générale (Newell-Price, Trainer *et al.*, 1998). D'une manière très large, c'est l'association de deux ou plus de ces altérations qui attire l'attention du clinicien : dyslipidémie, diabète, hypertension artérielle, ostéoporose, sensibilité accrue aux infections, troubles de règles ou de la libido, troubles psychiatriques, et plus spécifiquement l'atrophie cutanée, la fragilité capillaire, des vergetures larges et pourpres, une amyotrophie des racines des membres, une redistribution facio-tronculaire des graisses et, chez la femme, séborrhée, acné et hirsutisme. La détection précoce du syndrome de Cushing est un impératif pour réduire sa morbi-mortalité ; la faible expression des symptômes (ou leur acceptation par le patient) exige du clinicien un œil attentif afin de suspecter ce diagnostic chez des patients à priori sans plaintes (Muller, Mazzuco *et al.*, 2003).

Les formes paucisymptomatiques peuvent correspondre à des formes débutantes, à un hypercorticisme modéré ou intermittent, ou peut-être à une sensibilité particulière de certains tissus chez un individu donné. Ainsi, devant un diabète sucré de présentation atypique ou se déséquilibrant sans cause évidente, on est amené à rechercher un syndrome de Cushing (Leibowitz, Tsur *et al.*, 1996; Catargi, Rigalleau *et al.*, 2003). Ces formes sont à rapprocher des adénomes cortisoliques infra-cliniques ou silencieux découverts fortuitement.

D'autres formes atypiques peuvent être retrouvées. Le syndrome de Cushing avec perte de poids évoque une origine paranéoplasique, caractérisé par une prédominance des signes cataboliques; l'obésité facio-tronculaire est peu marquée. Chez l'enfant ou chez l'adolescent, les signes de Cushing peuvent varier. L'aspect classique de répartition centripète des graisses paraît en particulier moins fréquent. Il en est de même de la fragilité cutanée, de la tendance ecchymotique et de la myopathie des ceintures. Le diagnostic devra par contre être envisagé devant le ralentissement de la croissance staturale, parfois associé à une prise pondérale paradoxale, et un impubérisme chez l'adolescent (Stewart, 2003).

D'autre part, chez les animaux, on peut retrouver des manifestations cliniques similaires à ce que l'on retrouve classiquement chez l'homme (Ettinger et Feldman, 2005), surtout chez les équidés qui ont une prévalence accrue de syndrome de Cushing avec le vieillissement. Chez le chien, le chat et la souris, les signes cataboliques sont marqués ; l'atrophie musculaire associée à un retard de croissance peut provoquer une perte de poids qui n'est pas rare (Stenzel-Poore, Cameron *et al.*, 1992; Yano, Readhead *et al.*, 1998; Tronche, Kellendonk *et al.*, 1999; Ettinger et Feldman, 2005). Toutefois, certains types de souris présentent une obésité fascio-tronculaire quand l'hypercorticisme est sévère (Laurent, Kimble *et al.*, 2002). L'effet sur le pelage varie également en fonction de l'espèce et du profil de sécrétion des androgènes (Ettinger et Feldman, 2005).

3.2 Récepteurs surrenaliens aberrants

3.2.1 Premières descriptions *in vitro*

L'expression surrenalienne illégitime des récepteurs à 7 domaines transmembranaires a été suggérée initialement par des études *in vitro* en 1971, lors de la démonstration d'une stimulation anormale des cellules cortico-surrenaliennes (Schorr et Ney, 1971; Schorr, Rathnam *et al.*, 1971). Ainsi, sur des préparations de membranes de cellules corticales normales de rat, seule l'ACTH a été capable de stimuler l'AC ; toutefois, l'étude du carcinome cortico-surrenalien de rat (lignée 494) a démontré une élévation de l'AC en réponse à d'autres hormones que l'ACTH, notamment la noradrénaline, l'adrénaline, la TSH, la LH, la FSH et la prostaglandine E₁. L'effet des récepteurs α - et β -adrénergiques a été confirmé par d'autres auteurs (Williams, Gore *et al.*, 1977; Perchellet et Sharma, 1980; Shanker et Sharma, 1980). Dans ce type de carcinome, l'effet sur l'AC n'était pas lié à la stéroïdogénèse (Brush, Sutliff *et al.*, 1974). Une autre lignée de cellules tumorales du cortex surrenalien (Y1 *mouse cell line*) étudié précédemment n'exhibait pas les réponses anormales mentionnées pour les cellules 494 (Taunton, Roth *et al.*, 1969).

Ensuite, des tumeurs humaines ont été étudiées avec démonstration de la liaison récepteur-hormone ou de la stimulation de l'AC par certains ligands comme ceux cités ci-dessus ou encore la GH, l'hormone lactogène placentaire, le glucagon, l'insuline, l'angiotensine II ou l'interleukine 1. La réponse anormale à un ou plusieurs ligands a été observée dans le cas de certains carcinomes cortico-surrenaliens sécrétants (Millington, Golder *et al.*, 1976; Katz, Kelly *et al.*, 1985), de quelques adénomes (Pittaway, Andersen *et al.*, 1973; Matsukura, Kakita *et al.*, 1980; Hirata, Uchihashi *et al.*, 1981; Willenberg, Stratakis *et al.*, 1998) et d'une hyperplasie primaire (Matsukura, Kakita *et al.*, 1980). Cette réponse aberrante n'était pas présente dans toutes les tumeurs examinées (Matsukura, Kakita *et al.*, 1980; Katz, Kelly *et al.*, 1985), mais sa description a introduit une notion nouvelle dans la pathologie du cortex surrenalien.

3.2.2 Expressions cliniques

L'activation des récepteurs exprimés de façon exagérée (expression eutopique) ou de récepteurs inédits dans le cortex surrénalien (expression ectopique) peut conduire à un tableau clinique particulier et physiologiquement intéressant, comme le mécanisme impliqué dans le syndrome de Cushing sensible à l'alimentation, présenté dans la Figure 14, où le GIP est responsable de la stimulation de la sécrétion du cortisol. Le premier cas a été décrit en 1987 et sa physiopathologie éclaircie en 1992 (détaillée dans l'item suivant). Dix ans plus tard, les catécholamines et la vasopressine feront partie du groupe de ligands des récepteurs illégitimes responsables d'un Cushing surrénalien; la LH et la sérotonine (mise en évidence en 1999) et encore d'autres membres composent cette famille actuellement.

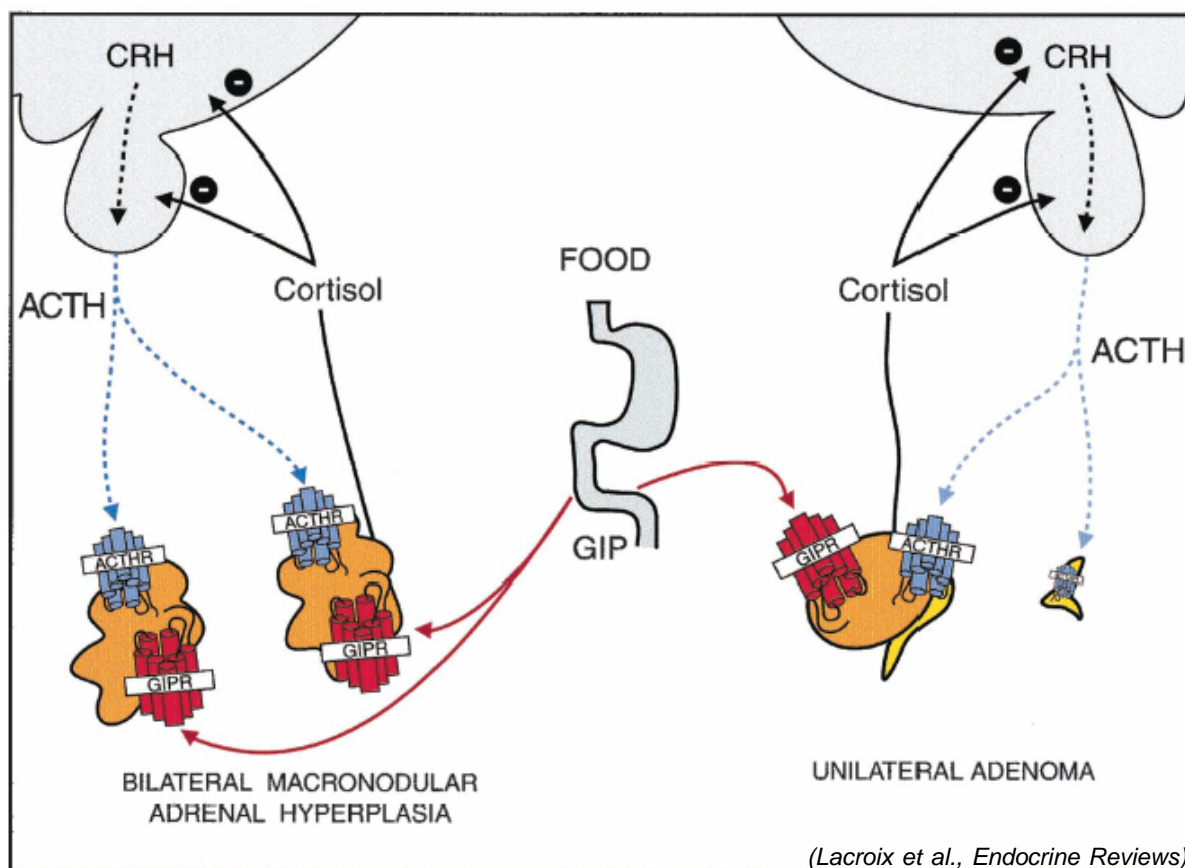


Figure 14. Physiopathologie du syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation.

La sécrétion post-prandiale de GIP assume le contrôle de l'axe corticotrope par stimulation de ses récepteurs surrénaliens ectopiques.

- Récepteur du GIP

Le GIP (*gastric inhibitory polypeptide* ou *glucose-dependent insulintropic polypeptide*) est un peptide duodénal libéré par l'arrivée du bol alimentaire. Cette hormone digestive agit sur un récepteur couplé aux protéines Gs et possède de multiples actions digestives dont la principale est la stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta des îlots pancréatiques (Wideman et Kieffer, 2004). Ces récepteurs n'ont aucun rôle dans les cellules cortico-surréaliennes humaines normales. Ainsi l'expression surrenalienne ectopique du récepteur du GIP (GIPR) pourrait créer une activation alternative de la voie de la stéroïdogenèse via l'AMP cyclique, ce qui peut mimer la stimulation du cortisol par l'ACTH.

Le premier cas de syndrome de Cushing sensible à l'alimentation (Hamet, Larochelle *et al.*, 1987) a été identifié chez un patient du sexe masculin âgé de 41 ans, présentant un syndrome de Cushing en rapport avec un adénome surrenalien unilatéral. La sécrétion de cortisol était périodique, avec un taux de cortisol plasmatique bas le matin ou après une période de jeûne, et des taux pathologiques retrouvés après les repas. Après un traitement chirurgical, le tissu provenant de l'adénome cortico-surrenalien gauche a été étudié *in vitro* : une stimulation de l'AC a été observée en réponse à l'ACTH et à la vasopressine. Les auteurs ont conclu à une synthèse tumorale de cortisol en réponse à un facteur lié à l'alimentation qui n'a pas été identifié dans ce cas. Quelques années plus tard, deux cas d'AIMAH avec syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation ont permis d'élucider la physiopathologie de ces hypercorticismes (Lacroix, Bolte *et al.*, 1992; Reznik, Allali-Zerah *et al.*, 1992). L'injection de glucose en intraveineux étant sans effet alors que le cortisol s'élevait après l'alimentation, l'implication d'hormones gastro-intestinales comme le GIP et le *glucagon-like peptide* (GLP) fut suspectée. En effet, il existait une corrélation nette entre le taux sanguin de GIP et de cortisol, et la réponse anormale du cortex surrenalien au GIP a été confirmée et détaillée dans ces deux cas.

Six ans plus tard, d'autres cas de syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation ont été rapportés. Un nouveau cas d'adénome surrenalien a été décrit par notre équipe (Chabre, Liakos *et al.*, 1998); cette tumeur bénigne et cinq autres (adénomes et AIMAHs) ont été caractérisées *in vitro* à cette époque (Chabre, Liakos *et al.*, 1998; Lebrethon, Avallet *et al.*, 1998; N'Diaye, Tremblay *et al.*, 1998). Le caractère ectopique de l'expression du récepteur du GIP au niveau surrenalien a été mis en évidence par des

techniques d'hybridation *in situ* ou d'amplification par RT-PCR. La présence du récepteur a été démontrée de façon certaine dans le tissu surrenalien pathologique uniquement. Le séquençage de l'ADN complémentaire du récepteur du GIP n'a pas détecté de mutations (N'Diaye, Tremblay *et al.*, 1998). Des études *in vitro* ont montré que le GIP stimule la production de cortisol par l'intermédiaire d'une augmentation de l'AMPc (Chabre, Liakos *et al.*, 1998; Lebrethon, Avallet *et al.*, 1998).

Ultérieurement, cette nouvelle notion a conduit à la recherche d'une réponse du cortisol après un repas chez des patients porteurs d'un Cushing surrenalien, ce qui a permis d'identifier plusieurs cas qui ont été également caractérisés comme « hypercortisolisme dépendant du GIP ». Au total, 20 cas d'AIMAH (Lacroix, Bolte *et al.*, 1992; Reznik, Allal-Zerah *et al.*, 1992; Archambeaud-Mouveroux, Comas *et al.*, 1996; N'Diaye, Tremblay *et al.*, 1998; N'Diaye, Hamet *et al.*, 1999; Pralong, Gomez *et al.*, 1999; Croughs, Zelissen *et al.*, 2000; Lacroix, N'Diaye *et al.*, 2000; Lacroix, Ndiaye *et al.*, 2001; Groussin, Perlemoine *et al.*, 2002; Bertherat, Contesse *et al.*, 2004) et 7 cas d'adénome cortico-surrenalien (Hamet, Larochelle *et al.*, 1987; de Herder, Hofland *et al.*, 1996; Chabre, Liakos *et al.*, 1998; Combes, Bourrinet-Pellet *et al.*, 1998; Lebrethon, Avallet *et al.*, 1998; Luton, Bertherat *et al.*, 1998; Tsagarakis, Tsigos *et al.*, 2001; Noordam, Hermus *et al.*, 2002) ont été décrits dans ce contexte. Aucun cas de malignité liée à l'expression ectopique du GIP n'a été détecté parmi 8 cas de carcinomes cortico-surrenaliens recherchés (Groussin, Perlemoine *et al.*, 2002).

L'action principale du GIP sur son récepteur normalement exprimé dans les cellules pancréatiques se résume classiquement à l'activation de l'AC/PKA/AMPc, ce qui va aboutir à l'élévation de la concentration intracellulaire en calcium et l'exocytose de l'insuline (Lu, Wheeler *et al.*, 1993). Par contre, la participation d'autres mécanismes dans la signalisation pancréatique du GIPR a été démontrée (Trumper, Trumper *et al.*, 2001). Ainsi, le GIP a un rôle mitogénique et anti-apoptotique sur les cellules β -pancréatiques, grâce à l'activation directe des voies des MAPKs et de PI3K/Akt (ou protéine kinase B). Dans le cas de l'expression surrenalienne ectopique du GIPR, les voies de signalisation n'ont pas été encore disséquées. A ce jour, il est admis que l'hypercortisolisme trouvé dans cette pathologie est une conséquence de l'activation de la voie de l'AC/PKA, ayant l'AMPc comme second messenger (Chabre, Liakos *et al.*, 1998; Lacroix, Baldacchino *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré que le GIP est capable d'augmenter l'activité des MAPKs et de stimuler l'incorporation de thymidine au niveau de l'ADN d'une façon similaire à l'ACTH, ce qui peut

suggérer une participation du GIP dans la prolifération cellulaire de la surrenale tumorale (Chabre, Liakos *et al.*, 1998).

- Récepteurs des catécholamines

La présence des récepteurs bêta-adrénergiques responsables d'une activation de la voie de l'AC a été initialement suggérée dans quelques tissus cortico-surréaliens tumoraux étudiés *in vitro* sans rapport avec une présentation clinique particulière (Matsukura, Kakita *et al.*, 1980; Hirata, Uchihashi *et al.*, 1981; Katz, Kelly *et al.*, 1985; Kosti, King *et al.*, 2002); dans le cortex surrealien normal, la présence de ces récepteurs n'a jamais été démontrée. A ce jour, la démonstration de l'implication *in vivo* du système adrénérique dans les syndromes de Cushing d'origine surrealienne a pu être faite chez six patients, tous porteurs d'une AIMAH sensible à l'orthostatisme et/ou d'un hypercortisolisme réduit ou normalisé par un β -bloquant (propranolol). Le premier patient décrit présentait une élévation du cortisol en orthostatisme et en réponse à l'infusion d'un agoniste β -adrénérique, l'isoprotérenol ; le taux urinaire de cortisol a été abaissé sous traitement par β -bloquant, mais pas par un inhibiteur des récepteurs V1 de la vasopressine ou un inhibiteur du système rénine-angiotensine (Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997a). Après une surrenalectomie unilatérale et l'étude du tissu tumoral, la présence de sites de liaison β -adrénérique a pu être confirmée, avec un couplage efficace à la voie de l'AMPc. Dans un autre cas d'AIMAH, une patiente présentait une réponse anormale du cortisol à l'orthostatisme et à l'hypoglycémie insulinique (Mircescu, Jilwan *et al.*, 2000) ; son hypercortisolisme s'est avéré sensible à la fois à l'AVP et aux catécholamines ; La réalisation d'études *in vitro* après la surrenalectomie n'a pas été possible. Trois autres cas d'hyperplasie surrealienne ont fait aussi l'objet d'une description clinique devant un hypercortisolisme sensible aux catécholamines, notamment sensible aux bêta-bloquants (Imohl, Koditz *et al.*, 2002; Mazzuco, Martinie *et al.*, 2002; Pignatelli, Rodrigues *et al.*, 2004). Une autre équipe a rapporté un cas d'hypercortisolisme avec réponse aberrante multiple mais parfois faible liée à une AIMAH de récepteurs aberrants, le principal ligand étant l'AVP ; malgré la réponse clinique aux catécholamines, la recherche des ARNm pour démontrer l'expression des récepteurs β -adrénériques par RT-PCR a été négative (Miyamura, Tsutsumi *et al.*, 2003). Parmi les adénomes, il n'y a pas de démonstration

formelle d'une expression anormale des récepteurs β -adrénergiques associée à un syndrome de Cushing cliniquement sensible aux catécholamines ; les descriptions de la littérature se résument soit à des incidentalomes avec une réponse mixte du cortisol à l'orthostatisme et à d'autres tests cliniques (Reznik, Lefebvre *et al.*, 2004), soit à des études *in vitro* d'adénomes et carcinomes qui exhibent une réponse anormale aux β -agonistes, sans que l'on sache s'il existait une corrélation avec la clinique (Schorr, Rathnam *et al.*, 1971; Williams, Gore *et al.*, 1977; Matsukura, Kakita *et al.*, 1980; Hirata, Uchihashi *et al.*, 1981; Katz, Kelly *et al.*, 1985; Kosti, King *et al.*, 2002).

- Récepteur de la vasopressine

La vasopressine (ou ADH pour *antidiuretic hormone*), sécrétée par l'hypophyse postérieure, stimule la réabsorption de l'eau par les tubules rénaux en agissant sur ses récepteurs, principalement sur le rein, mais présents aussi dans de nombreux tissus, notamment au niveau vasculaire (effet vasoconstricteur). Trois sous-types de récepteurs membranaires ont été distingués : le V1-vasculaire, V2-rénal et le V3-pituitaire (aussi appelé V1b) (Thibonnier, Coles *et al.*, 2002). Le récepteur V1 est normalement exprimé dans le cortex surrénal, où il a une discrète participation dans la stéroïdogénèse. Ce récepteur eutopique est surexprimé dans certaines situations d'adénome ou d'AIMAH chez des patients présentant un Cushing sensible à l'orthostatisme (Horiba, Suda *et al.*, 1995; Perraudin, Delarue *et al.*, 1995; Iida, Kaji *et al.*, 1997; Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997b; Yamakita, Murai *et al.*, 1997; Arnaldi, Gasc *et al.*, 1998; Daidoh, Morita *et al.*, 1998; Mircescu, Jilwan *et al.*, 2000; Mune, Murase *et al.*, 2002). L'expression des récepteurs V2 et V3 dans les tumeurs du cortex surrénalien est beaucoup moins fréquente (Lacroix, Baldacchino *et al.*, 2004).

- Récepteur de la LH

Le récepteur de l'hormone lutéotrope peut aussi reconnaître une autre hormone très proche, la gonadotrophine chorionique humaine ; il est ainsi dénommé LH/hCGR et son activation par l'hCG stimule la production surrenalienne de DHEAS pendant la vie fœtale (Seron-Ferre, Lawrence *et al.*, 1978). Sa présence dans la surrénale adulte a

été démontrée au niveau de la zone réticulée et de la fasciculée profonde (Pabon, Li *et al.*, 1996). Un cas intéressant d'AIMAH a permis de démontrer le rôle du LH/hCGR dans cette pathologie : un tableau de syndrome de Cushing s'est présenté initialement de façon transitoire, récidivant pendant les grossesses et dès le début de la ménopause, puis devenu persistant après quelques années (Lacroix, Hamet *et al.*, 1999) (Figure 15). Des explorations dynamiques ont permis de montrer que la sécrétion de cortisol était stimulée par l'injection de gonadolibérine (GnRH), de LH ou de l'hCG ainsi que par l'administration orale de deux agonistes du récepteur 5-HT4 de la sérotonine. En revanche, l'injection de FSH (hormone folliculo-stimulante) n'avait aucun effet sur la sécrétion de cortisol, ce qui démontrait que l'action du GnRH était secondaire à la stimulation de la sécrétion de LH et non pas de FSH.

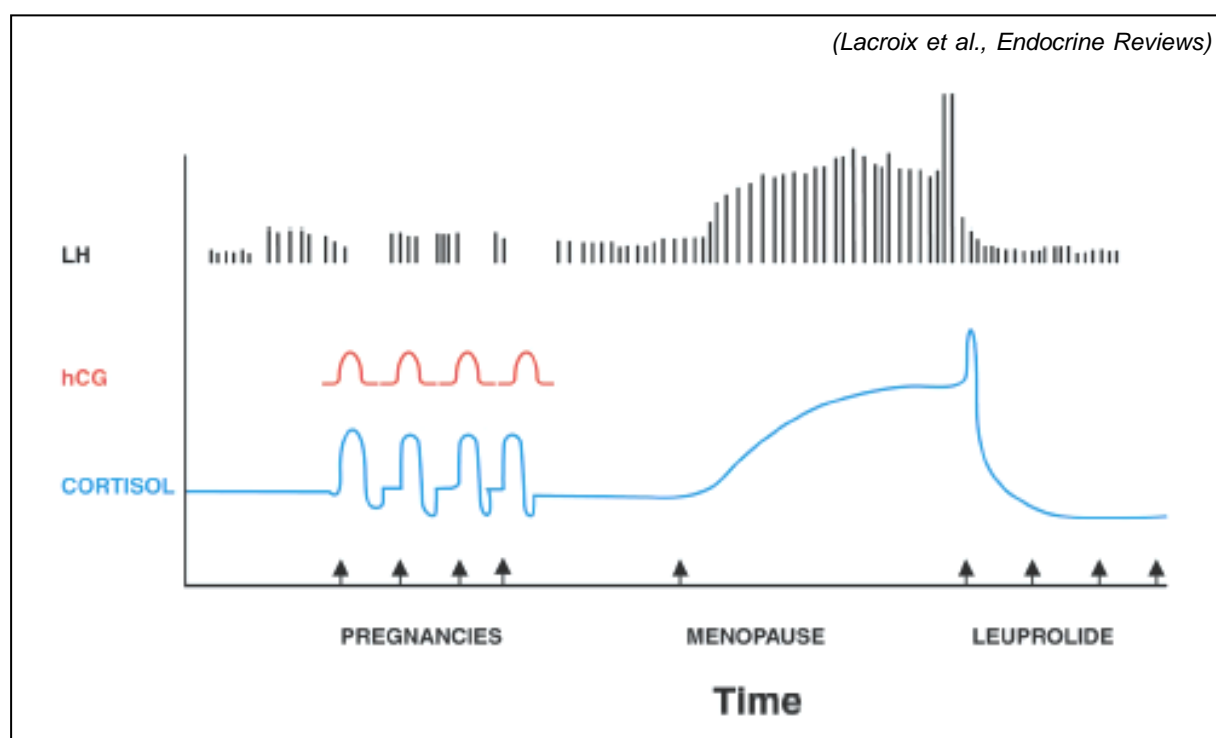


Figure 15. Profil de sécrétion de cortisol plasmatique dans un cas de Cushing secondaire à la surexpression du récepteur de LH/hCG. L'occupation transitoire et réversible de ce récepteur par hCG a eu lieu pendant les grossesses ; l'insuffisance ovarienne de la ménopause a causé l'élévation de la LH qui a été capable de stimuler la sécrétion du cortisol, normalisé par la suppression de la LH avec le leuprolide.

L'administration répétée d'un agoniste du GnRH (leuprolide), qui désensibilise le récepteur GnRH hypophysaire et supprime la sécrétion normale pulsatile de LH et de FSH, a permis de normaliser la sécrétion de cortisol. Cette étude a suggéré que la sécrétion de cortisol chez cette patiente était contrôlée par une expression anormale, dans le cortex surrenalien, des récepteurs LH/hCG et 5-HT₄.

Certains syndromes de Cushing d'origine surrenalienne peuvent apparaître ou s'aggraver pendant la grossesse et régresser après l'accouchement ou un avortement (Wieland, Shaffer *et al.*, 1971; Close, Mann *et al.*, 1993; Wallace, Toth *et al.*, 1996). Ces situations sont à explorer dans l'hypothèse d'un contrôle de la stéroïdogénèse par la LH ou les oestrogènes. Une autre situation particulière qui concerne l'expression exagérée des récepteurs LH/hCG est la stimulation des tumeurs surrenaliennes sécrétantes d'androgènes. Un nombre considérable de cas décrits dans la littérature rapporte une AIMAH ou un adénome cortico-surrenalien virilisant, pour la plupart, chez des femmes âgées de plus de 60 ans (Werk, Sholiton *et al.*, 1973; Givens, Andersen *et al.*, 1974; Blichert-Toft, Vejsted *et al.*, 1975; Larson, Vanderlaan *et al.*, 1976; Takahashi, Yoshizaki *et al.*, 1978; de Lange, Pratt *et al.*, 1980; Leinonen, Ranta *et al.*, 1991; Goodarzi, Dawson *et al.*, 2003). Les auteurs des publications les plus récentes ont pu confirmer qu'il s'agissait bien de cellules cortico-surrenaliennes et non pas de cellules gonadiques ectopiques (Leinonen, Ranta *et al.*, 1991; Goodarzi, Dawson *et al.*, 2003).

- Récepteur de la sérotonine

La sérotonine (5-HT) peut avoir un effet stéroïdogène sur les cellules cortico-surrenaliennes normales en activant son récepteur de type 4 (Lefebvre, Contesse *et al.*, 1992); elle est sécrétée de façon paracrine par les mastocytes. Les agonistes sérotoninergiques peuvent stimuler de façon faible la sécrétion de cortisol des adrénocytes *in vitro*, mais s'il y a une élévation du cortisol plasmatique *in vivo*, elle n'est pas détectable cliniquement (Lefebvre, Contesse *et al.*, 1998). Ainsi, l'expression aberrante des récepteurs 5-HT dans la surrenale est eutopique; sa première démonstration clinique a été le cas d'une expression combinée avec le LH/hCGR, comme décrit dans le paragraphe précédent (Lacroix, Hamet *et al.*, 1999), où la patiente a eu une bonne réponse au leuprolide, le traitement qui a supprimé la LH

circulante et donc a fait régresser le Cushing. Cependant, la cortisolémie était toujours augmentée en réponse à l'administration d'un agoniste du récepteur 5-HT4 de la sérotonine.

Quelques années plus tard, de nouveaux cas d'association de l'expression des gènes des récepteurs de la LH et de la 5-HT ont été rapportés (Feelders, Lamberts *et al.*, 2003). Une étude de 6 cas de syndrome de Cushing sensible à la sérotonine secondaire à une AIMAH a révélé la surexpression du gène de la 5-HT4 dans les surrénales hyperplasiques de 4 patients (Cartier, Lihmann *et al.*, 2003), ce qui a été également retrouvé dans un autre cas d'AIMAH publié la même année (Mannelli, Ferruzzi *et al.*, 2003). Des isoformes de 5-HT4R ont été identifiées dans le tissu pathologique mais aussi dans le tissu cortico-surrénalien normal ; aucune mutation activatrice de ces gènes n'a été démontrée.

- Autres cas particuliers de récepteurs surrénaliens aberrants

Parmi les récepteurs surrénaliens liés à un syndrome de Cushing décrits à ce jour, ceux classés comme étant ectopiques sont le GIPR et les récepteurs β -adrénergiques, alors que le 5-HT4R et le V1R sont considérés comme eutopiques et de ce fait, surexprimés dans le tissu surrénalien pathologique. Le LH/hCGR est dans une position « intermédiaire » car il semble être normalement exprimé dans la partie corticale proche de la zone médullaire mais pas au niveau des cellules plus externes du cortex surrénal. Des récepteurs encore plus rares ont été décrits dans la littérature. Ainsi, la participation du récepteur de l'angiotensine II a été suggérée dans un cas de syndrome de Cushing secondaire à une AIMAH (Nakamura, Son *et al.*, 2001), de même que le récepteur de la leptine (Pralong, Gomez *et al.*, 1999), mais il s'agit de cas isolés dont la physiopathologie reste à explorer.

La description de l'expression combinée des récepteurs devient de plus en plus fréquente dans la littérature, soit dans les hyperplasies, soit dans les adénomes, même s'il ne s'agit parfois que de descriptions cliniques sans confirmation *in vitro*. Quelques exemples sont l'expression mixte du LH/hCGR avec :

- le 5-HT4R (Lacroix, Hamet *et al.*, 1999; Feelders, Lamberts *et al.*, 2003)
- les récepteurs de la vasopressine (Miyamura, Tsutsumi *et al.*, 2003)
- le TRH ou le GIPR (Bertherat, Contesse *et al.*, 2004).

Un autre cas particulier a été une mutation *gsp* retrouvée dans un adénome responsable d'un syndrome de Cushing secondaire à l'expression aberrante du LH/hCGR (Bugalho, Li *et al.*, 2000).

L'évaluation de 20 cas de syndrome de Cushing franc a montré que la sécrétion de cortisol en réponse à l'activation de récepteurs aberrants (soit dans le cadre d'une expression isolée, soit mixte) était plus fréquente dans le groupe AIMAH que dans le groupe adénome (Mircescu, Jilwan *et al.*, 2000). Ces récepteurs ont été aussi identifiés dans des incidentalomes surrénaliens portant le diagnostic d'AIMAHs infra-clinique (Bourdeau, D'Amour *et al.*, 2001). D'autre part, l'étude de 21 cas d'incidentalome unilatéral surrénalien responsable d'un hypercortisolisme sous-clinique a révélé des réponses anormales multiples et très fréquentes dans ce type de lésion (Figure 16) (Reznik, Lefebvre *et al.*, 2004).

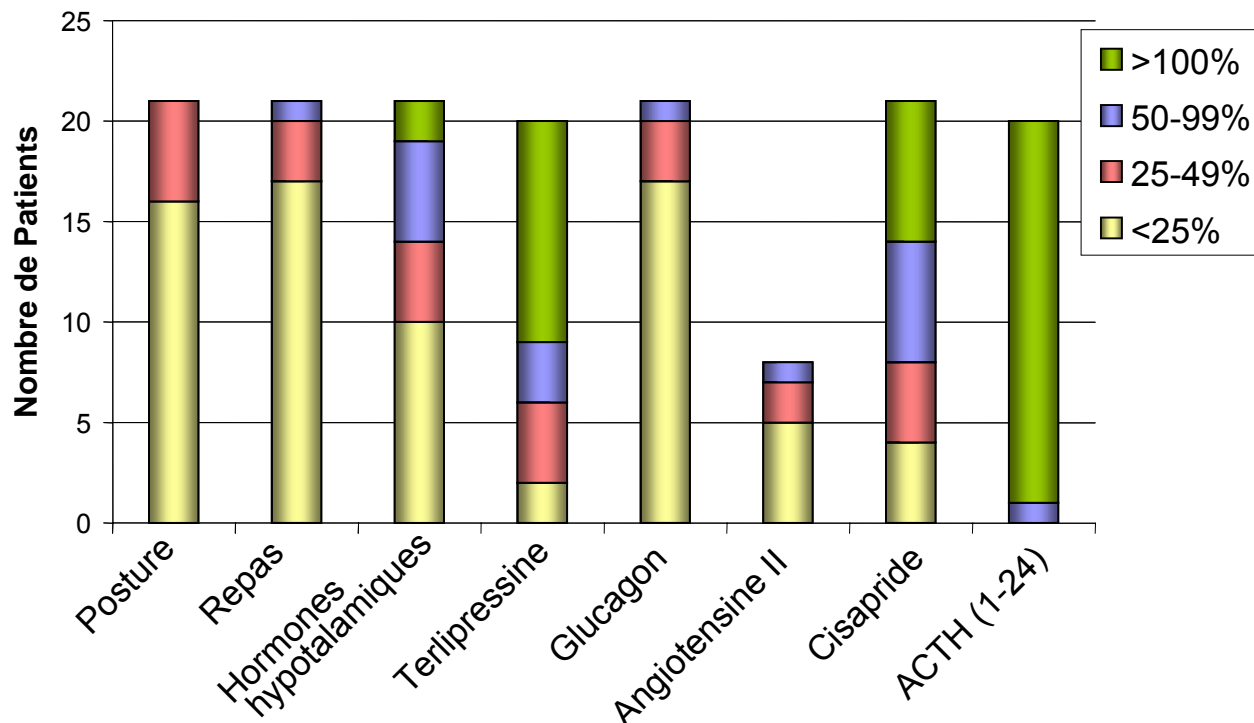


Figure 16. Réponse des patients porteurs d'un incidentalome surrénalien aux tests cliniques de recherche des récepteurs aberrants. Le pourcentage affiché dans la légende correspond à l'élévation du cortisol plasmatique en réponse au test indiqué.

Inversement à l'expression des récepteurs, leur propre ligand peut être anormalement exprimé, comme dans le cas de la sécrétion autocrine d'ACTH. La démonstration d'une sécrétion ectopique d'ACTH a été identifiée dans l'AIMAH en absence d'autre facteur stimulant (Pereira, Araujo *et al.*, 2001) ou associé à une réponse clinique à l'orthostatisme et au cisapride (Lefebvre, Duparc *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'AVP et la 5-HT, selon une étude récente, pourraient agir comme des facteurs paracrines issus de sous-populations de cellules stéroïdogènes identifiées dans des AIMAHs (Bertherat, Contesse *et al.*, 2004).

3.3 Explorations cliniques à la recherche d'une expression aberrante

La connaissance actuelle de la possibilité d'une expression aberrante de récepteur(s) associée à un syndrome de Cushing permet la découverte des réponses stéroïdogéniques anormales, en réalisant un dépistage clinique systématique, chez des patients porteurs d'une tumeur surrénalienne responsable d'un hypercortisolisme ou encore d'un incidentalome surrénalien asymptomatique. Ainsi, depuis la première description clinique d'une expression aberrante de récepteurs en 1987, la surveillance des paramètres plasmatiques comme le cortisol, l'ACTH et autres stéroïdes a été réalisée chez certains patients, en testant leur réponse à différents agonistes (Hamet, Laroche *et al.*, 1987; Lacroix, Bolte *et al.*, 1992; Reznik, Allali-Zerah *et al.*, 1992; Horiba, Suda *et al.*, 1995; Perraudin, Delarue *et al.*, 1995; Iida, Kaji *et al.*, 1997; Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997a; Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997b; Chabre, Liakos *et al.*, 1998; Daidoh, Morita *et al.*, 1998; Lebrethon, Avallet *et al.*, 1998; N'Diaye, Tremblay *et al.*, 1998). Ultérieurement, un protocole d'exploration hormonale a été élaboré, composé de tests initiaux de dépistage pouvant conduire à des tests spécifiques afin de déterminer le type de récepteur impliqué dans la réponse cortisolique anormale (Lacroix, Hamet *et al.*, 1999). La stratégie se résume à moduler la concentration plasmatique des ligands potentiels des récepteurs dont l'expression surrénalienne aberrante a déjà été décrite et à observer le niveau des stéroïdes en parallèle. Ainsi, des tests physiologiques (l'alimentation et la position orthostatique) et pharmacologiques (injection de GnRH ou de TRH) peuvent être réalisés comme dépistage initial. Un test avec réponse positive peut conduire à d'autres tests pharmacologiques où la réponse des stéroïdes à l'administration des agonistes spécifiques pourra déterminer le récepteur impliqué (Figure 17). Dans certains cas, des drogues antagonistes ou d'autres types d'inhibiteurs du ligand en question peuvent être testés.

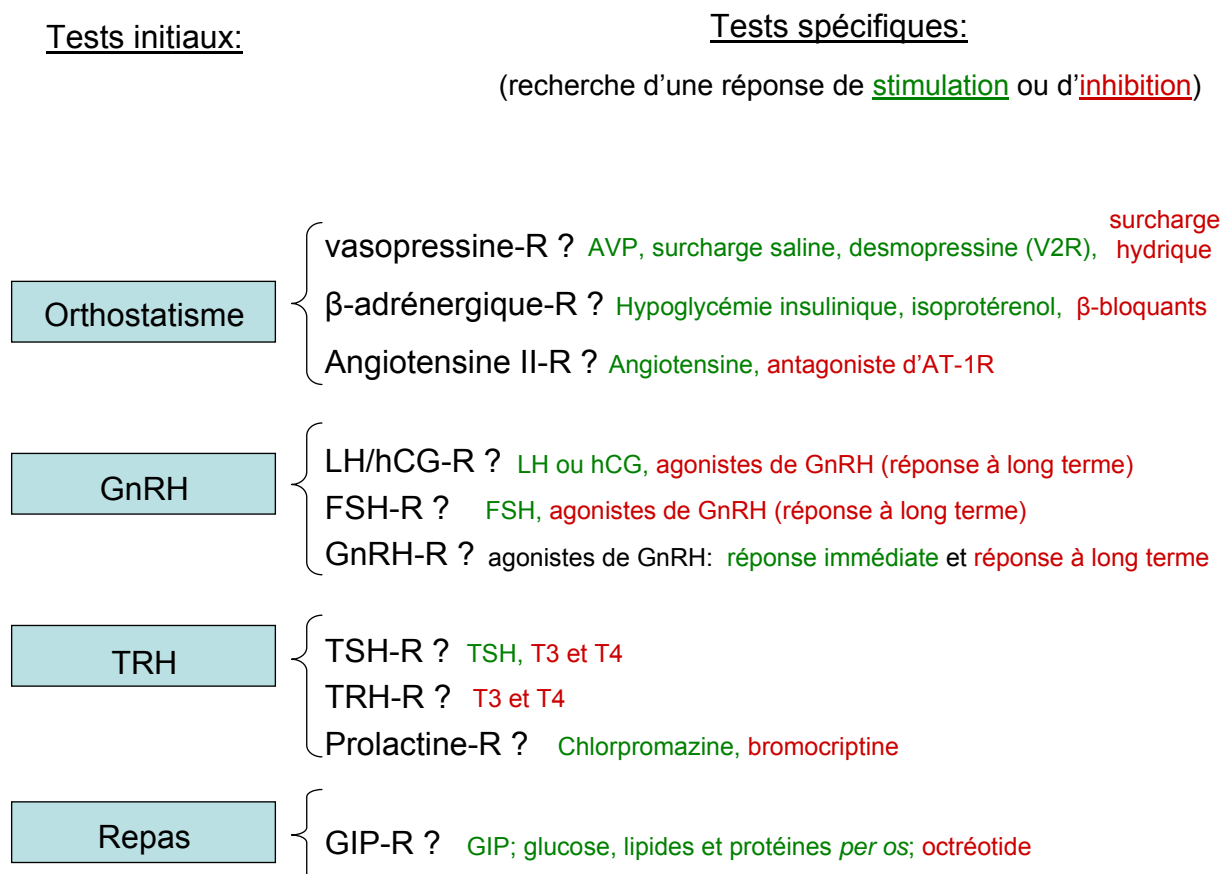


Figure 17. Tests de dépistage ou de confirmation d'une réponse anormale du cortisol *via* des récepteurs surrenaliens aberrants.

Actuellement, la réalisation de tests de dépistage clinique devant la présence d'une lésion surrenalienne avec ou sans manifestation clinique d'hypercortisolisme commence à être utilisée d'une façon plus fréquente ; ainsi, des protocoles de recherche clinique dévoilent une haute prévalence des récepteurs ectopiques (Tableau 5). C'est principalement des lésions bénignes qui ont été étudiées, alors que le petit nombre de patients inclus portant un carcinome ne présentait pas de réponse anormale du cortisol aux tests cliniques. Il est intéressant de noter que les adénomes diagnostiqués à un stade infra-clinique semblent se comporter différemment de ceux responsables d'un syndrome de Cushing franc.

Tableau 5. Résultats des tests cliniques systématiques à la recherche des récepteurs surrenaliens aberrants. Le tableau présente le nombre de cas ayant une élévation du cortisol en réponse à un ou plusieurs tests de dépistage clinique, en rapport avec le nombre total de patients étudiés dans chaque groupe.

Présentation clinique	nombre de cas / total		
	AIMAH	Adénome	
Syndrome de Cushing franc	6 / 6	3 / 13	(Mircescu, Jilwan <i>et al.</i> , 2000)
Syndrome de Cushing franc	11 / 11	0 / 2	(Bertherat, Barrande <i>et al.</i> , 2003)
Incidentalome (Cushing sous-clinique)	4 / 4		(Bourdeau, D'Amour <i>et al.</i> , 2001)
Incidentalome (Cushing sous-clinique)	5 / 5		(Tatsuno, Uchida <i>et al.</i> , 2004)
Incidentalome (Cushing sous-clinique ou peu expressif)		21 / 21	(Reznik, Lefebvre <i>et al.</i> , 2004)

3.4 Traitement

Dans certains cas de syndrome de Cushing associé à l'expression aberrante de récepteurs dans le cortex surrénal, un traitement pharmacologique, dirigé contre le récepteur en question, a été essayé. Les résultats sont variables selon le récepteur et le patient :

- le blocage de la sécrétion post-prandiale du GIP par l'octréotide peut être capable de normaliser les taux de cortisol, mais cet effet n'est pas soutenu (Hamet, Larochelle *et al.*, 1987; de Herder, Hofland *et al.*, 1996; Lacroix, Ndiaye *et al.*, 2001). En plus, ceci ne constitue pas un traitement spécifiquement dirigé contre le récepteur du GIP.
- chez des patients avec une AIMAH dépendante de LH/hCG, le traitement par du leuprolide a permis de supprimer la sécrétion de la LH à long terme et ainsi de contrôler la sécrétion de cortisol, tout en évitant un traitement chirurgical (Lacroix, Hamet *et al.*, 1999; Goodarzi, Dawson *et al.*, 2003). Toutefois, chez une patiente présentant également une AIMAH avec réponses aberrantes à GnRH, LH et

hCG, le résultat du traitement (leuprolide) a été une réduction partielle des taux de cortisol (Yared, Bourdeau *et al.*, 2002).

- le traitement bêta-bloquant a permis de normaliser les taux de cortisol dans deux cas de syndrome de Cushing secondaire à une hyperplasie surrénalienne sensible aux catécholamines, avec une longue durée d'efficacité (Mazzuco, Martinie *et al.*, 2002; Pignatelli, Rodrigues *et al.*, 2004), mais n'a permis qu'à réduire la cortisolumie sans la normaliser complètement dans un autre cas rapporté précédemment (Lacroix, Tremblay *et al.*, 1997a).

En ce qui concerne la masse tumorale, il n'a jamais été démontré d'effet de réduction de la taille tumorale en réponse au traitement pharmacologique d'une manière générale. L'exérèse d'un adénome est par contre largement pratiquée, et, un peu moins fréquemment, la surrénalectomie dans le cas des hyperplasies. Ainsi, le traitement chirurgical est plus efficace dans la plupart des cas et traite les deux problèmes : l'hypercortisolisme et la présence d'une tumeur.

Le développement d'inhibiteurs de la production des ligands endogènes, ou celui d'antagonistes spécifiques des récepteurs aberrants potentiels pourrait permettre d'éviter la surrénalectomie bilatérale et les risques d'une insuffisance surrénalienne, ou d'éviter l'exérèse d'un adénome, bien que ce dernier cas ne pose pas de problèmes chirurgicaux ou de suivi/adhésion au traitement. Ainsi, la chirurgie reste le seul traitement curatif des syndromes de Cushing à ce jour (Lieberman, Eccleshall *et al.*, 1994).

2. La tumorigenèse cortico-surrénalienne

2.1 Les lésions tumorales de la surrénale

Avec une prévalence de 3 à 7% dans les séries radiologiques ou d'autopsie, la glande surrénale peut être un site fréquent de lésions tumorales (Ross and Aron, 1990, Kloos, Gross *et al.*, 1995). Ces tumeurs peuvent être sporadiques, ou plus rarement héréditaires. Environ 30 à 50% des tumeurs se manifestent par des troubles endocriniens, dont le principal tableau clinique est le syndrome de Cushing, un sujet qui sera abordé dans la Partie 3. Au-delà des troubles endocriniens, les autres circonstances de découverte des lésions tumorales surrénaliennes se répartissent entre l'investigation d'une douleur abdominale, la présence de masses palpables ou de métastases et la découverte fortuite sans manifestation clinique, ce qui définit les incidentalomes. L'utilisation accrue des méthodes d'imagerie de plus en plus performantes révèle actuellement la haute prévalence des incidentalomes surrénaliens (Chidiac and Aron, 1997, Mansmann, Lau *et al.*, 2004). Dans la majorité des cas, il s'agit de lésions bénignes, mais parfois aussi de cortico-surrénalomes malins (Tableau 2). Du fait de la détection des incidentalomes, il est possible de diagnostiquer des tumeurs malignes de petite taille à un stade précoce, ainsi que des lésions surrénaliennes avec hypersécrétion hormonale « sous-clinique ».

A priori, toute lésion qui se développe dans le cortex surrénalien est suspecte d'être maligne. Les tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes et malignes ayant un pronostic très différent, la détection accrue des lésions surrénaliennes rend ce problème un défi diagnostique de l'endocrinologie moderne. L'amélioration des techniques d'imagerie, un outil dans la détection précoce de ces tumeurs, pourra fournir des indices pour comprendre l'évolutivité tumorale cortico-surrénalienne.

Tableau 2. Classification des incidentalomes surrénaliens. D'après l'étude de 1004 patients par le Study Group of the Italian Society of Endocrinology on Adrenal Incidentalomas (Mantero, Terzolo et al., 2000).

Adénomes cortico-surrénaliens non sécrétants	74,0 %
Adénomes cortico-surrénaliens sécrétants	
Cortisol	9,2 %
Aldostérone	1,4 %
Phéochromocytomes	4,2 %
Carcinomes cortico-surrénaliens	4,0 %
Métastases	0,7 %
Autres lésions	
Hyperplasies ou autres lésions bilatérales*	10,0 %
Myélolipomes surrénaliens	3,0 %
Kystes cortico-surrénaliens	1,9 %
Ganglioneuromes	1,5 %

* Parmi les lésions opérées : 4 adénomes, 1 carcinome, 1 phéochromocytome, 2 myélolipomes et 3 métastases.

2.1.1 Les tumeurs cortico-surrénaliennes bénignes

Comme le démontre le tableau 2, les adénomes sont les tumeurs les plus fréquentes ; ils le sont également quand il s'agit de tumeurs sécrétantes. Dans sa forme typique, l'adénome est une lésion nodulaire unique, de quelques millimètres à quelques centimètres. Il est bien limité, encapsulé, élargissant le cortex surrénalien (Figure 7). Sa coloration varie du jaune vif au beige. Dans les formes cortisoliques, la surrénale résiduelle et celle controlatérale sont atrophiques. A l'examen histologique, les adénomes sont constitués de cellules semblables à celles qui siègent dans le cortex surrénalien normal, riches en lipides. Il peut y avoir un certain degré de pléiomorphisme cellulaire. Les noyaux sont petits, les atypies nucléaires sont fréquentes et de nature dystrophique, mais l'index mitotique reste bas.

Quand la morphologie normale des surrénales présente un aspect de masses volumineuses polylobées, il s'agit d'une hyperplasie macronodulaire (Figure 7). Elle se caractérise par une augmentation globale et souvent bilatérale des surrénales. Cette lésion bénigne, beaucoup plus rare que l'adénome, peut être aussi l'origine d'un hypercorticisme indépendant de l'ACTH. Elle est appelée hyperplasie surrénalienne bilatérale macronodulaire

ou AIMAH (*ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia*) (Lieberman, Eccleshall *et al.*, 1994). Comme dans le cas des adénomes, on retrouve des cellules d'aspect micro-vacuolaire ou spongiocytaire, impliquées dans le métabolisme des stéroïdes. Par contre, ces éléments s'organisent en cordons de cellules compactes avec des amas de cellules claires, exhibant plusieurs degrés d'hyperplasie cellulaire, distribués comme des nodules dans le cortex avec des zones inter-nodulaires souvent atrophiques (Swain, Grant *et al.*, 1998). La différenciation tumorale, le pléiomorphisme nucléaire peu fréquent et l'absence de nécrose sont en faveur de la bénignité.

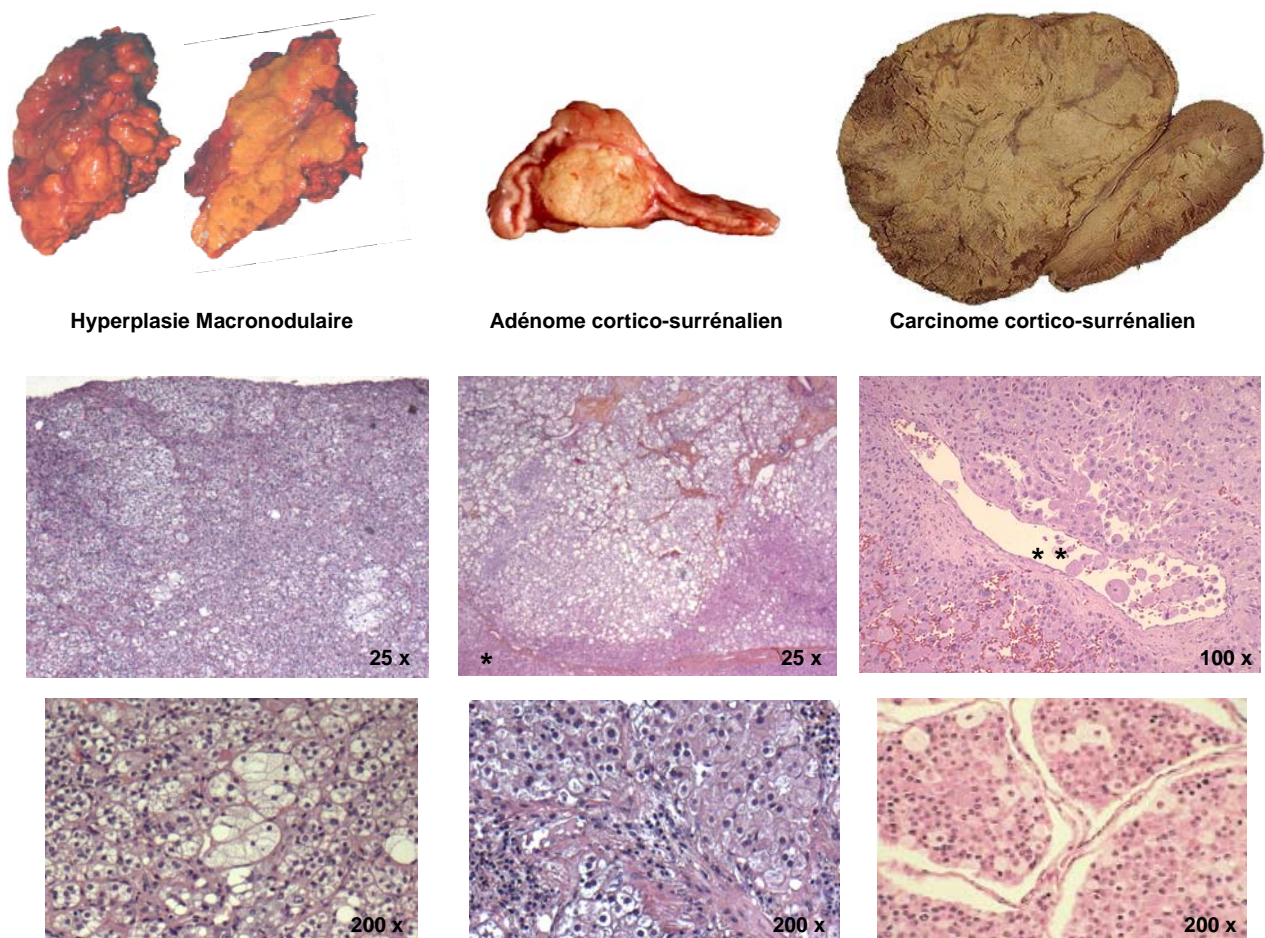


Figure 7. Exemples macro et microscopiques de lésions tumorales typiques du cortex surrénalien. Coloration par hématoxyline & éosine : les cellules claires se sont arrangées sous la forme de « nodules » dans l'hyperplasie. L'adénome est bien encapsulé (le tissu fibreux est rougeâtre) et le tissu cortico-surrénalien normal (*) est comprimé par l'adénome. Les carcinomes qui présentent une invasion des cellules néoplasiques dans le lit vasculaire (**) et un faible contingent de cellules claires ne posent pas de difficulté dans le diagnostic de malignité.

Même si les caractéristiques histologiques sont assez particulières et bien établies par l'Organisation Mondiale de la Santé (Williams, Siebenmann *et al.*, 1980), la différenciation entre l'AIMAH et l'adénome (souvent unilatéral) est principalement macroscopique (Figure 7). Dans certains cas, il peut y avoir des caractéristiques histologiques intermédiaires, comme rapporté récemment (Karasawa, Hotta *et al.*, 2004), ce qui peut suggérer que ces deux lésions constituent deux stades évolutifs différents d'une même pathologie .

L'AIMAH est une anomalie plutôt sporadique qui exhibe des manifestations cliniques aux alentours de la 5^{ème} ou 6^{ème} décennies; de rares cas familiaux ont été décrits (Findlay, Sheeler *et al.*, 1993, Minami, Sugihara *et al.*, 1996). Quelques rares syndromes héréditaires peuvent présenter des lésions surréaliennes bénignes comme :

- l'hyperplasie macronodulaire bilatérale liée à des mutations activatrices du gène de la protéine $G\alpha$ (GNSA1), décrites soit dans le Syndrome de McCune-Albright (Weinstein, Shenker *et al.*, 1991), soit en absence des manifestations de ce syndrome (Fragoso, Domenice *et al.*, 2003) ;
- la dysplasie micronodulaire pigmentée ou PPNAD (primary pigmented adrenal nodular disease), due à une mutation inactivatrice du gène *PRKARIA* codant pour la sous-unité régulatrice R1 alpha de la PKA. Elle a été décrite dans le complexe de Carney, caractérisé par l'association de myxomes, d'anomalies de la pigmentation cutanée et d'un hyperfonctionnement endocrinien (Kirschner, Carney *et al.*, 2000);
- l'hyperplasie congénitale des surréales, l'une des plus fréquentes endocrinopathies chez l'enfant (1 sur 5000 naissances), caractérisée par un déficit enzymatique de la 21-hydroxylase ou plus rarement d'autres enzymes (Charmandari, Brook *et al.*, 2004). C'est l'hypersecretion d'ACTH (par rétrocontrôle) qui va stimuler cette hyperplasie des surréales.

2.1.2 Le carcinome cortico-surrénalien

Le carcinome cortico-surrénalien ou cortico-surréalome malin est rare, correspondant à environ 0.05 à 0.2 % de la totalité des cancers chez l'adulte (Chrousos, 2003). Son incidence annuelle est de 2 nouveaux cas par million d'habitants, et peut être plus élevée dans certaines zones géographiques comme dans le sud et sud-est du Brésil, chez l'adulte et

l'enfant (Latronico and Chrousos, 1997, Sandrini, Ribeiro *et al.*, 1997, Wajchenberg, Albergaria Pereira *et al.*, 2000).

Le carcinome cortico-surrénalien est habituellement une tumeur volumineuse, pouvant atteindre plus de 20 cm de diamètre (Figure 7). Il est souvent hétérogène, avec des zones friables, hémorragiques, mal encapsulé, avec des nodules satellites. Le syndrome de Cushing ou le syndrome de virilisation en sont les manifestations endocriniennes les plus fréquentes. Les formes non sécrétantes sont plus souvent révélées par un syndrome tumoral ou des métastases. Microscopiquement, des cellules très atypiques, monstrueuses, y sont présentes. Ces tumeurs sont classiquement hypervascularisées et nécrotiques, avec des cellules tumorales libres dans les vaisseaux. De haute malignité, les carcinomes cortico-surréaliens envahissent la veine surrénalienne, la veine cave et la surrénale opposée. Les métastases ganglionnaires régionales sont habituelles, et les métastases viscérales, en particulier pulmonaires, apparaissent rapidement (Didolkar, Bescher *et al.*, 1981). Les possibilités thérapeutiques du carcinome cortico-surrénalien restent limitées. Ces tumeurs étant peu sensibles à la chimiothérapie, seule la chirurgie peut être efficace, si réalisée dans les stades précoces (Barzilay and Pazianos, 1989). L'Op'DDD (Mitotane®), d'action adrénolytique, peut provoquer une véritable surrénalectomie chimique et reste une option comme traitement adjuvant à la chirurgie, mais sa toxicité limite son utilisation et son efficacité est presque nulle en ce que concerne la majoration de la survie des patients (Luton, Cerdas *et al.*, 1990).

Les tumeurs malignes du cortex peuvent aussi être associés à des anomalies chromosomiques déjà identifiées ou à des syndromes génétiques. Ainsi, des altérations du gène suppresseur de tumeurs *TP53* ont été démontrées dans le carcinome cortico-surrénalien isolé chez l'enfant (Varley, McGown *et al.*, 1999, Latronico, Pinto *et al.*, 2001) et dans le cadre d'une prédisposition héréditaire à des multiples tumeurs, le syndrome de Li-Fraumeni (Li and Fraumeni, 1969, Malkin, Li *et al.*, 1990). D'autre part, des modifications génétiques ou épigénétiques de la région 11p15.5 soumise à empreinte parentale sont la cause d'un taux élevé du facteur de croissance IGF-II dans le syndrome de Wiedemann-Beckwith. Ceci est caractérisé par une incidence élevée du carcinome cortico-surrénalien, par une hypercroissance et par la présence de tumeurs embryonnaires comme la tumeur rénale de Wilms (Gicquel, Raffin-Sanson *et al.*, 1997, Maher and Reik, 2000). Finalement, dans la néoplasie endocrine multiple type 1 (NEM1), un syndrome autosomique dominant, le

carcinome cortico-surrénalien peut faire partie du tableau clinique mais il n'est pas fréquent (Skogseid, Larsson *et al.*, 1992).

2.1.3 Caractérisation anatomopathologique

Lorsque une tumeur cortico-surrénalienne est de taille relativement petite, son diagnostic morphologique devient difficile. Pendant les dernières décennies, les critères morphologiques du diagnostic des cancers de la corticosurrénale ont été très discutés (Lewinsky, Grigor *et al.*, 1974, Tang and Gray, 1975, Karakousis, Rao *et al.*, 1985). Ainsi, trois systèmes de prévision pronostique de ces tumeurs ont été élaborés.

Dans une analyse mathématique des données cliniques et morphologiques de 41 observations rétrospectives, Hough, Hollifield *et al.* (1979) ont identifié 15 critères ayant une valeur prédictive du développement de métastases. Parmi ces critères, la chute pondérale du malade, la présence de travées fibreuses intra-tumorales, l'architecture diffuse, l'invasion vasculaire, la nécrose cellulaire et le poids de la tumeur supérieur à 100 g étaient les indicateurs de malignité les plus importants. Van Slooten, Schaberg *et al.* (1985) ont proposé un index histologique correspondant à la somme des valeurs discriminatives de 7 paramètres morphologiques, parmi lesquels l'index mitotique et les modifications régressives (nécrose, hémorragie, fibrose et calcification) semblaient constituer les meilleurs critères de malignité. D'autre part, Weiss (1984) a défini 9 critères strictement histologiques détaillés dans le Tableau 3 en étudiant 43 tumeurs de la corticosurrénale. La valeur prédictive des scores était : 0 à 2 = tumeur bénigne ; 3 = pronostic indéterminé ; 4 à 9 = tumeur maligne.

Dans un deuxième travail (Weiss, Medeiros *et al.*, 1989), cette échelle de score a été modifiée : 0 à 2 = tumeur bénigne ; 3 à 9 = tumeur maligne. Cette classification est la plus acceptée actuellement.

Tableau 3. Les critères positifs définis par Weiss pour l'évaluation pronostique des tumeurs cortico-surréaliennes.

-
- 1° Grade nucléaire de III ou IV selon la gradation établie par Fuhrman *et al.* [7].
 - Grade III : Les noyaux de contours nettement irréguliers ont un diamètre de 20 μ , le nucléole est bien apparent ;
 - Grade IV : Aspect proche du grade III avec en outre des noyaux multilobés, bizarres, et une chromatine en grosses mottes.
 - 2° Index mitotique supérieur à 5/50 champs (objectif = 40).
 - 3° Présence de mitose(s) atypique(s) (tri ou multipolaire, ou avec répartition anormale des chromosomes).
 - 4° Proportion des cellules à cytoplasme clair ou micro-vacuolisé inférieure à 25 % de la population néoplasique.
 - 5° Architecture diffuse de plus de 1/3.
 - 6° Nécrose.
 - 7° Envahissement des veines.
 - 8° Envahissement des sinusoides.
 - 9° Invasion de la capsule.
-

Cependant ce système a également des inconvénients, comme la subjectivité dont est empreinte l'interprétation de certains critères. En pratique quotidienne, ces tumeurs portent un autre problème diagnostique : dans de nombreux cas il s'avère difficile, voire impossible, de porter un pronostic vrai sur leur risque d'évolution maligne. Pour améliorer la fiabilité du pronostic, certains marqueurs moléculaires de malignité ont été recherchés récemment dans les surrénales normales et les lésions bénignes et malignes : présence d'altérations du gène suppresseur de tumeur *TP53*, expression de l'antigène associé à la prolifération Ki67, taux de cellules tumorales apoptotiques et perte d'hétérozygotie (Wachenfeld, Beuschlein *et al.*, 2001). Parmi les marqueurs utilisés en routine dans l'étude anatomopathologique, seul l'index

de prolifération par immunodétection du Ki67 a été un indicateur sensible et spécifique de malignité, permettant aussi de discerner les adénomes des carcinomes cortico-surréaliens.

2.2 Le développement tumoral

Même si des facteurs environnementaux peuvent être impliqués dans l'origine d'une tumeur, la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale est un processus d'ordre essentiellement génétique. Le phénotype tumoral est en effet le résultat d'événements mutationnels qui aboutissent à la naissance et au maintien d'une lignée immortelle, c'est-à-dire tumorale. Depuis les travaux de Nowell (1976), on sait que ce processus fait intervenir plusieurs étapes successives, chaque mutation faisant progresser la cellule dans la voie de la transformation cancéreuse (Figure 8). Les altérations génétiques peuvent toucher les gènes qui stimulent la croissance, ceux qui la freinent (gènes suppresseurs de tumeurs), ceux qui régulent l'apoptose ou ceux qui réparent l'ADN (les gènes de stabilité).

Si l'endommagement de l'ADN est suivi d'un échec des mécanismes de réparation, le processus de développement néoplasique peut s'initier par des altérations génétiques affectant deux classes principales de gènes, démontrées dans la Figure 8 :

1) **Les oncogènes.** Ils sont dérivés des proto-oncogènes, les gènes présents à l'état normal, impliqués dans la croissance ou la différenciation cellulaire. Les protéines issues des proto-oncogènes sont en général des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, des facteurs de transcription ou des facteurs de transduction. Libérée de toute régulation, l'expression de l'oncogène entraîne une hyperstimulation dérégulée de la cellule. L'action des oncogènes peut donc être qualifiée de « gain de fonction ».

2) **Les gènes suppresseurs de tumeurs.** À l'inverse des proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs exercent, à l'état normal, une influence inhibitrice sur la prolifération cellulaire. C'est la perte de leur fonction qui entraîne l'expansion d'une lignée tumorale. Pour avoir une expression phénotypique, il est nécessaire que l'un et l'autre des deux chromosomes qui codent pour la protéine soient inactivés. Il faut donc

une inactivation biallélique des gènes suppresseurs de tumeurs pour initier le processus pathologique.

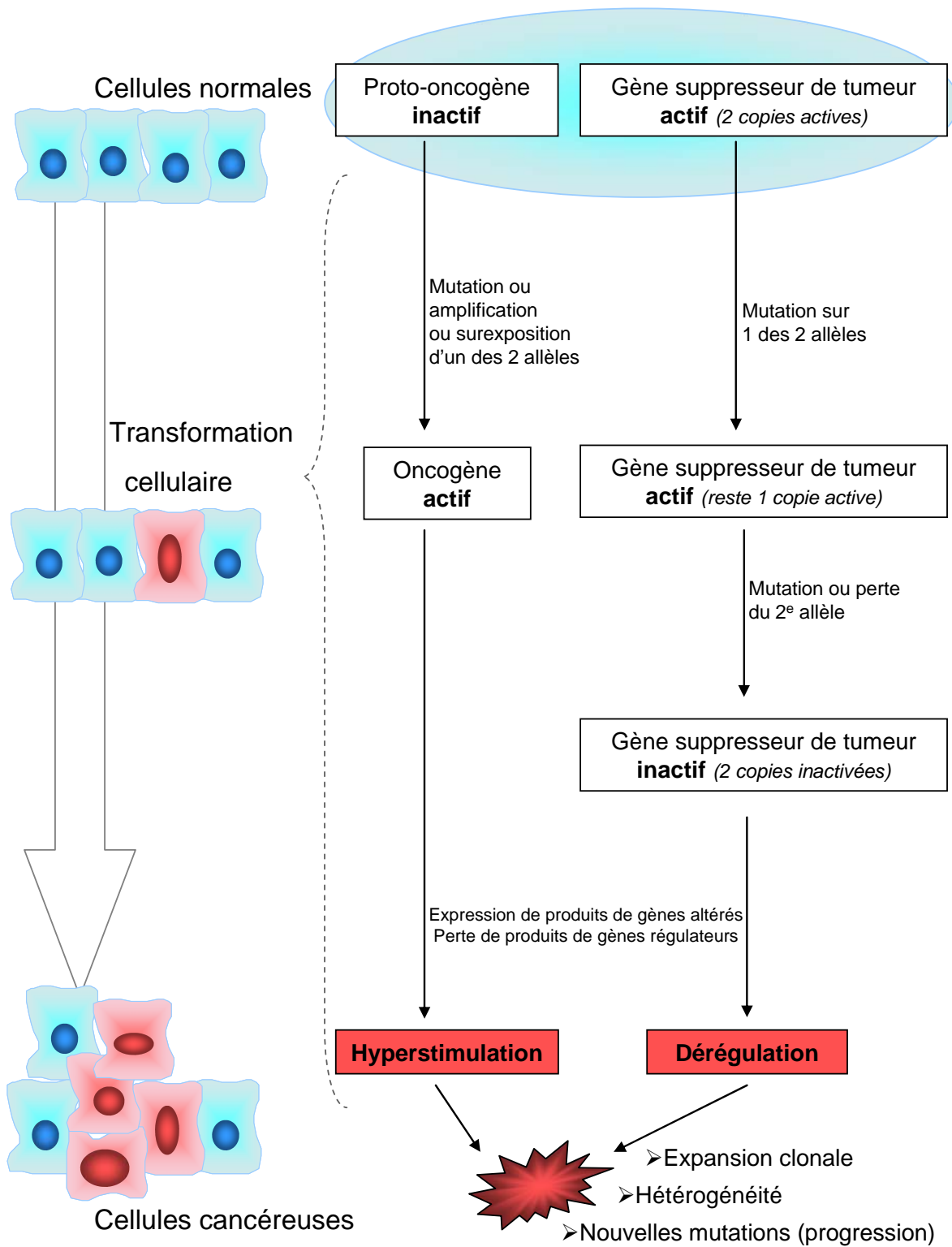


Figure 8. Mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigenèse : la progression par étapes.

Ces mécanismes moléculaires rendent compte de l'origine des tumeurs sporadiques aussi bien que des tumeurs familiales. Les mutations somatiques (non héréditaires) sont les plus fréquentes, alors que les mutations germinatives sont responsables de seulement 10 % des cancers, dans le cadre d'un syndrome tumoral familial (Lengauer, Kinzler *et al.*, 1998). Élaborée en 1971 à partir des rétinoblastomes et depuis largement confirmée, l'hypothèse de Knudson (1971) explique cette coexistence. Elle suppose l'existence des gènes suppresseurs de tumeurs dont l'altération ne cause la maladie qu'à l'état homozygote. Dans les tumeurs sporadiques, il faut donc la survenue de deux événements moléculaires (mutation somatique ou perte allélique) pour inactiver les deux copies du gène et conduire à la tumeur. Si, dans le cadre d'une anomalie héréditaire, l'une des deux copies du gène est déjà altérée de façon constitutionnelle (mutation germinale), un seul événement suffira à provoquer l'apparition de tumeurs.

2.3 Aspects moléculaires de la tumorigenèse cortico-surrénalienne

Des défauts moléculaires des syndromes familiaux liés à des tumeurs cortico-surrénaliennes ont été bien caractérisés, comme cité précédemment (cf. 2.1.1 et 2.1.2). Toutefois, les altérations moléculaires impliquées dans chaque étape du développement des tumeurs cortico-surrénaliennes sporadiques ne sont pas encore élucidées ; quelques publications récentes font un récapitulatif de l'état actuel des connaissances (Koch, Pacak *et al.*, 2002, Sidhu, Gicquel *et al.*, 2003, Stratakis, 2003).

2.3.1 La recherche des oncogènes cortico-surréaliens

Les mécanismes potentiels du développement des tumeurs sporadiques du cortex surrénalien sont résumés dans la Figure 9. Des facteurs normalement exprimés dans le cortex surrénalien peuvent être altérés dans les tumeurs cortico-surrénaliennes, comme la protéine StAR (Liu, Heikkila *et al.*, 1996), mais le lien entre ces altérations et la tumorigenèse n'est pas encore établi. Des « anti-oncogènes » ou gènes « anti-prolifératifs » peuvent être inhibés, comme c'est le cas des gènes suppresseurs de tumeurs, des gènes d'inhibition de la sénescence ou de l'apoptose, non spécifiques au

cortex surrénalien. Parmi ceux-ci, des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53*, qui code pour la protéine tumorale p53, sont essentiellement retrouvées dans des tumeurs malignes avec une fréquence de 20 à 25 % (Reincke, Wachenfeld *et al.*, 1996, Sidhu *et al.*, 2003). D'autres anomalies sont moins fréquentes, comme la perte allélique de *p16*, gène impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire ; un autre gène de ce type, l'inhibiteur de kinase dépendante des cyclines *p57^{KIP2}*, ou le gène suppresseur de tumeur *H19*, peuvent avoir leur inactivation liée à la tumorigénèse. L'expression augmentée des gènes liés aux cancers de divers sites primaires a été aussi démontrée dans les tumeurs cortico-surréaliennes, comme *hTERT* pour la télomérase ou le gène anti-apoptotique *Bcl-2* (Ando, Shibata *et al.*, 1998, Kanauchi, Wada *et al.*, 2002).

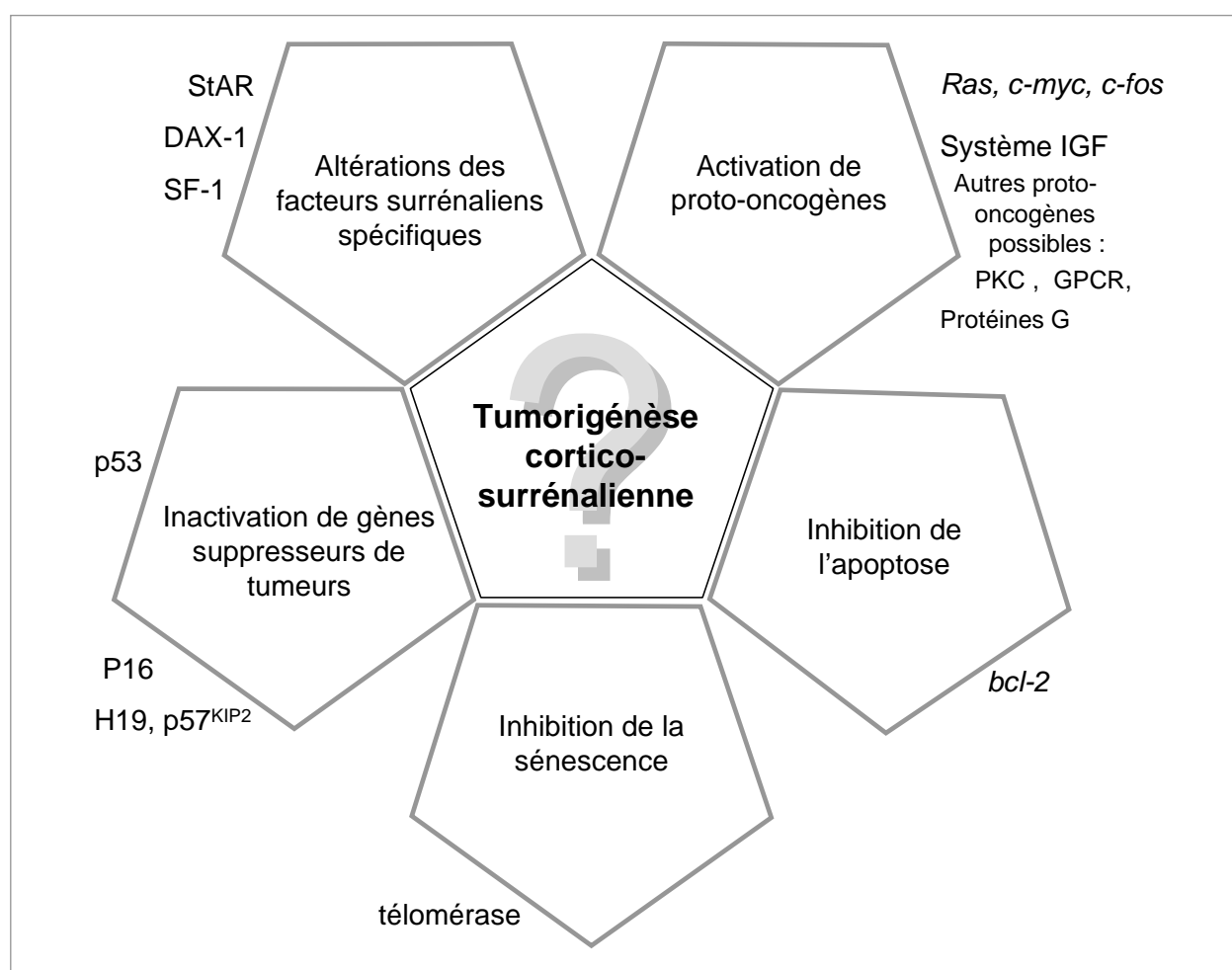


Figure 9. Mécanismes potentiels de la tumorigénèse cortico-surrénalienne. A côté de chaque mécanisme (pentagones) sont représentés les gènes candidats au développement des tumeurs sporadiques du cortex surrénalien. Les études sur la participation de ces gènes sont mentionnées dans le texte.

Nombreux sont les gènes candidats dans le groupe des **proto-oncogènes** cortico-surréaliens (Figure 9). Parmi les protéines membranaires impliquées dans la signalisation de différents récepteurs des facteurs de croissance, les protéines ras (H-ras, N-ras et K-ras) exhibent une activité GTPase intrinsèque à l'état normal (Gibbs, Sigal *et al.*, 1984). Les formes oncogéniques sont fréquemment impliquées dans la pathogénie des tumeurs humaines, étant caractérisées par une perte de cette activité GTPase (Shields, Pruitt *et al.*, 2000). Dans les tumeurs du cortex surréal, peu de mutations de l'oncogène *ras* ont été détectées. L'étude américaine de 11 tumeurs cortico-surréaliennes bénignes et malignes ne détecte pas de mutation de *N-ras*, *H-ras* ou *K-ras* dans les codons 12, 13 ou 61, où se trouvent habituellement les mutations de *ras* des tumeurs humaines (Moul, Bishoff *et al.*, 1993). Toutefois, une étude taiwanaise démontre la présence de mutations de *K-ras* dans 6 sur 13 adénomes de Conn ; ces mutations sont localisées dans des codons non décrits précédemment, ce qui pourrait être spécifique de ce groupe populationnel asiatique (Lin, Tsai *et al.*, 1998). Finalement, la plus grande casuistique de 62 lésions tumorales cortico-surréaliennes démontre des mutations activatrices de *N-ras* dans le codon 61 avec une prévalence identique de 12,5% dans le groupe de 24 carcinomes et dans le groupe de 32 adénomes, étant absente dans les 6 hyperplasies étudiées. La grande majorité des patients est d'origine américaine; les 12 adénomes issus de patients japonais ne présentaient pas la mutation (Yashiro, Hara *et al.*, 1994).

L'anomalie la plus constamment retrouvée dans les tumeurs malignes du cortex surréalien est la surexpression de la protéine **IGF-II** (Gicquel, Bertagna *et al.*, 2001). Cette surexpression est présente dans 90% des carcinomes cortico-surréaliens. Il s'agit d'une altération liée à des remaniements de la région chromosomique 11p15 avec disomie uniparentale, c'est-à-dire, la non-équivalence fonctionnelle de deux allèles. Seul l'allèle paternel de l'*IGF-II* est exprimé, car l'empreinte maternelle rend l'allèle maternel silencieux. De plus, la région 11p15 est porteuse d'autres gènes importants tels que les gènes suppresseurs de tumeur *H19* et *p57^{KIP2}* (Gicquel *et al.*, 1997). Dans cette région, organisée en deux sous-domaines, certains gènes exprimés à partir de l'allèle d'origine maternelle ont des fonctions de type anti-prolifératif et d'autres gènes exprimés à partir de l'allèle d'origine paternelle ont des fonctions de type prolifératif (Figure 10). L'empreinte parentale différentielle est un concept relativement récent et nous ne connaissons

pas la finalité biologique de cette empreinte (Arney, 2003). Si tous les gènes ne sont pas soumis à empreinte parentale différentielle, ce groupe de gènes situé sur le chromosome 7 chez la souris est de façon similaire soumis à l'empreinte différentielle (Murrell, Heeson *et al.*, 2004). Ce sont les mêmes gènes chez l'homme qui sont sur le chromosome 11 dans la région 11p15 où est localisé l'*IGF-II*. L'empreinte de ces gènes est régulée par des phénomènes de méthylation et d'acétylation sous le contrôle régional de centre d'empreinte qui font actuellement l'objet d'études.

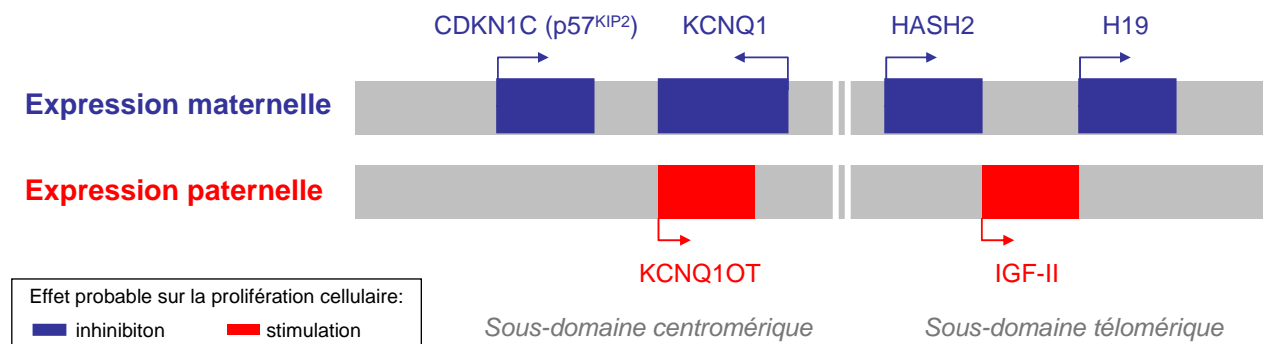


Figure 10. Organisation de la région chromosomique 11p15 chez l'homme.

Des altérations génétiques ou épigénétiques de cette région ont été aussi décrites dans le syndrome de Wiedemann-Beckwith (cf. 2.1.2) : l'isodisomie paternelle de la région 11p15 et la mutation germinale du gène *p57^{KIP2}* (anomalies génétiques) et plus souvent la déméthylation isolée de *KCNQ1OT* ou *Lit1* (impliquée dans le contrôle de l'empreinte parentale) ou l'hyperméthylation isolée de l'anti-oncogène *H19* (anomalies épigénétiques) (Gaston, Le Bouc *et al.*, 2001, Arney, 2003, Yang, Hu *et al.*, 2003). Ces anomalies de la région 11p15 sont étroitement liées à la surexpression du facteur de croissance fœtal *IGF-II*. Ainsi l'isodisomie paternelle de la région 11p15 (perte de l'allèle maternel et duplication de l'allèle paternel actif pour *IGF-II*) ou l'hyperméthylation du gène *H19* sont responsables d'une surexpression du gène *IGF-II*.

Plusieurs éléments du système IGF tels que les IGFs-I et II, le récepteur *IGF2R* et la protéine de liaison *IGFBP* semblent être impliqués dans la prolifération tumorale (Ilvesmaki, Kahri *et al.*, 1993, Sidhu *et al.*, 2003). Ces études suggèrent la présence

d'une surexpression de l'*IGF-II* comme un marqueur moléculaire important de malignité surrénalienne, d'où son intérêt comme outil diagnostique dans les cas suspects. Ceci a été confirmé par la technique de micro-arrays, utilisée dans l'analyse de 19 tumeurs cortico-surréaliennes (Giordano, Thomas *et al.*, 2003) ainsi que dans une étude de 57 tumeurs cortico-surréaliennes sporadiques sur la plateforme Transcriptome du CHU de Grenoble, grâce à la démonstration de l'expression accrue du gène *IGF-II* dans les carcinomes (de Fraipont, El Atifi *et al.*, 2004). Les tumeurs bénignes sont au contraire indemnes de ces anomalies (Giordano *et al.*, 2003, Bourdeau, Antonini *et al.*, 2004, de Fraipont *et al.*, 2004).

Un autre candidat à proto-oncogène lié à des tumeurs malignes comme les gliomes et les carcinomes mammaires, le gène de la PKC, n'a pas été retrouvé dans les lésions tumorales cortico-surréaliennes (Latronico, Mendonca *et al.*, 1994). De même, quelques études écartent une participation du gène *MC2-R* dans la formation de ces tumeurs (Latronico, Reincke *et al.*, 1995, Light, Jenkins *et al.*, 1995), mais sa délétion semble être liée à des tumeurs cortico-surréaliennes plus agressives (Reincke, Mora *et al.*, 1997). Inversement, dans des tumeurs bénignes hypersécrétantes, la voie de signalisation de ce récepteur pourrait être constamment activée. Ceci a été démontré dans un cas d'hyperplasie surrénalienne bilatérale et syndrome de Cushing (Swords, Baig *et al.*, 2002). Une mutation du gène *MC2R* a été caractérisée ; elle entraîne une activation constitutive du récepteur à l'état basal et la perte du mécanisme de désensibilisation du récepteur. Ceci est un cas isolé, mais il fait penser aux tumeurs bénignes sécrétantes d'une manière générale. En effet, dans ces tumeurs, malgré le taux d'ACTH effondré, il y a une hypersécrétion de stéroïdes laissant supposer une stimulation de la voie de l'AC/PKA/AMPc liée aux GPCRs.

2.3.2 Les GPCRs et la voie de l'AC/PKA/AMPc

Il existe des arguments en faveur d'un rôle de cette voie dans la tumorigenèse endocrine. Des anomalies de plusieurs niveaux de la signalisation ont été décrites dans les cas de tumeurs bénignes hyperfonctionnelles liées à une activation exagérée de la voie classique AC/PKA/AMPc (Tableau 4). Dans la majorité des cas, il s'agit de **mutations**, telles que :

- La mutation inactivatrice du gène qui code pour la **PRKAR1A**, présente chez 40% des patients présentant un complexe de Carney (Kirschner, Carney *et al.*, 2000; Groussin, Kirschner *et al.*, 2002), dont certains cas présentent une lésion surrénalienne du type PPNAD.

- Des mutations du gène **GNAS1** sont à l'origine de l'oncogène *gsp*, responsable d'une perte de l'activité GTPase et par conséquent d'une activation constitutive de $G_s\alpha$. Les premières mutations de ce type ont été mises en évidence au sein de 40% des adénomes hypophysaires somatotropes (Landis, Masters *et al.*, 1989, Lyons, Landis *et al.*, 1990). Les adénomes hypophysaires non fonctionnels et les adénomes corticotropes peuvent exhiber plus rarement des mutations *gsp* (Tordjman, Stern *et al.*, 1993, Williamson, Daniels *et al.*, 1994, Williamson, Ince *et al.*, 1995). Une petite proportion des phéochromocytomes, des adénomes parathyroïdiens ou thyroïdiens autonomes est porteuse également de mutations du type *gsp*, rarement présentes dans les cancers thyroïdiens différenciés (Lyons *et al.*, 1990, O'Sullivan, Barton *et al.*, 1991, Suarez, du Villard *et al.*, 1991, Yoshimoto, Iwahana *et al.*, 1993, Williamson, Johnson *et al.*, 1995, Esapa, Foster *et al.*, 1997). Dans le syndrome de McCune-Albright, une mutation hétérozygote somatique *gsp* distribuée en mosaïque est responsable d'un tableau clinique variable : dysplasie fibreuse osseuse, taches cutanées café-au-lait, puberté précoce et autres anomalies moins fréquentes, comme l'hyperplasie surrénalienne macronodulaire (Weinstein *et al.*, 1991, Lumbroso, Paris *et al.*, 2002).

- Des mutations du gène codant pour la chaîne alpha de la **protéine G_{i2}** ont été rapportées dans certaines tumeurs surrénaliennes et ovariennes endocrines, et ce gène muté a été dénommé oncogène *gip2* (Lyons *et al.*, 1990). Ultérieurement, il a été démontré que cet oncogène semble être très rare dans des tumeurs surrénaliennes (Reincke, Karl *et al.*, 1993, Gicquel *et al.*, 1997).

- Des mutations activatrices des récepteurs à 7 domaines transmembranaires du type **GPCR** ont été décrites dans différentes tumeurs endocrines. Ainsi, les mutations activatrices du récepteur de la thyroïdostimuline (TSH) sont retrouvées avec une fréquence variable dans des adénomes thyroïdiens fonctionnels (Parma, Duprez *et al.*, 1993, Duprez, Parma *et al.*, 1999) ainsi qu'une mutation activatrice germinale dans le goître nodulaire de l'hyperthyroïdie familiale (Leclere, Bene *et al.*, 1997). De même, une mutation activatrice germinale du récepteur de l'hormone lutéinique (LH) a été démontrée dans l'hyperplasie des cellules de Leydig, déclenchant une puberté précoce (Shenker, Laue *et al.*, 1993).

Tableau 4. Les anomalies responsables d'une hyperactivation de la voie de l'AMPC dans les tumeurs endocrines.

Types d'anomalie	Tumeurs associées
<u>Activation de la PKA</u>	
Mutation inactivatrice de <i>PRKARIA</i>	Dysplasie surrénalienne micronodulaire pigmentée (PPNAD), tumeurs thyroïdiennes et somatotropes
<u>Activation de la protéine G</u>	
Mutation activatrice de <i>GNAS1</i> (oncogène <i>gsp</i>)	Adénomes thyroïdiens, parathyroïdiens, somatotropes ; phéochromocytomes ; tumeurs du cortex surrénalien.
Mutation inactivatrice de <i>GNAI2</i> (oncogène <i>gip2</i>)	Tumeurs ovariennes et cortico-surrénaliennes
<u>Activation des récepteurs</u>	
Mutation activatrice des <i>GPCRs</i>	Adénomes thyroïdiens toxiques, hyperthyroïdie familiale non auto-immune, tumeurs de cellules de Leydig
Hyperstimulation des <i>GPCRs</i> normaux (par excès de ligand)	Hyperplasie et adénome hypophysaires des différents secteurs, goître, hyperplasie surrénalienne
Expression anormale des <i>GPCRs</i>	Tumeurs cortico-surrénaliennes

Outre les mutations, deux autres mécanismes sont liés aux GPCRs comme indiqué dans le Tableau 4. Tout d'abord, des récepteurs **non mutés** stimulés d'une façon exagérée peuvent participer de la formation d'une hyperplasie voire d'un adénome. Ceci est parfois le cas des cellules hypophysaires lactotropes, somatotropes, corticotropes ou thyrotropes hyperstimulées (Korbonits, Morris *et al.*, 2004). Dans la maladie de Graves-Basedow, ce sont les anticorps anti-récepteur de la TSH qui sont responsables de la stimulation de la thyroïde et de la formation du goître (Studer and Derwahl, 1995). Dans

la maladie de Cushing, l'hyperplasie surrénalienne résulte de l'excès d'ACTH (Pudney, Price *et al.*, 1984), encore un autre exemple d'hyperstimulation de récepteurs normaux (ou non mutés) liée à des lésions tumorales endocrines. Le deuxième mécanisme, pour lequel également il n'y a pas d'implication des mutations comme facteur causal, est l'expression illégitime des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, stimulés par leurs ligands sécrétés de façon physiologique. Cette anomalie particulière du cortex surrénalien sera abordée dans le chapitre suivant (Introduction, Partie 3).

2.3.2 Des nouvelles cibles de l'AMPC

La régulation de la PKA par l'AMPC représente l'effet classique de ce second messenger intracellulaire découvert il y a 40 ans (Beavo and Brunton, 2002). L'absence d'inhibition des effets de l'AMPC par l'inhibiteur de la PKA H89 dans certains modèles laissait suspecter l'existence d'autres cibles de l'AMPC (Dremier, Pohl *et al.*, 1997, Busca, Abbe *et al.*, 2000, Gonzalez-Robayna, Falender *et al.*, 2000). Ainsi, des nouvelles protéines activées par l'AMPC comme l'Epac1 et 2 (Epac, *exchange protein directly activated by cAMP*) ont été découvertes récemment (de Rooij, Zwartkruis *et al.*, 1998). Elles possèdent un ou deux sites de liaison pour l'AMPC et une activité de type GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) pour les petites protéines GTPases apparentées à Ras, telles que Rap1 et Rap2 (de Rooij, Rehmann *et al.*, 2000). Ces petites protéines GTPases apparentées à Ras sont associées à des effets prolifératifs. Epac1 est d'expression ubiquitaire, avec des taux importants au niveau ovarien, rénal, thyroïdien, cérébral et musculaire. Epac2 est surtout exprimée dans certaines régions du cerveau et au niveau surrénalien (Bos, 2003). Ces protéines Epacs sont impliqués dans la régulation de l'adhésion cellulaire régulée par l'AMPC et peut être dans la migration cellulaire (Bos, 2003, Rangarajan, Enserink *et al.*, 2003). La découverte d'un ligand spécifique de ces protéines (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP) ouvre la perspective d'établir plus clairement le rôle de cette voie AMPC/Epac qui est donc parallèle à la voie de l'AMPC/PKA (Enserink, Christensen *et al.*, 2002) (Figure 11a).

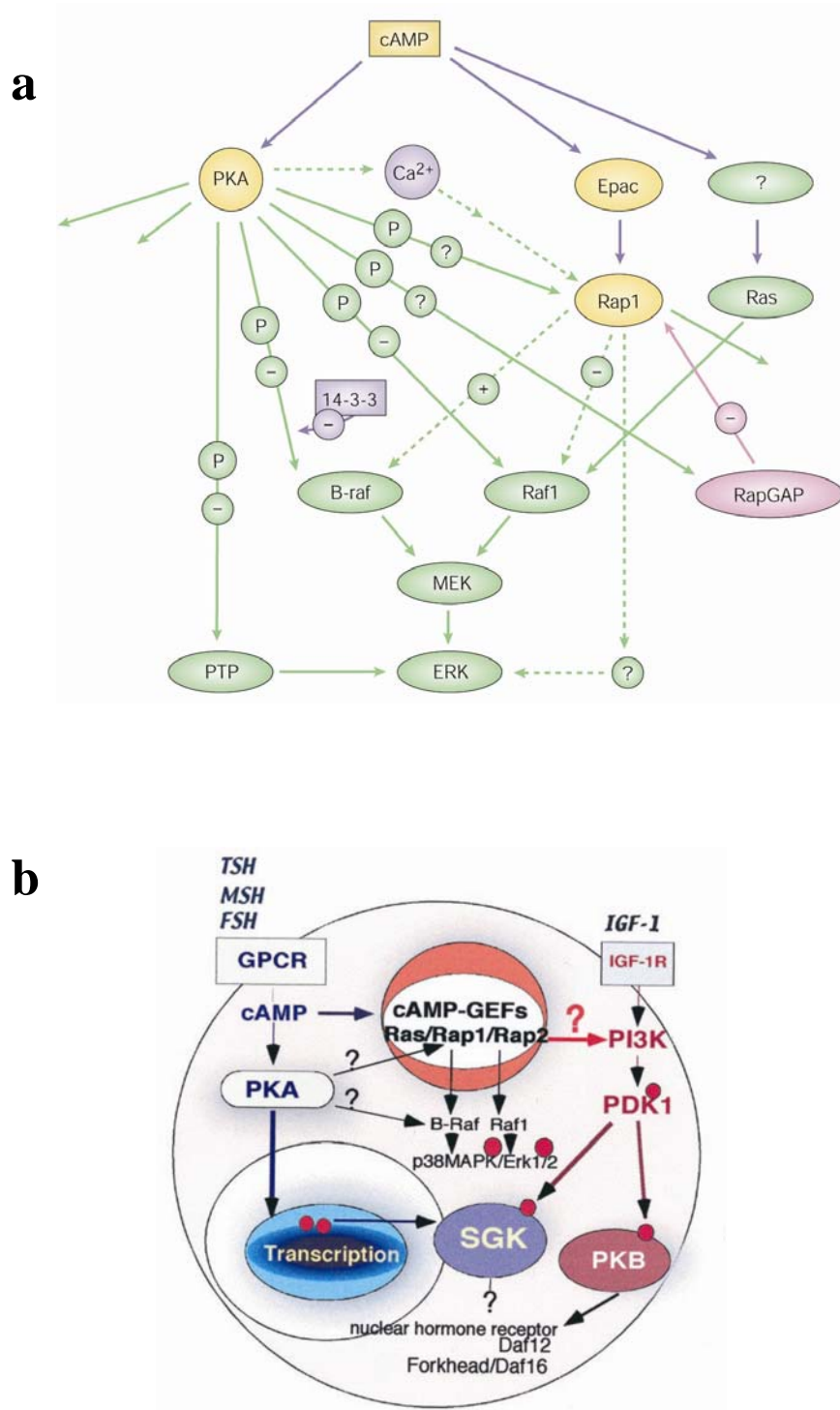


Figure 11. Les voies alternatives de signalisation en aval de l'AMPc. **a**, La voie de la PKA est parallèle et imbriquée à la voie d'Epac (d'après Bos, Rooij et al., 2001). **b**, Représentation schématique de l'effet de l'AMPc dans les cellules endocrines, d'après Richards (2001).

Les petites protéines GTPases apparentées à Ras (notamment Rap1, la plus étudiée) semblent être associées à des effets prolifératifs et pro-tumoraux, mais le rôle de Rap1 dans la voie mitogénique Raf1/B-raf-ERK (*extra-cellular-signal-regulated kinase*) est encore controversé (Bos, de Rooij *et al.*, 2001). L'effet de Rap1 est variable en fonction du type cellulaire étudié, pouvant parfois induire l'inactivation de Raf1. D'autre part, indépendamment de la voie Epac, il a été démontré que l'AMPc (via PKA) peut phosphoryler Raf1 directement ainsi que inhiber la phosphorylation de la phosphatase des ERK (Wu, Dent *et al.*, 1993, Ramstad, Sundvold *et al.*, 2000).

En plus de l'activité proliférative, la croissance tumorale peut aussi être privilégiée par une activité anti-apoptotique. L'AMPc via PKA peut phosphoryler la protéine Bad/14-3-3 empêchant sa liaison à Bcl-XL, molécule anti-apoptotique (Harada, Becknell *et al.*, 1999). Ceci se traduit par la suppression de l'effet inhibiteur de la PKA sur la voie B-raf-ERK (Figure 11a). Ces mécanismes moléculaires de l'AMPc sont complexes et en cours d'études dans des types cellulaires autres que les cellules cortico-surrénaliennes.

Dans le cadre des cellules endocrines (en particulier celles de l'ovaire), il a été proposé un modèle pour expliquer la diversité d'action de l'AMPc (Figure 11b), illustrant de manière condensée les mécanismes dépendants et indépendants de la PKA. La voie cAMP-GEF/Rap/Raf constitue un mécanisme complémentaire à la PKA pour permettre l'activation de la voie des MAPKs par l'AMPc. Il a été démontré que l'cAMP-GEF/Rap/Raf médie la phosphorylation de Sgk (*serum and glucocorticoid induced kinase*) et de PKB via PI3-K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) (Gonzalez-Robayna *et al.*, 2000), suggérant la participation de l'AMPc dans d'autres fonctions, notamment la survie et la croissance cellulaire. En résumé, les travaux en cours pour l'élucidation des nouvelles voies de signalisation de l'AMPc pourront permettre une meilleure compréhension de son rôle dans la tumorigenèse.

2.4 Progression tumorale et stéroïdogénèse

Comme il a été présenté, il existe peu d'anomalies moléculaires décrites concernant la pathologie tumorale du cortex surrénalien. En résumé, les oncogènes plus constamment liés à ces tumeurs, par ordre de fréquence, sont le *N-ras* muté (12 %), le *TP53* muté (25 %) et l'*IGF-II* (90 %). Ceux-ci sont des descriptions isolées et nous ne connaissons pas le lien entre ces gènes ni leur rôle exact dans la progression tumorale. Cependant, ce qui est considérablement souligné dans la littérature, dans le cas de la progression d'une lésion pré-maligne, est le rapport entre les gènes localisés dans le locus 11p15.5 : *H-ras-1*, *IGF-II*, insuline, *H19* et *p57^{KIP2}*. Des erreurs d'empreinte génétique de cette région seraient la cause de la surexpression d'*IGF-II* et la perte de l'expression de *H19* et *p57^{KIP2}* (Sidhu et al., 2003). D'autres oncogènes clés et gènes suppresseurs de tumeurs restent à être identifiés. Les découvertes sur le développement tumoral cortico-surrénalien avancent lentement parce que ces tumeurs sont rares, contrairement aux tumeurs du colon, le type le mieux étudié dans ce domaine, ou encore au cancer du sein. La Figure 12 illustre ce qui a été établi pour le cancer colorectal. Les altérations génétiques dans ce schéma correspondent à un total de sept mutations pour atteindre le stade de carcinome, parce que les pertes des gènes nécessitent deux mutations pour éliminer les 2 copies du gène (Fearon and Vogelstein, 1990).

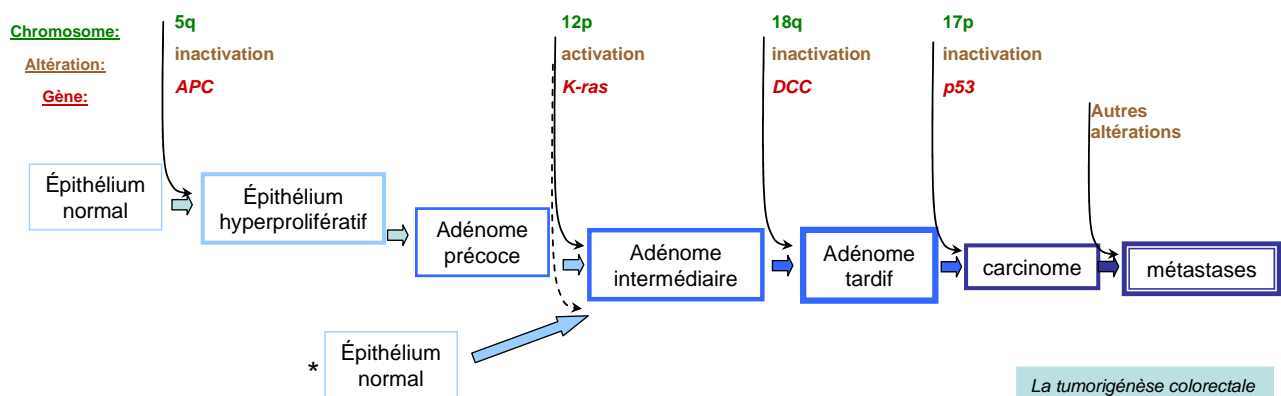


Figure 12. Séquence typique des modifications génétiques impliquées dans la tumorigénèse colorectale. Une voie récemment identifiée (Janssen, el-Marjou *et al.*, 2002) est celle indiquée par * : la succession d'événements peut ne pas dépendre d'une première mutation d'*APC*.

L'étude de la clonalité de tumeurs peut orienter l'élucidation de la tumorigenèse cortico-surrénalienne. Des données d'hybridation génomique comparative et d'analyse clonale ont démontré que le cancer cortico-surrénalien consiste en une population monoclonale de cellules et que les tissus hyperplasiques sont formés par des populations polyclonales (Beuschlein, Reincke *et al.*, 1994, Gicquel, Leblond-Francillard *et al.*, 1994, Bernard, Sidhu *et al.*, 2003). D'autre part, les adénomes peuvent être mono- ou polyclonaux (Gicquel *et al.*, 1994). Cette hétérogénéité génétique des adénomes peut être expliquée par le schéma de différentes étapes de progression du développement tumoral, ou peut-être par des voies moléculaires diverses dans chaque cas.

Dans un modèle proposé pour la tumorigenèse hypophysaire, les 2 types d'expansion clonale ont été intégrés, ce qui se traduit par 2 voies différentes mais confluentes, similaire à la tumorigenèse colorectale indiquée dans la Figure 12. Ainsi, la théorie de stimulation excessive des cellules entraîne une hyperplasie; la prolifération élevée va prédisposer les cellules à subir une (des) mutation (s); l'expansion clonale de ces cellules peut conduire à la formation d'un adénome, qui peut *à posteriori* évoluer vers un carcinome (Asa and Ezzat, 1998). D'autre part, l'altération génétique d'un seul clone peut être l'origine d'un adénome, ce qui expliquerait les cas d'adénomes hypophysaires non associés à l'hyperplasie de cette glande.

En tenant compte de l'application des théories de progression tumorale dans le cas particulier du cortex surrénalien, une question qui se pose naturellement concerne l'existence d'un rapport entre la malignité et la stéroïdogénèse. Ainsi, sur le plan des manifestations cliniques, les tumeurs surrénaliennes peuvent se révéler par trois grands syndromes endocriniens (Stewart, 2003) :

- Hyperaldostéronisme primaire ou syndrome de Conn, qui se traduit par une hypertension artérielle, avec hypokaliémie. Ce syndrome est lié à une tumeur bénigne.
- Syndrome adrénogénital avec virilisation ; dans ce groupe, on rencontrera une forte proportion de tumeurs malignes.
- Syndrome de Cushing : le syndrome le plus fréquent, caractérisé par l'hypercortisolisme, pouvant être retrouvé dans les cas bénins ou malins.

D'autre part, les tumeurs du cortex surrénalien peuvent être non sécrétantes (75 – 85 % des incidentalomes). Malgré une haute prévalence de ces lésions non sécrétantes, l'étude d'une grande série italienne d'incidentalomes cortico-surréaliens a démontré que de nombreux patients présentaient des manifestations cliniques compatibles avec un hypercortisolisme sous-clinique (Mantero et al., 2000). Ceci remet en question le caractère sécrétant d'une lésion surrénalienne dite « silencieuse ». La taille de la lésion peut avoir un rôle fondamental, si l'on a des cellules qui sécrètent peu mais qui sont extrêmement nombreuses, par rapport à la quantité de cellules dans une glande normale. L'hétérogénéité des lésions et les différents moments de détection de ces tumeurs contribuent à ce tableau complexe.

L'étude du rôle du récepteur de l'ACTH dans le développement tumoral a révélé son faible pouvoir transformant et inversement son importance comme facteur de différenciation cellulaire. Ainsi, la perte d'expression de ce gène peut engendrer une dédifférenciation en favorisant l'expansion clonale (Latronico, 2000). Dans l'analyse du polymorphisme *PstI* dans la région promotrice du gène *MC2R*, la perte d'hétérozygotie a été corrélée à des taux réduits de ARNm du récepteur de l'ACTH et à un comportement tumoral plus agressif (Reincke et al., 1997). Dans cette même optique de dédifférenciation associée à la malignité, il a été démontré que le facteur de transcription CREB est sous-exprimé dans des carcinomes et des adénomes non-sécrétants du cortex surrénalien (Rosenberg, Groussin *et al.*, 2003). Ces tumeurs sont considérées moins différenciées que les adénomes fonctionnels et les hyperplasies. D'autre part, l'étude de la plateforme grenobloise du transcriptome a identifié un cluster de gènes impliqués dans la stéroïdogénèse dont l'expression est diminuée dans les carcinomes analysés (de Fraipont et al., 2004). En ce qui concerne les tumeurs bénignes, l'interprétation est plus difficile parce que nous avons moins de données individualisées selon le type de lésion. Dans une série de tumeurs du type AIMAH (Bourdeau et al., 2004), l'expression des gènes *CYP11A* et *CYP17* est également diminuée, alors qu'il s'agit de lésions bénignes hypersécrétantes. Cela peut être interprété comme une expression basse relative à la cellule elle-même, tout en considérant la masse tumorale que l'on suppose être élevée. Le caractère hétérogène de ces lésions est confirmé par la démonstration d'un profil d'expression de gènes différent dans le groupe « AIMAH dépendent du GIP », comparé aux autres lésions bénignes (Bourdeau et al., 2004).