



Contribution à l'étude de l'effet de la substance P sur la sécrétion d'aldostérone dans la glande surrénale humaine normale

Julien Wils

► To cite this version:

Julien Wils. Contribution à l'étude de l'effet de la substance P sur la sécrétion d'aldostérone dans la glande surrénale humaine normale. Endocrinologie et métabolisme. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMR011 . tel-02888765

HAL Id: tel-02888765

<https://theses.hal.science/tel-02888765>

Submitted on 3 Jul 2020

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

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

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects cellulaires et moléculaires de la biologie

Préparée au sein de « l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement »

Contribution à l'étude de l'effet de la substance P sur la sécrétion d'aldostérone dans la glande surrénale humaine normale

**Présentée et soutenue par
Julien WILS**

**Thèse soutenue publiquement le 15 mai 2018
devant le jury composé de**

Madame Sheerazed BOULKROUN	Chargée de Recherche à l'INSERM, PARCC, Paris	Rapporteur
Monsieur Stanislas GRASSIN DELYLE	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Versailles St-Quentin-en-Yvelines	Rapporteur
Madame Marie-Christine VANTYGHEM	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Lille 2	Examineur
Monsieur Vincent RICHARD	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Rouen Normandie	Examineur
Monsieur Hervé LEFEBVRE	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Madame Estelle LOUISET	Chargée de Recherche à l'INSERM, DC2N, Rouen	Examineur

Thèse dirigée par le Professeur Hervé Lefebvre et co-encadrée par le Docteur Estelle Louiset, laboratoire DC2N-UMR INSERM 1239

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	9
Préambule.....	11
INTRODUCTION	13
1. La glande surrénale humaine.....	15
1.1. La corticosurrénale	15
1.2. La stéroïdogénèse surrénalienne.....	16
1.3. Les rôles physiologiques et la régulation de la synthèse des minéralocorticoïdes	20
1.3.1. Les rôles physiologiques des minéralocorticoïdes	20
➤ Les effets rénaux	20
➤ Les effets extra-rénaux.....	22
1.3.2. La régulation de la synthèse d'aldostérone par les facteurs circulants	23
➤ Effets du K^+	27
➤ Effets de l'ACTH	28
1.3.3. La régulation paracrine et autocrine de la sécrétion d'aldostérone	28
➤ Le système rénine-angiotensine tissulaire surrénalien	29
➤ Les cellules chromaffines	29
➤ Les adipocytes	30
➤ Les cellules du système immunitaire.....	30
➤ Les cellules vasculaires.....	33
➤ Les cellules et les fibres nerveuses	34
2. Les tachykinines.....	39
2.1. La substance P	40
2.2. La neurokinine B.....	44
2.3. L'hémokinine et les endokinines	44
2.4. Les récepteurs des tachykinines	44

➤ Pharmacologie des récepteurs des tachykinines	46
➤ Système de transduction des récepteurs des tachykinines.....	47
2.5. Les tachykinines et leurs récepteurs en physiopathologie.....	49
➤ La douleur	49
➤ L'inflammation neurogène.....	49
➤ Les vomissements.....	51
➤ Le cancer	51
➤ Les pathologies cardiovasculaires	51
2.6. Le développement des médicaments ciblant les tachykinines	52
2.6.1. Le développement des antagonistes NK1	52
2.6.2. L'aprépitant.....	53
OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	55
METHODES.....	59
RESULTATS	69
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	105
1. Expression des tachykinines dans la glande surrénale	107
2. Expression des récepteurs des tachykinines dans la glande surrénale.....	108
3. Effets de la SP sur les cellules corticosurréaliennes humaines	109
4. Voies de signalisation de la SP impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne humaine	110
5. Protocole APHOS : effet de l'antagoniste du récepteur NK1, l'aprépitant sur les sécrétions corticosurréaliennes chez l'homme.....	111
6. Effets de la SP sur la prolifération et la migration cellulaires corticosurréaliennes.....	114
7. Implications physiologiques du système tachyninergique dans la production d'aldostérone..	114
7.1. Stimuli physiologiques augmentant la transmission nerveuse dans la surrénale.....	114
7.2. Contrôle de la sécrétion d'aldostérone par les tachykinines au cours de la grossesse.....	115
7.3. Interactions intrasurréaliennes entre la SP et la 5-HT sur la production d'aldostérone.....	115
7.4. Interactions intrasurréaliennes entre la SP et l'Angiotensine II dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone	117

7.5. Rôle de la SP dans l'hyperaldostéronisme	117
➤ SP, hyperaldostéronisme, hyperactivité du SNA et syndrome métabolique	117
➤ SP et hyperaldostéronisme au cours de l'insuffisance cardiaque	119
➤ SP et hyperaldostéronisme dans le syndrome d'apnées du sommeil	119
REFERENCES.....	121
ARTICLES PUBLIES DANS LE CADRE DE MA FORMATION DOCTORALE	147
Résumé de Thèse.....	155

Remerciements

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, INSERM 1239, dirigé par le Dr. Youssef Anouar, au sein de l'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale à Rouen.

Madame **le Docteur Sheerazed Boulkroun**, Chargée de Recherche au sein de l'Unité INSERM U970 de Paris, me fait l'honneur de bien vouloir siéger dans ce jury. Je lui sais gré d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Monsieur le Docteur Stanislas Grassin Delye, Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier au sein de l'UFR des Sciences de la Santé Simone Veil, me fait l'honneur de bien vouloir siéger dans ce jury. Je lui sais gré d'avoir accepté d'être rapporteur de ce manuscrit.

Madame le Professeur Marie-Christine Vantyghem, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier au sein de l'Université de Lille 2 "Droit et Santé" et du CHRU de Lille me fait l'honneur de siéger dans ce jury. Je vous remercie vivement d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Monsieur le Professeur Vincent Richard, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier au sein de l'Université Rouen Normandie, d'avoir bien voulu présider ce jury. Soyez certain de mon profond respect.

Je suis reconnaissant envers **Monsieur le Professeur Hervé Lefebvre**, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier au sein de l'Université Rouen Normandie et du CHU de Rouen, qui a été mon directeur de thèse pendant ces cinq années. Votre disponibilité et votre engagement dans ce travail de thèse ont permis de mener ces travaux à terme. Vous m'avez énormément appris en physiologie surrénalienne et en Médecine, au sens large. Soyez certain de mon profond respect et de ma gratitude. Je n'oublierai pas vos enseignements.

Je tiens à remercier **Madame le Docteur Estelle Louiset**, Chargée de Recherche au sein de l'Unité INSERM U1239 de Rouen pour son encadrement de thèse et sa bienveillance pour un étudiant en thèse à cheval entre le CHU, l'UFR Santé et l'UFR des Sciences et Techniques. Je te remercie pour ta disponibilité, ton accueil, ta patience ainsi que pour nos conversations extra-recherche. Sois certaine de mon profond respect et de ma gratitude. Ces derniers mois m'ont été plus faciles en travaillant avec toi.

Le **Dr. Youssef Anouar** a accepté de m'accueillir au sein du laboratoire DC2N et a mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail. Je tiens à lui témoigner mon respect.

Madame le Docteur Céline Duparc, je te suis reconnaissant pour ton encadrement et tes conseils et ton apprentissage à la paillasse. La thèse a été plus agréable grâce à ton sens de la convivialité et ton talent d'organisatrice des anniversaires.

Michaël, je te suis reconnaissant pour tes enseignements et la transmission de ta culture « franco-américaine » surrégalienne. **Isabelle**, je te remercie pour tes conseils et ton aide précieuse en biologie moléculaire. **Sylvie**, pour tes conseils et ton bon sens durant cette thèse.

Les étudiants de l'équipe 4, Julie, merci pour ces quelques années de thèse passées ensemble. Je souhaite que tes projets se concrétisent. Merci pour Moumouche. **Alexandre**, ça fait quelques années de thèse ensemble également, des repas du midi pleins d'idées, c'était très enrichissant. C'est également la dernière ligne droite pour toi. **Hadrien**, plus de cinq ans que nous nous connaissons, une grande échéance s'approche également à grands pas pour toi, je suis très honoré d'être aux premières loges. Une pensée pour **Zakariae et Mylène**, le début de thèse était sympa avec vous, nos chemins se croiseront peut-être de nouveau. Une pensée pour **Antoine-Guy**, qui prend la suite, fais attention, le travail sur les tachykinines, ça passe vite.

Je suis reconnaissant envers **les Pr. et Dr Christian Thuillez, Vincent Richard, Robinson Joannidès et Jérémy Bellien** et une pensée également à **Patricia Compagnon**. Monsieur Thuillez, je vous remercie pour votre soutien et votre confiance depuis ces quelques années. Je vous suis reconnaissant de m'avoir accueilli dans le service de Pharmacologie. Vincent, je vous remercie pour ce compagnonnage au cours de ce début de carrière hospitalo-universitaire, de continuer le travail initié par Christian Thuillez. J'ai encore beaucoup à apprendre à vos côtés. Je tiens à vous témoigner mon profond respect. Robinson, j'apprends beaucoup auprès de toi. Je te remercie pour ta patience et ton enseignement. J'ai encore beaucoup à apprendre à tes côtés. Sois assuré de ma profonde gratitude. Jérémy, je te suis reconnaissant pour tes conseils avisés et ton aide dans ce parcours pas très simple. Patricia, c'est grâce à toi si j'ai rencontré la Pharmacologie, sois assurée de mon profond respect.

Je remercie mes anciens chefs de Biochimie, **Pr. Soumeia Bekri** pour m'avoir accompagné durant mes débuts en recherche, **Dr. Sophie Claeysens, Dr. Muriel Quillard**. J'adresse mes remerciements particuliers au **Dr Bruno Cauliez**, mon directeur de thèse d'exercice, qui m'a accompagné pour la première fois au laboratoire à Mont-Saint-Aignan. Valéry, voici quelques années que tu me conseilles judicieusement, sois assuré de mon amitié.

A Mihaela et Ouali, soyez remerciez pour ce que vous avez fait. Dix ans après, vous êtes toujours là.

Sarah et notre poussinette, que puis-je écrire que vous ne savez déjà ? Sarah, ce n'était pas simple mais ta patience, ton soutien et ce que tu sais ont fait la différence.

Se réunir est un début, rester ensemble est un progrès, travailler ensemble est la réussite. Henry Ford

Liste des abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine, sérotonine

5-HT4 : Récepteur de la sérotonine de type 4

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

ACTH : *AdrenoCorticoTropic Hormone*, hormone corticotrope, adrénocorticotropine

ACAT : AcylCoA cholestérol acyltransférase

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ANGII : Angiotensine II

AJG : Appareil juxta-glomérulaire

APCC : Aldosterone-Producing Cell Clusters

AT1R : *Angiotensin II receptor type 1*

AVP : Vasopressine

BNP : Brain Natriuretic Peptide

CamK : *Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases*

Ca²⁺: Calcium

CREB : *Cyclic AMP response element binding protein*

CGRP : *Calcitonin gene-related peptide*

DAG : Diacylglycérol

DHEA : Déhydroépiandrostérone

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DPP4 : Dipeptidyl peptidase-4

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine I

EETs: Acides époxyeicosatriénoïques

EMPHASIS-HF: *Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure*

ENaC: *Epithelial sodium channel*, canal épithélial sodique

eNANC: *Excitatory non-adrenergic non-cholinergic, composante non-adrénergique non-cholinergique*

EPHESUS : *Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study*

ERK : *Extracellular signal-regulated kinases*

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

GPCR : *G protein-coupled receptors*, récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G

HDL: *High-density lipoprotein*

HMGcoA reductase: *Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*

HRE: *Hormone response elements*

HSL: *Hormone sensitive lipase*

HTA : Hypertension artérielle

ICAM1: *Intracellular Cell Adhesion Molecule 1*

IEC: *Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion*

IP3: Inositol trisphosphate

LDL: *Low-density lipoprotein*

Ki : constante de dissociation obtenue par inhibition de la fixation d'un ligand marqué en compétition avec un ligand non marqué, à l'équilibre de la réaction

Na⁺ : Sodium

NANC : non-adrenergic non-cholinergic

NK1 : *Neurokinin 1 receptor*, récepteur des tachykinines de type 1

NKA: Neurokinine A

NKB: Neurokinine B

NO: *Nitric oxide*, monoxyde d'azote

NOS: *Nitric oxide synthase*

NR3C2: *Nuclear Receptor sub-family 3 groupe C member 2*

NURR1: *Nuclear receptor related-1 protein*

PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase

PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PKC: Protéine kinase C

RALES : *Randomized Aldactone Evaluation Study*

RM : Récepteur des minéralocorticoïdes

SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central

SNP : Système nerveux périphérique

SP : Substance P

SRA: Système Rénine-Angiotensine

SR-B1: *Scavenger receptor class B1*

StAR: *Steroidogenic acute regulatory protein*

TACR1s : Variant d'épissage du gène TACR1 codant l'isoforme courte du récepteur

TACR1l : Variant d'épissage du gène TACR1 codant l'isoforme longue du récepteur

TCD : *Tube Contourné Distal*

TKs : Tachykinines

VCAM1: *Vascular cell adhesion molecule 1*

VLDL: *Very-low density lipoprotein*

Préambule

Le système nerveux et le système endocrinien jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des mammifères. Ces deux entités interagissent l'une avec l'autre à différents niveaux depuis l'étage hypothalamo-hypophysaire jusqu'aux organes périphériques. L'hypothalamus intervient comme un relais neurohormonal intérateur des différents signaux d'origines nerveuses centrale et périphérique pour déclencher *in fine* la libération de multiples hormones (1). Si l'étude de ces mécanismes a constitué la base de l'émergence de la neuroendocrinologie, il est vite apparu que les interactions entre le système nerveux et le tissu endocrine n'étaient pas l'apanage exclusif du complexe hypothalamo-hypophysaire. En particulier, la glande surrénale, dont la structure histologique avec ses composantes endocrinienne, le cortex, et nerveuse, la medulla, favorise les interactions entre les hormones et les neurotransmetteurs, est une bonne illustration de l'extension de la neuroendocrinologie aux glandes endocrines périphériques. Des travaux ont en effet montré l'existence d'influences mutuelles entre ces deux tissus à la fois en physiologie et en physiopathologie (2). En outre, le cortex surrénalien reçoit une riche innervation dont les terminaisons sont localisées au contact des cellules stéroïdogènes. L'action du tissu médullosurrénalien et des fibres nerveuses sur la libération des corticostéroïdes est relayée par de multiples neurotransmetteurs au sein desquels les tachykinines semblent jouer un rôle significatif chez plusieurs espèces animales. En revanche, leur implication en physiologie et physiopathologie surrénaliennes reste à ce jour peu étudiée chez l'homme. Ce travail a donc pour but de décrire la régulation du cortex surrénalien humain par les tachykinines et de préciser la fonction physiologique de ce contrôle.

INTRODUCTION

1. La glande surrénale humaine

Les glandes surrénales sont des glandes paires, localisées au pôle supérieur des reins dans la région rétropéritonéale et incluses dans la graisse périrénale. Chaque glande est enveloppée d'une capsule conjonctive dense. Le parenchyme glandulaire est formé par deux tissus aux origines embryologiques distinctes et aux fonctions sécrétoires propres, la corticosurrénale ou cortex surrénalien et la médullosurrénale.

1.1. La corticosurrénale

La corticosurrénale est la couche de cellules qui constitue la zone périphérique de la glande, entourant la medulla. Elle a pour rôle de synthétiser et de libérer plusieurs hormones stéroïdes, dénommées corticostéroïdes. Le cortex surrénalien dérive du mésoblaste, l'un des feuilletts embryonnaires, et plus précisément du primordium adrénogonadique (3). Le cortex se subdivise en trois zones morphologiques et fonctionnelles, de la périphérie vers l'intérieur, la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée. Cette zonation fonctionnelle résulte de la migration centripète des cellules corticosurréniennes qui naissent des cellules souches capsulaires et sous-capsulaires pour atteindre *in fine* la zone réticulée (4) en passant par plusieurs stades de différenciation successifs au cours de leur trajet.

La zone glomérulée est la couche cellulaire la plus externe du cortex surrénalien (Figure 1). Cette zone de faible épaisseur représente 15% du volume du cortex surrénalien et est composée de cellules stéroïdogènes organisées en glomérules ou rosettes. Ces cellules sont responsables de la synthèse des minéralocorticoïdes, avec pour chef de file l'aldostérone. Cette hormone participe à la régulation de l'homéostasie hydrosodée (réabsorption du Na^+) sous le contrôle du système rénine angiotensine (SRA) avec comme effecteur l'angiotensine II (ANGII), du potassium (K^+) plasmatique et, dans une moindre mesure, de l'hormone corticotrope ou adrénocorticotropine (ACTH). Enfin, des travaux récents décrivent des modifications fonctionnelles de la zone glomérulée au cours du vieillissement. En effet, la zone glomérulée qui apparaît comme une couche fine de cellules sécrétrices d'aldostérone chez les sujets jeunes devient discontinue au cours du vieillissement avec l'apparition de « clusters » de cellules productrices d'aldostérone, les APCC (*aldosterone-producing cell clusters*) (5), (6).

La zone fasciculée est la couche la plus épaisse du cortex surrénalien, représentant plus de 70% du cortex (**Figure 1**). En son sein, les cellules stéroïdogènes sont organisées en faisceaux séparés

par des capillaires sanguins. Ces cellules synthétisent et sécrètent les hormones glucocorticoïdes, avec comme chef de file, le cortisol. Cette hormone est impliquée, entre autres, dans le développement fœtal, la réponse inflammatoire, le métabolisme énergétique et la réponse au stress relayée par l'ACTH.

La zone réticulée est la couche la plus interne du cortex surrénalien située entre la zone fasciculée et la médullosurrénale. Les cellules stéroïdogènes de cette zone sécrètent des androgènes, majoritairement de la déhydroépiandrostérone (DHEA) et son dérivé sulfaté, le sulfate de DHEA (SDHEA). Ces cellules sont également sous la dépendance de l'ACTH.

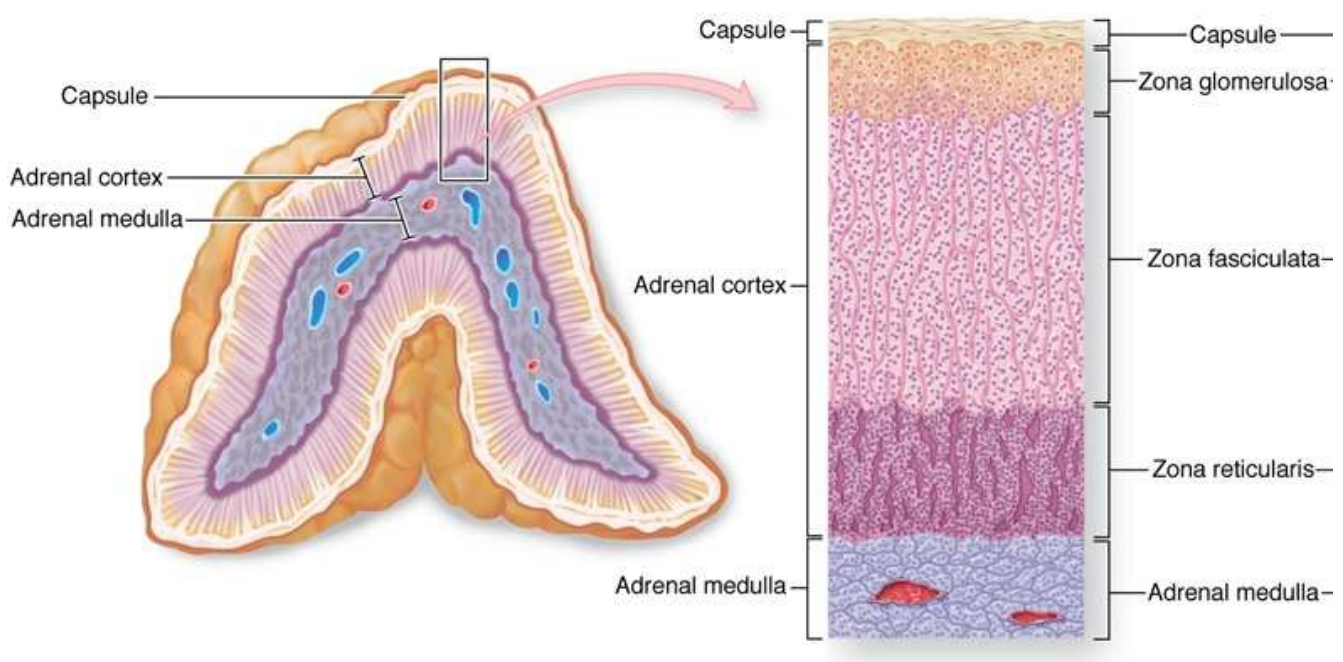


Figure 1. Histologie de la glande surrénale humaine adulte (d'après Mescher). La glande surrénale est composée du cortex surrénalien et de la médullosurrénale.

1.2. La stéroïdogénèse surrénalienne

La stéroïdogénèse surrénalienne correspond à l'ensemble des processus biochimiques des trois zones du cortex surrénalien aboutissant à la synthèse des stéroïdes. Ces hormones corticosurréaliennes sont synthétisées à partir du cholestérol et sont sécrétées dans la circulation systémique. Le cholestérol, utilisé au cours de la stéroïdogénèse surrénalienne, provient en grande partie de la circulation sanguine dans laquelle il est transporté par différentes lipoprotéines : des lipoprotéines de forte densité ou HDL (*High-density lipoprotein*) et de faible densité, de type LDL (*Low-density lipoprotein*). L'apport du cholestérol à la cellule stéroïdogène se

fait majoritairement *via* la capture sélective du HDL-cholestérol par les récepteurs membranaires SR-B1 (*Scavenger receptor-class B1*) (7), (8) et dans une moindre mesure, via l'endocytose du LDL-cholestérol (**Figure 2**). Le cholestérol est également transporté par des lipoprotéines de très faible densité : les *very low-density lipoprotein* (VLDL). Ces dernières stimulent la sécrétion d'aldostérone par les cellules corticosurréaliennes, leur conférant un rôle différent des lipoprotéines HDL et LDL (9). De plus, le cholestérol provient en faible proportion d'une néosynthèse surrénalienne. En effet, les cellules stéroïdogènes expriment l'HMGCoA réductase, enzyme clé de la synthèse de cholestérol (7), (10), (11).

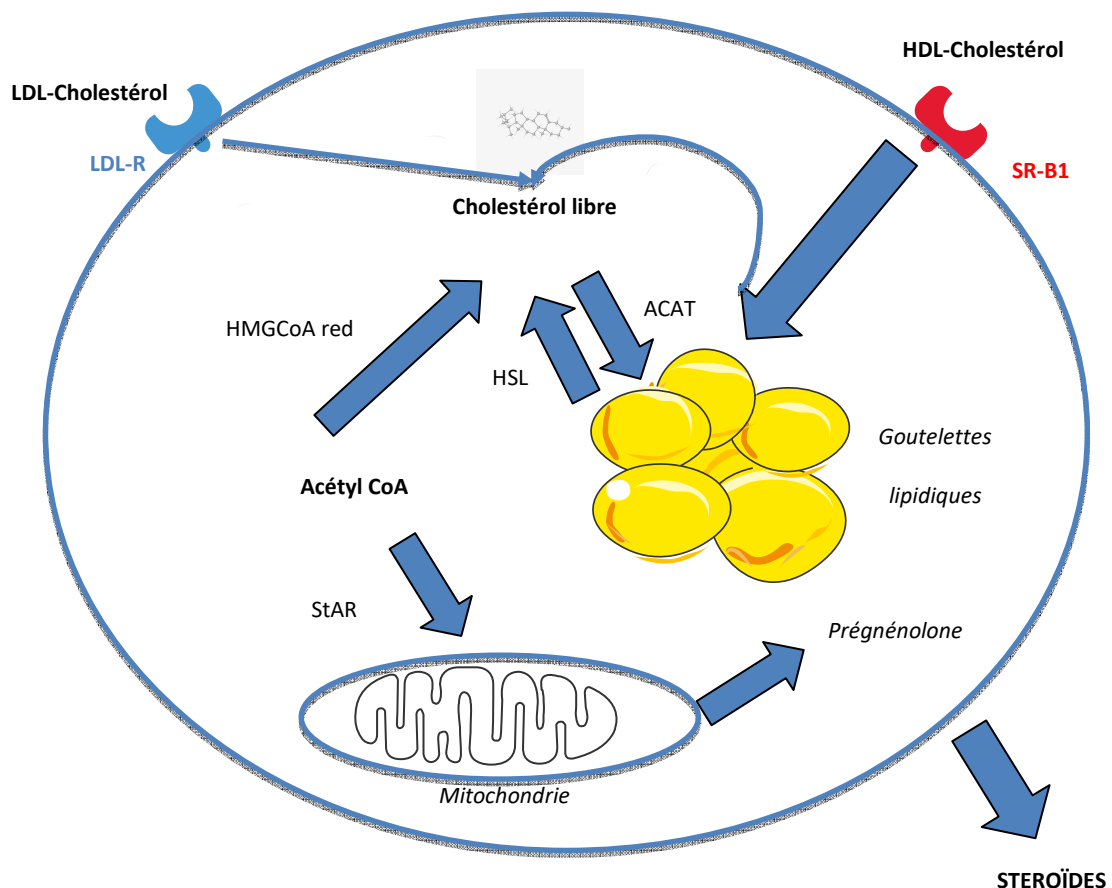


Figure 2. Les différentes sources de cholestérol dans la cellule stéroïdogène du cortex surrénalien. Le cholestérol peut être apporté, via la circulation sanguine, par les lipoprotéines de type LDL et HDL qui se fixent respectivement aux récepteurs du LDL-cholestérol et au récepteur SR-B1. Les cellules corticosurréaliennes sont également capables de synthétiser du cholestérol à partir de l'acétylCoA grâce à l'HMGCoA réductase. Après estérification par ACAT, le cholestérol est stocké dans des gouttelettes lipidiques. Le cholestérol est transporté dans la mitochondrie par StAR, ce qui initie la stéroïdogénèse. Abréviations: ACAT: AcylCoA cholesterol acyltransferase; HMGcoA red: HMGcoA reductase; HSL: Hormone sensitive lipase, LDL-R: LDL receptor; SRB1: scavenger receptor classe B, type I; StAR: Steroidogenic acute regulatory protein.

Quelle que soit la source de cholestérol, ce dernier est stocké dans des gouttelettes lipidiques sous sa forme estérifiée, après action de l'acylCoA cholestérol acyltransférase (ACAT). En fonction des besoins, le cholestérol est desestérifié en cholestérol libre par la lipase sensible aux hormones (HSL, *hormone sensitive lipase*) (12). Cette forme libre est alors transportée par différentes protéines dans le cytoplasme, tout d'abord vers la mitochondrie puis entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. L'étape initiale limitante de la stéroïdogénèse se déroule au niveau de la mitochondrie ; le cholestérol libre est transféré par la protéine mitochondriale StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) vers la membrane mitochondriale interne. A ce niveau, une première réaction, catalysée par le cytochrome CYP450scc (scc: *side chain cleavage*) codé par le gène *CYP11A1*, aboutit à la synthèse de prégnénolone par hydrolyse de la chaîne carbonée latérale du cholestérol (**Figure 3**). La prégnénolone constitue un carrefour métabolique qui conduit à la synthèse des différents stéroïdes surrénaliens en fonction du contingent enzymatique spécifique de chaque zone corticale. Au sein de la voie de synthèse des minéralocorticoïdes (**Figure 3**), la prégnénolone est d'abord métabolisée en progestérone sous l'action de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 localisée dans le réticulum endoplasmique. La progestérone est ensuite transférée dans la mitochondrie où la 21 β -hydroxylase codée par le gène *CYP21A2*, convertit la progestérone en 11-désoxycorticostérone (11-DOC). Enfin, la conversion de la 11-DOC en aldostérone a lieu sous l'action de l'aldostérone synthase codée par le cytochrome *CYP11B2*, et constitue une autre étape limitante de la synthèse des minéralocorticoïdes. L'aldostérone synthase catalyse trois réactions enzymatiques qui sont successivement : une 11 β -hydroxylation de la 11-DOC en corticostérone, une 18-hydroxylation de la corticostérone en 18-hydroxycorticostérone, elle-même étant finalement transformée en aldostérone par une 18-oxydation.

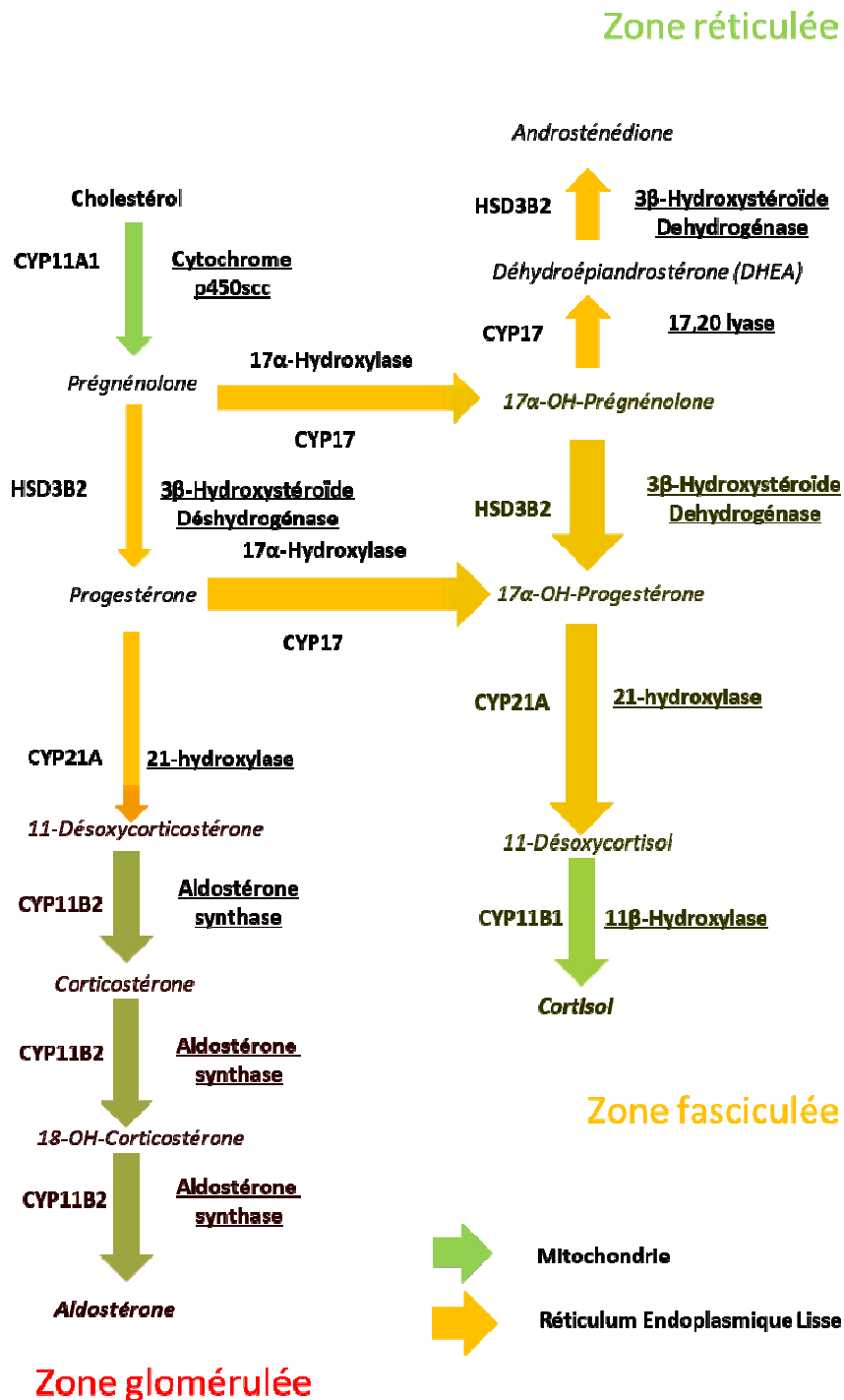


Figure 3. Schéma de la stéroïdogénèse surrénalienne. La stéroïdogénèse surrénalienne est composée d'étapes communes aux trois zones du cortex et d'étapes spécifiques à chacune d'elles. En effet, l'expression de CYP11B2 dans la zone glomérulée oriente vers la synthèse d'aldostérone, alors que l'expression de CYP17 dans les zones fasciculée et réticulée oriente la stéroïdogénèse vers la synthèse des glucocorticoïdes et des androgènes surrénaliens. L'expression de CYP11B1 aboutit à la synthèse de cortisol dans la zone fasciculée. Enfin, dans la zone réticulée la présence de CYP17 à activité 17,20 lyase permet la formation des androgènes surrénaliens.

1.3. Les rôles physiologiques et la régulation de la synthèse des minéralocorticoïdes

1.3.1. Les rôles physiologiques des minéralocorticoïdes

L'aldostérone joue un rôle majeur dans la régulation de l'équilibre hydrosodé en participant au contrôle de la balance sodée et de la volémie. Cette hormone participe ainsi au contrôle de la pression artérielle, aux côtés d'autres facteurs (ANGII).

➤ Les effets rénaux

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Chez l'homme, 180 litres par jour de liquide sont filtrés à travers le glomérule. A l'issue de la filtration glomérulaire, le fluide filtré forme l'urine primitive. Dans cette urine, le Na^+ est réabsorbé de façon obligatoire au niveau du tubule proximal (60% du Na^+ tubulaire réabsorbé) et de l'anse de Henlé (30% du Na^+ tubulaire réabsorbé) et de façon facultative au niveau du néphron distal constitué, du tubule contourné distal (TCD) et du tube collecteur cortical (13). La réabsorption au niveau du néphron distal est sous la dépendance de l'aldostérone ; assurant ainsi une régulation fine de la réabsorption finale de sodium (14) (15) (**Figure 4**).

Le TCD peut être divisé en deux segments : le tubule contourné distal précoce, TCD1 et le tubule contourné distal tardif, TCD2. Chaque tube contourné distal est lié au tube collecteur par un tube connecteur. Le tube collecteur reçoit la confluence de plusieurs tubes contournés distaux. Dans la cellule tubulaire du néphron distal, la réabsorption de Na^+ se produit de l'urine, au pôle apical de la cellule, vers le sang, au pôle basal, sous le contrôle de l'aldostérone. Au niveau du tube contourné distal, deux acteurs favorisent la réabsorption de sodium : [i] le co-transporteur Na^+/Cl^- sensible aux thiazidiques (NCC, NaCl cotransporter), dont l'expression est maximale dans le TCD1 et décroît vers le TCD2, [ii] le canal épithélial sodium ENaC sensible à l'amiloride, qui n'est pas exprimé dans le TCD1 mais est exprimé de manière croissante le long du TCD2. A côté de l'activation du canal ENaC sensible à l'amiloride, l'aldostérone active également l'expression et l'activité du cotransporteur Na-Cl sensibles aux diurétiques thiazidiques (16).

Au pôle apical de la cellule du DCT, les ions Na^+ sont réabsorbés à la membrane apicale par le cotransporteur NaCl sensibles aux thiazidiques (NCC) et le canal épithélial ENaC, tandis que les ions K^+ sont excrétés par le canal ROMK (*renal outer medullary potassium channel*) vers la lumière tubulaire accompagnés des ions H^+ (**Figure 4**). Cette réabsorption tubulaire de Na^+ est générée par un gradient électrochimique assuré par la pompe sodium-potassium ou Na^+/K^+ ATPase localisée au

pôle basal de la cellule tubulaire. Cette pompe permet l'échange de deux ions K^+ contre trois ions Na^+ (17).

Les échanges ioniques sont régulés par la fixation de l'aldostérone sur le récepteur des minéralocorticoïdes, RM. En effet, sur le plan moléculaire, l'aldostérone se lie avec une forte affinité de manière spécifique à son récepteur RM codé par le gène *NR3C2* (*Nuclear Receptor sub-family 3 groupe C member 2*). Le récepteur RM réside à l'état inactif dans le cytoplasme (18). La liaison de l'aldostérone au RM déclenche la translocation du complexe aldostérone-RM du cytoplasme vers le noyau. A ce niveau, le complexe se lie à des séquences nucléotidiques spécifiques, les éléments de réponse aux minéralocorticoïdes (HRE), situés dans la région promotrice des gènes cibles, tels que les gènes codant le canal ENaC et la pompe Na^+/K^+ ATPase, ce qui active la transcription de ces derniers (15).

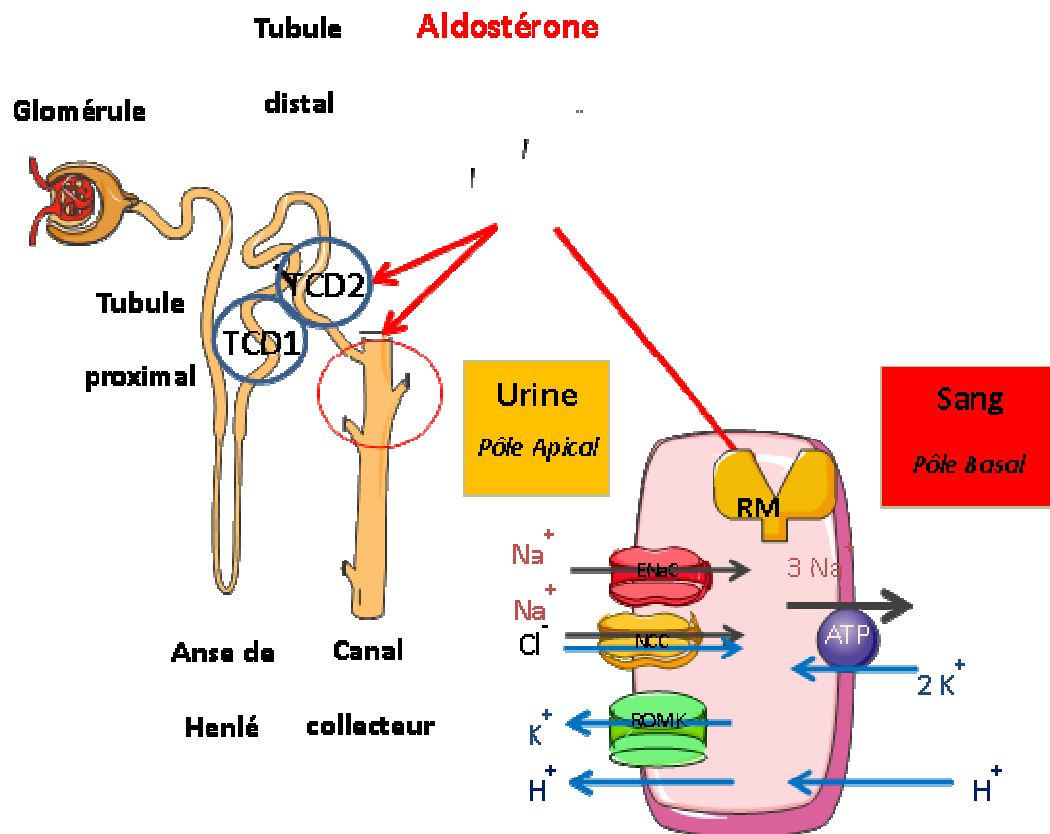


Figure 4. Action de l'aldostérone au niveau du tube collecteur et du tubule contourné distal du néphron. Le canal épithélial sodique (ENaC) assure la réabsorption de sodium au pôle apical de la cellule tubulaire en échange de la sortie de potassium par le canal ROMK, et une pompe Na^+/K^+ ATPase au pôle basal permet la sortie de 3 ions Na^+ contre l'entrée de 2 ions K^+ (21) ; RM: récepteur des minéralocorticoïdes, ENaC: epithelial sodium channel, ROMK: renal outer medullary potassium channel, Na^+/K^+ ATPase: pompe Na^+/K^+ ATPase, NCC: sodium-chloride symporter ou co-transporteur sodium-chlore. TCD1 : tubule contourné distal précoce, TCD2 : tubule contourné distal tardif.

Le RM est fortement exprimé dans la portion corticale du tube collecteur rénal et dans une moindre mesure dans le tubule distal. Le RM lie avec la même affinité le cortisol et l'aldostérone (19). Les concentrations circulantes de cortisol étant près de mille fois supérieures à celles d'aldostérone, l'accès de l'aldostérone à son récepteur dans ses tissus cibles est préservé grâce à l'inactivation du cortisol en cortisone. Cette inactivation est réalisée par une enzyme, la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (11 β -HSD2). L'enzyme 11 β -HSD2 est exprimée dans le segment TCD2 et non dans le TCD1. Cette expression différentielle de 11 β -HSD2 a pour conséquence que seul le TCD2 est sensible à l'action de l'aldostérone. La diminution de l'activité de la 11 β -HSD2 est responsable du syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes (20). Ce dernier est soit constitutionnel avec un tableau clinique d'hypertension artérielle juvénile associée à une hypokaliémie sans élévation de l'aldostérone plasmatique (syndrome d'Ulick), soit acquis dans le cadre des intoxications à la glycyrrhizine, principe actif inhibiteur de la 11 β -HSD2.

Suivant les conditions physiologiques, l'aldostérone agit sur la cellule tubulaire distale qui est capable de réabsorber du sodium en cas d'hypovolémie et de sécréter du potassium en cas d'hyperkaliémie. Ces différences d'effets constituent le « paradoxe de l'aldostérone ». Un des acteurs de ces effets différentiels en fonction du stimulus est une sérine/thréonine kinase, WNK4 (*Lysine Deficient Protein Kinase 4*). L'hypovolémie stimule le système rénine-angiotensine conduisant à l'augmentation des concentrations circulantes d'ANGII, ce qui n'est pas le cas de l'hyperkaliémie. Au niveau de la cellule tubulaire du TCD, les effets de l'aldostérone et de l'ANGII peuvent se résumer de la manière suivante : (i) à l'état basal, il y a une activation de WNK4 qui agit comme un inhibiteur de NCC, de ENaC et de ROMK, (ii) en cas d'hypovolémie, WNK4 sous la dépendance de l'ANGII et de l'aldostérone, active NCC et ENaC et inhibe ROMK, (iii) en cas d'hyperkaliémie, sous l'effet de l'aldostérone, WNK4 inhibe NCC mais active ENaC tandis qu'elle active ROMK (16).

➤ Les effets extra-rénaux

Le RM est également présent dans des tissus extra-rénaux, au niveau d'autres tissus épithéliaux et non-épithéliaux, dans le système nerveux central, le système cardiovasculaire (22) (23), (24). Ce récepteur est exprimé au niveau du SNC, dans l'hypothalamus et le tronc cérébral où il participe à la régulation centrale de la pression artérielle et de l'équilibre hydro électrolytique (25), (26), (27). Le RM stimule la réabsorption du Na⁺ depuis la lumière colique vers les vaisseaux sanguins grâce à

des processus identiques à ceux impliqués dans les effets rénaux de l'aldostérone (28). Le RM colique activé contribue au maintien du capital sodé de l'organisme.

Chez l'homme adulte, le RM cardiaque est principalement occupé par le cortisol en raison de l'absence de l'enzyme 11 β -HSD2. Le RM est nécessaire à la trophicité myocytaire. Son activation contribue à la prolifération des cardiomyocytes au cours du développement embryonnaire et à un moindre degré durant la croissance (29). En conditions pathologiques, la surexpression du RM cardiaque s'accompagne d'un remodelage ventriculaire caractérisé par une hypertrophie myocardique, une fibrose interstitielle, une altération de la contractilité cardiaque et des troubles du rythme cardiaque (30). Dans de telles situations, l'antagonisme du RM a un effet bénéfique sur ces différentes altérations. Le blocage pharmacologique du RM réduit la morbi-mortalité des sujets atteints d'un infarctus du myocarde compliqué ou non d'une dysfonction et d'une insuffisance cardiaques comme l'ont montré les différents essais cliniques RALES (31) en 1999, EPHESUS en 2003 (32) et EMPHASIS-HF en 2011 (33).

Le RM, exprimé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires joue un rôle indirect dans la régulation du flux sanguin, du tonus vasculaire et de la pression artérielle (34). Le RM activé participe au remodelage vasculaire en favorisant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de collagène et d'autres protéines de la matrice extracellulaire (35), (36). En conditions physiologiques, l'aldostérone exerce des effets vasodilatateurs endothélium-dépendants, via notamment l'augmentation d'expression de la NO synthase (NOS) endothéliale (37). En revanche, en conditions pathologiques, l'aldostérone exerce des effets délétères sur les vaisseaux. Des altérations vasculaires ont ainsi été observées chez des patients présentant une hypersécrétion chronique d'aldostérone, comme une augmentation de la rigidité artérielle et de l'épaisseur intima-média (38). Les effets vasculaires délétères de l'activation du RM passent également par une augmentation du stress oxydant, une augmentation de la production de molécules de l'inflammation et des effets vasoconstricteurs (37), (39).

1.3.2. La régulation de la synthèse d'aldostérone par les facteurs circulants

La synthèse d'aldostérone est stimulée par différents facteurs, l'ANGII, le K⁺, et à un degré moindre, l'ACTH (40). Le K⁺ et l'ANGII entraînent une dépolarisation membranaire, favorisent une augmentation de la concentration intra-cytoplasmique de calcium (Ca²⁺) dans la cellule de la zone glomérulée. Ces facteurs stimulent la synthèse d'aldostérone de manière aiguë dans un délai de

l'ordre de quelques minutes, ou de manière chronique pour des périodes de l'ordre de quelques heures à quelques jours (40).

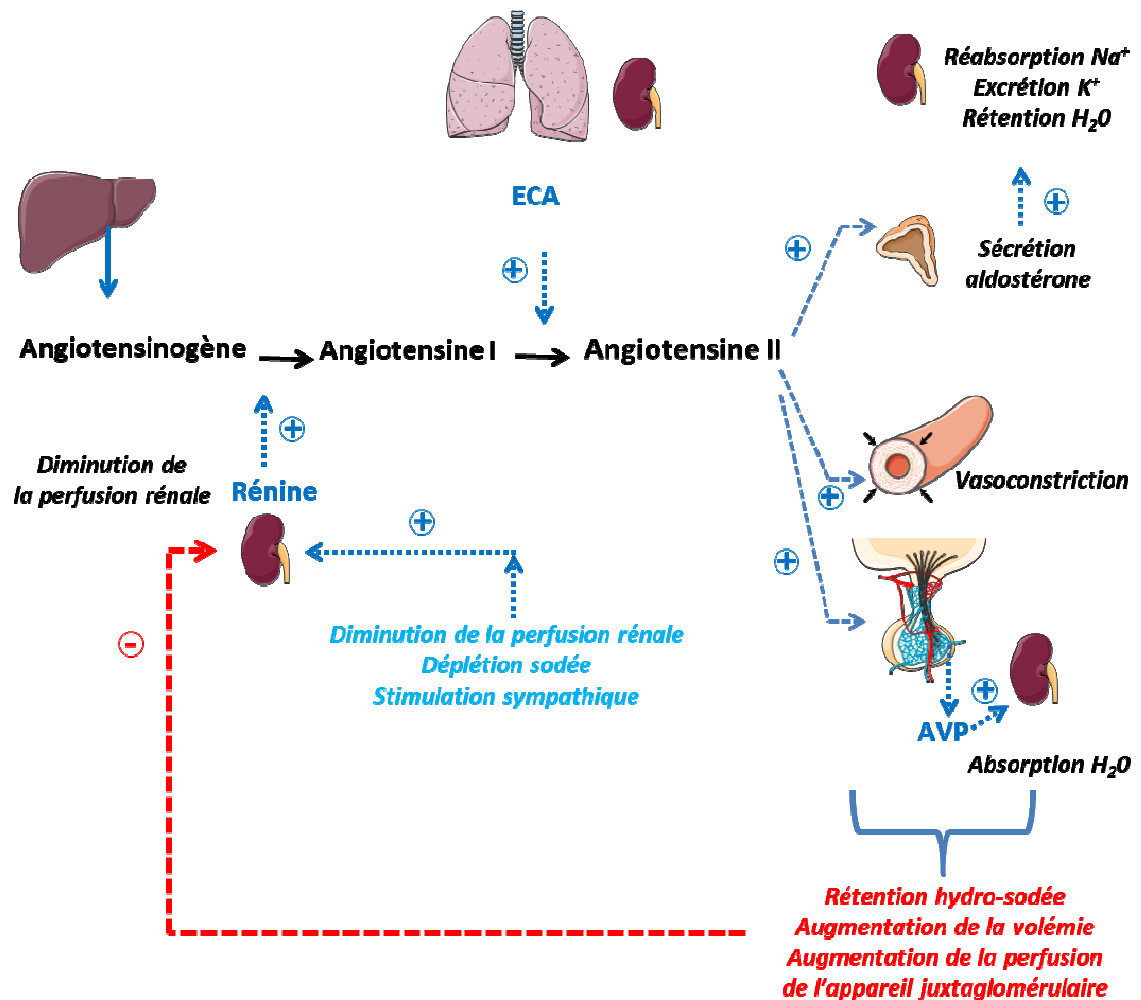


Figure 5. Système rénine-angiotensine. L'appareil juxtaglomérulaire sécrète de la rénine active en réponse à une diminution de la pression artérielle, une stimulation par le système sympathique et par une déplétion sodée. La rénine clive l'angiotensinogène produite par le foie en angiotensine I. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), produite par l'endothélium pulmonaire et rénal, transforme l'angiotensine I en angiotensine II active. En agissant sur des organes effecteurs (reins, surrénales, hypophyse), l'angiotensine II va contribuer à augmenter la volémie et la pression artérielle en favorisant la rétention d'eau.

➤ Système Rénine-angiotensine :

L'équilibre hydroélectrolytique et la régulation de la volémie sont particulièrement dépendants du SRA chez les mammifères (41) notamment en modulant la sécrétion de rénine par l'appareil juxta-glomérulaire (AJG) (**Figure 5**). Ce dernier est constitué des artéioles afférentes et efférentes, de la macula densa et du mésangium extraglomérulaire. Trois mécanismes principaux contrôlent la

sécrétion de rénine par les cellules de l'AJG: [1] la stimulation des barorécepteurs rénaux par une diminution de la pression de perfusion rénale qui se produit en cas d'hypotension, état de choc, hémorragie et insuffisance cardiaque; [2] la stimulation des cellules de la macula densa par une diminution du NaCl dans le tubule distal comme cela se produit au cours de la déplétion sodée; [3] la stimulation des récepteurs β -adrénergiques induite par des terminaisons nerveuses sympathiques ou par les catécholamines circulantes (42). La rénine libérée va cliver l'angiotensinogène synthétisé de manière constitutive par le foie pour générer un décapeptide, l'angiotensine I. Sous l'action de l'ECA (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine), une carboxypeptidase d'origine pulmonaire, l'angiotensine I est transformée en ANGII. L'ANGII se fixe à deux types de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR), le récepteur AT1 (*Angiotensin II Type 1 Receptor*) et le récepteur AT2 (*Angiotensin II Type 2 Receptor*). Le récepteur AT1 est responsable des effets cardiovasculaires de l'ANGII (48). L'ANGII élève la pression artérielle par plusieurs mécanismes. En effet, ce peptide exerce des effets vasoconstricteurs puissants qui entraînent une augmentation des résistances vasculaires périphériques et d'autre part, il favorise l'augmentation de la réabsorption tubulaire rénale de Na^+ . L'ANGII a également des effets nerveux centraux, en se liant à son récepteur AT1 au niveau des noyaux supraoptiques et paraventriculaires hypothalamiques où il stimule la synthèse de vasopressine (43) qui est libérée par la post-hypophyse vers la circulation sanguine. Cette libération d'AVP potentialise la réabsorption d'eau au niveau du canal collecteur rénal (**Figure 5**).

Le récepteur AT1 est fortement exprimé dans la zone glomérulée surrénalienne où il favorise la synthèse et la sécrétion de l'aldostérone (8). Le récepteur AT1 est couplé, via une protéine Gq/11, à la voie de la phospholipase C (PLC). La PLC hydrolyse un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et en inositol trisphosphate (IP3) (48). Puis, l'IP3 favorise la mobilisation des stocks de Ca^{2+} intracellulaire. L'élévation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} active à court terme les acteurs de la stéroïdogénèse, notamment via une protéine, la calmoduline. En effet, cette protéine, active différentes kinases dont les CamK (*Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases I/II*), qui phosphorylent et activent à leur tour, différents acteurs de la stéroïdogénèse dont la protéine Star (48), (49). Enfin, l'activation du récepteur AT1 favorise la fermeture des canaux potassiques et l'ouverture de canaux calciques membranaires, provoquant un influx d'ions Ca^{2+} vers le cytosol (**Figure 6**) (10).

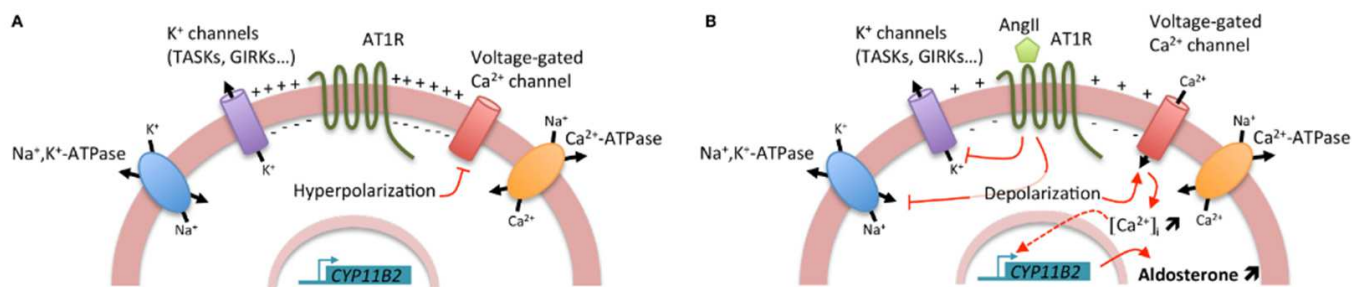


Figure 6. Implication des pompes et des canaux membranaires dans la régulation de la synthèse d'aldostérone lors de la liaison de l'ANGII au récepteur AT1. (A) Dans des conditions de repos, les cellules de la zone glomérulée (ZG) présentent un potentiel membranaire fortement négatif (-80 mV) en raison de l'expression d'un grand nombre de canaux potassiques qui entraînent une sortie de potassium de la cellule. (B) Stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone par l'ANGII. La liaison d'ANGII au récepteur AT1R induit une cascade d'événements moléculaires conduisant à la dépolarisation des cellules de la ZG et à l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . L'inhibition des canaux potassiques et de la Na^+/K^+ -ATPase lors de l'activation du récepteur AT1 entraîne la dépolarisation des cellules de la ZG, l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . La génèse du signal calcique régule positivement la transcription de CYP11B2 entraînant une augmentation de la biosynthèse de l'aldostérone (D'après Boulkroun et al, 2015).

L'apport de cholestérol dans la mitochondrie est l'étape limitante à la phase aiguë de la stéroïdogénèse. L'ANGII régule de manière précoce la mobilisation du cholestérol dans les gouttelettes lipidiques vers la mitochondrie, un processus qui nécessite des réarrangements du cytosquelette (44) et une activation de la lipoprotéine lipase hormonosensible par les protéines kinases ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase 1/2*) (45). L'ANGII exerce un effet positif sur le passage du cholestérol contenu dans les gouttelettes lipidiques vers la mitochondrie puis le transfert du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane mitochondriale interne via la phosphorylation de StAR par les protéines CamK et ERK1/2 (**Figure 7**) (40), (46). La voie ERK fait intervenir une cascade séquentielle de kinases dont les protéines ERK1/2. Ces kinases appartiennent à la famille des MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) participant d'une part dans les processus de prolifération, de division et de croissance cellulaires et d'autre part dans des processus de sécrétion telles que les hormones stéroïdes dont l'aldostérone (47), (48). Au niveau mitochondrial, il existe un couplage calcique entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie grâce à un « pipeline » entre ces 2 organites, le Ca^{2+} étant transporté du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie (49) ; Le signal calcique favorise l'augmentation de l'expression de la NADPH (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

mitochondriale qui joue, entre autres, le rôle de cofacteur des enzymes mitochondriales de la stéroïdogénèse (50), (51).

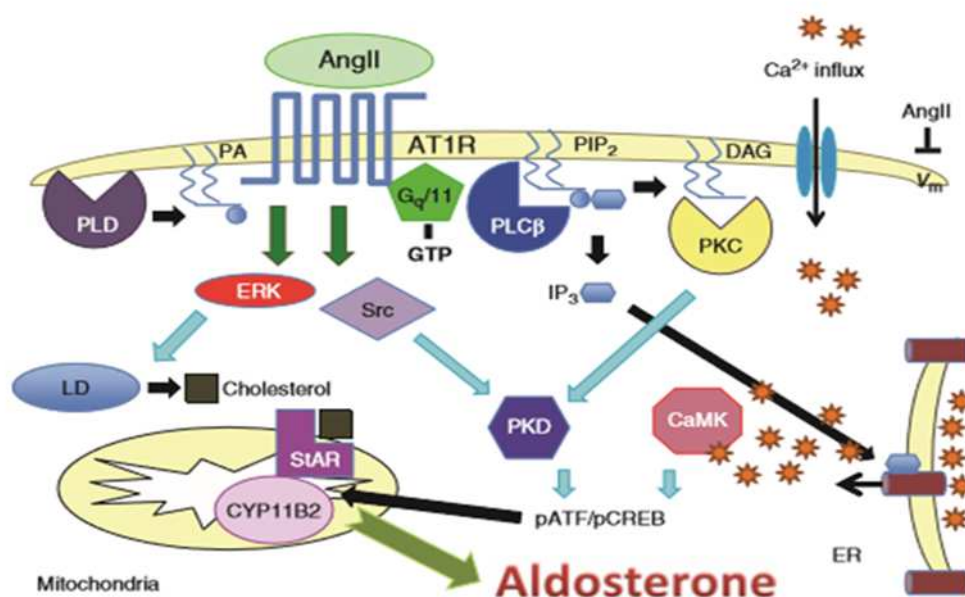


Figure 7. Voies de transduction iactivées par l'ANGII. La liason de l'ANGII au récepteur AT1R active une protéine $G_{q/11}$ couplée positivement à la voie phospholipase C/calcium/calmoduline kinase. L'activation du récepteur AT1R stimule également la voie ERK. Les protéines ERK1/2 activent l'hydrolyse des esters de cholestérol stockés dans les gouttelettes lipidiques (LD) augmentant le cholestérol libre nécessaire à la stéroïdogénèse (D'après Bollag et al, 2014).

L'activité de l'aldostérone synthase est l'étape limitante à la phase chronique (40). Ainsi la transcription du gène *CYP11B2* est sous le contrôle des facteurs de transcription NURR1 (*Nuclear receptor related-1 protein*) et CREB (*CRE-Binding Protein*), activés par la voie calcique qui augmente la synthèse de l'enzyme. De plus, l'ANGII en stimulant la prolifération des cellules de la zone glomérulée entraîne une hyperplasie de la zone glomérulée et la synthèse d'aldostérone (40). Au total, ces effets à long terme augmentent la capacité de production d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée. D'autres enzymes de la stéroïdogénèse surrénalienne impliquées dans la synthèse d'aldostérone, telle que l'enzyme 3β HSD2 voient leur expression augmenter sous l'effet de l'ANGII (52).

➤ Effets du K^+

La synthèse d'aldostérone est très dépendante de la concentration plasmatique de K^+ (53). En effet, une augmentation du K^+ plasmatique de moins d'une mmol/L suffit à doubler la sécrétion

d'aldostérone (54). Une augmentation des concentrations extracellulaires de K^+ , provoque une dépolarisation cellulaire qui active des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants générant un influx calcique dans la cellule de la zone glomérulée (55). L'élévation du Ca^{2+} cytosolique qui en résulte, active la calmoduline et consécutivement la synthèse d'aldostérone comme décrit précédemment. Le K^+ , via son effet sur l'aldostérone, participe donc à la régulation de sa propre concentration plasmatique. Enfin, la repolarisation des cellules productrices d'aldostérone est assurée par l'activation de canaux potassiques membranaires, tels que les canaux TASK (*twik-like acid-sensitive potassium*) et KCNJ5 (*potassium voltage-gated channel subfamily J member 5*), dont l'ouverture génère un efflux de K^+ (56), (57).

➤ Effets de l'ACTH

L'ACTH exerce des effets stimulants sur la synthèse d'aldostérone de manière aigüe (40) via son récepteur, le MC2R. Ce récepteur membranaire couplé à une protéine Gs stimule l'adénylate cyclase, qui produit de l'AMPc, capable d'activer la protéine kinase A (PKA). La PKA phosphoryle la protéine StAR ce qui stimule son activité (58), (59), (60). En revanche, l'administration chronique d'ACTH induit une diminution de la synthèse d'aldostérone, liée en partie à une diminution de l'expression de l'aldostérone synthase et du récepteur AT1 ainsi qu'une accélération de la différenciation des cellules de la zone glomérulée en cellules de la zone fasciculée (40).

1.3.3. La régulation paracrine et autocrine de la sécrétion d'aldostérone

A côté de la régulation systémique, des travaux in vitro ont montré que la synthèse de minéralocorticoïdes est également influencée par des signaux bioactifs produits dans la glande surrénale elle-même, faisant ainsi émerger le concept de régulation paracrine de la sécrétion d'aldostérone (40). Plusieurs observations cliniques montrent en outre, que les sécrétions d'aldostérone sont en parties indépendantes des facteurs circulants cités précédemment. On retrouve ainsi chez les patients ayant subi une néphrectomie bilatérale, des concentrations d'aldostérone normales malgré la chute des concentrations circulantes de rénine et d'ANGII consécutive à l'absence de tissu rénal (41). De plus, l'administration d'inhibiteurs du SRA, inhibiteurs de l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine) et antagonistes du récepteur AT1, n'entraîne qu'une réduction modérée et transitoire des concentrations circulantes d'aldostérone (42). Les régulations paracrine et autocrine sont des déterminants majeurs de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone chez différentes espèces. Parallèlement au SRA « systémique ou circulant », responsable des principales réponses physiologiques, il existe un contrôle local de la

sécrétion d'aldostérone impliquant d'une part le SRA « intrinsèque » tissulaire surrénalien, indépendant de l'ECA circulante, et d'autre part de multiples facteurs régulateurs libérés par les différents types cellulaires présents dans la glande surrénale, tels que les cellules chromaffines, les cellules immunocompétentes (lymphocytes, mastocytes), les cellules vasculaires, les cellules et fibres nerveuses.

➤ **Le système rénine-angiotensine tissulaire surrénalien**

Le SRA est présent dans de nombreux tissus où il intervient dans divers processus (15), (61). Dans le cortex surrénalien, toutes les composantes du SRA sont exprimées, à savoir la rénine, l'ECA et l'angiotensinogène, conduisant à la formation locale d'ANGII (62), (63) capable de stimuler la synthèse d'aldostérone. Les effets du SRA sur la zone glomérulée sont également de type trophique et s'exercent au long cours. L'activité du SRA intrasurrénalien apparaît, comme dans d'autres organes, influencée par des facteurs vasculaires endothéliaux tels que le monoxyde d'azote ou l'endothéline (64).

➤ **Les cellules chromaffines**

La médullosurrénale, partie centrale de la glande surrénale, représente le cinquième du volume total de la glande. Elle est embryologiquement dérivée de l'ectoblaste, plus précisément des crêtes neurales (tissu neuro-ectodermique). Cette structure histologique est constituée de cellules chromaffines responsables de la sécrétion des catécholamines (65). Les cellules chromaffines sont innervées par des terminaisons nerveuses des neurones sympathiques préganglionnaires provenant des nerfs splanchniques (66). En réponse à la stimulation de cette commande splanchnique, les cellules chromaffines synthétisent des catécholamines, qui une fois libérées dans la circulation sanguine vont agir via leurs récepteurs adrénergiques (67). La corticosurrénale régule également les sécrétions de la médullosurrénale. Ainsi, de fortes concentrations de cortisol surrénalien exercent un stimulus positif sur la synthèse et la sécrétion des catécholamines (68).

Les catécholamines produites par la médullosurrénale sont majoritairement la noradrénaline et l'adrénaline, et dans des concentrations moindres, de la dopamine. Ces molécules participent à la régulation de la synthèse des minéralocorticoïdes (69). L'impact des cellules chromaffines sur la corticostéroïdogénèse a longtemps été un sujet de débat. Si ces cellules sont en effet capables de libérer plusieurs molécules susceptibles d'influencer la production de stéroïdes, il semble en revanche a priori difficile que les sécrétions médullosurrénaliennes puissent atteindre les cellules corticosurrénaliennes en raison de la direction centripète du flux sanguin surrénalien. En fait, il a

été montré, chez plusieurs espèces dont l'espèce humaine, que les cellules chromaffines sont présentes non seulement dans la medulla mais également dans les trois zones du cortex surrénalien (70). Ces cellules chromaffines intra-corticales sont donc localisées au voisinage immédiat des cellules stéroïdogènes, ce qui permet des interactions paracrines bidirectionnelles entre les deux types de cellules. Des travaux ont démontré que les cellules chromaffines exercent globalement une action stimulante sur la corticostéroïdogénèse (2), (64), (71), (72), (73). Cet effet stimulant s'exerce non seulement par l'intermédiaire de l'adrénaline et de la noradrénaline, mais aussi via les neuropeptides, tels que le VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*), le NPY (Neuropeptide Y), les tachykinines (TKs), et la sérotonine (5-HT). En revanche, il n'est pas retrouvé d'effet stimulant direct des catécholamines sur la synthèse d'aldostérone chez l'homme.

A l'inverse, des facteurs inhibiteurs de la synthèse d'aldostérone, tels que le peptide natriurétique auriculaire (ANP), la dopamine et l'adrénomédulline sont également libérés par ces cellules (74). Ainsi, l'ANP exerce un effet inhibiteur direct, prédominant sur les minéralocorticoïdes, via le récepteur membranaire de type 1A exprimé par les cellules de la zone glomérulée, ainsi qu'une action indirecte via l'inhibition de la synthèse locale de rénine et d'angiotensine, en particulier au cours de la stimulation du SRA par la déplétion sodée (75), (76). Une coordination se met en place entre les cellules chromaffines et les cellules du cortex pour répondre de manière appropriée au stress grâce aux interactions intrasurréaliennes (77).

➤ Les adipocytes

Des adipocytes sont non seulement présents dans la région périssurrénalienne, mais peuvent également être observés dans le cortex surrénalien au contact direct des cellules de la zone glomérulée (82) ce qui permet des communications avec les cellules stéroïdogènes.

Les adipocytes stimulent la synthèse d'aldostérone par les cellules corticosurréaliennes, notamment par l'intermédiaire de différentes adipokines, telles que la leptine ou l'adiponectine (78). *In vitro*, le surnageant de culture adipocytaire stimule la synthèse et la sécrétion d'aldostérone par les cellules de la lignée corticosurrénalienne humaine H295R (79), (80), (81), (82). De plus, les adipocytes synthétisent des acteurs du SRA, en particulier de l'angiotensinogène, ce qui pourrait augmenter indirectement la production de minéralocorticoïdes (83).

➤ Les cellules du système immunitaire

Le système immunitaire module l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en stimulant la production de CRH et d'ACTH (84). Les cellules immunitaires influencent également de

façon directe la production de corticostéroïdes. Parmi ces dernières, les macrophages qui infiltrent toutes les zones du cortex surrénalien, sécrètent différentes cytokines dont l'Interleukine 1 (IL1), l'Interleukine 6 (IL6) et le TNF α (84), molécules impliquées dans la réponse inflammatoire. Des lymphocytes CD4 positifs sont également mis en évidence dans le cortex surrénalien (85) où leur nombre augmente avec l'âge (86). Les cellules corticosurréaliennes synthétisent également les cytokines citées précédemment (87), (88), (89). L'IL6 est une cytokine proinflammatoire qui maintient une régulation positive de la stéroïdogénèse surrénalienne pendant le stress chronique et ce, de manière indépendante de l'axe corticotrope. En effet, l'IL6 stimule directement la synthèse de cortisol et d'aldostérone (90) par les cellules corticosurréaliennes humaines. En revanche, il a été montré que le TNF α et l'IL1 sont des inhibiteurs de la stéroïdogénèse surrénalienne (91) chez le rat.

Parmi les cellules du système immunitaire, on distingue les mastocytes. Ce sont des cellules myéloïdes, générées dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs (92) (93) (94). Les progéniteurs mastocytaires passent dans la circulation puis infiltrent les différents organes au sein desquels ils se différencient sous l'influence de médiateurs chimioattractants tissulaires libérés par les tissus hôtes. Les mastocytes contiennent de nombreux granules de sécrétion possédant de multiples médiateurs, de l'ordre de cinq cents à mille par cellule (95). Ces médiateurs sont très variés : des amines biogènes (sérotonine, histamine), enzymes lysosomales (cathepsines), protéases spécifiques (tryptase, carboxypeptidase A3), cytokines (95), facteurs de croissance (VEGF, TGF β) et métalloprotéases de type Matrix Métalloprotéinases (MMP) capables de remodeler le tissu environnant (96). Les mastocytes possèdent de nombreux récepteurs dont l'activation engendre une réponse immunitaire de première ligne au niveau des organes faisant l'interface avec l'environnement, tels que le tissu cutané, l'appareil pulmonaire et le système digestif. Une dégranulation mastocytaire se produit en réponse à l'activation d'une large gamme de récepteurs, tels que les récepteurs membranaires (Fc ϵ RI) aux fragments constants (Fc) des immunoglobulines E (IgE) (92). La dégranulation mastocytaire est ainsi à l'origine des réactions allergiques et anaphylactiques. De plus, les mastocytes contribuent à l'inhibition de la coagulation sanguine et à l'augmentation de la perméabilité capillaire qui favorise la diapédèse des cellules immunitaires (97). De même, l'histamine synthétisée par les mastocytes, active la dégranulation mastocytaire via les récepteurs H1 et H2 tandis qu'elle inhibe la dégranulation mastocytaire via les récepteurs H4 (98). Les mastocytes peuvent également dégranuler sous l'action d'un neuropeptide, la SP (99). Ce peptide qui est libéré, entre autres par des fibres nerveuses

amyélinisées présentes dans de nombreux tissus, se fixe sur son récepteur NK1 (93), (100), situé sur la membrane cytoplasmique mastocytaire (101). Au total, les mastocytes sont à l'interface de plusieurs systèmes, nerveux, endocrine et immun ce qui en fait des acteurs neuroendocrines majeurs (102), en particulier dans le cortex surrénalien.

Les mastocytes expriment différents récepteurs dont l'activation permet de compléter leur maturation. Parmi ceux-ci, le récepteur c-KIT activé par le Stem Cell Factor (SCF), appelé encore cluster de différenciation CD117, est indispensable à la maturation mastocytaire (103). Différentes cellules synthétisent le SCF, notamment les fibroblastes (104), les cellules endothéliales (105) et les cellules du cortex surrénalien (106). La maturation des mastocytes est dépendante de l'organe dans lequel ils sont présents. En effet, il existe une hétérogénéité phénotypique des mastocytes dans les différents organes : les mastocytes expriment la tryptase et/ou la chymase en fonction de leur localisation tissulaire (107). Cette hétérogénéité cellulaire se caractérise notamment par une variabilité du profil sécrétoire. Le phénotype des mastocytes varie avec leur microenvironnement local, en particulier les vaisseaux sanguins et les terminaisons nerveuses dont ils sont classiquement proches dans les tissus (107). Les mastocytes sont des acteurs du SRA intratissulaire par le biais de la synthèse de la chymase qui clive l'angiotensine I en ANGII (108) et de la rénine qui clive l'angiotensinogène en angiotensine I (109).

Au niveau surrénalien, les mastocytes exercent un effet stimulant sur la sécrétion d'aldostérone (110). Ils sont localisés sous la capsule surrénalienne et dans la paroi des artéioles du cortex surrénalien (94). Les mastocytes surrénaliens sécrètent notamment de la sérotonine, qui stimule la synthèse d'aldostérone par les cellules corticosurrénales humaines (111), via le récepteur 5-HT₄, couplé à la voie de l'adénylcyclase/PKA (112). Chez des patients présentant un adénome de Conn, les mastocytes sont localisés à proximité des terminaisons nerveuses, dans le cortex surrénalien péritumoral (110). Dans la surrénale de rat, la sérotonine et l'histamine issues de la dégranulation mastocytaire favorisent de manière dose-dépendante l'augmentation du flux sanguin surrénalien ainsi que la synthèse et la sécrétion des hormones corticosurrénales (94). Tous les médiateurs mastocytaires ne stimulent pas la synthèse de stéroïdes surrénaliens. En effet, l'héparine, présente dans les granulations mastocytaires, exerce des effets inhibiteurs sur la synthèse d'aldostérone (77). Enfin, notre équipe a montré que les milieux conditionnés provenant de lignées mastocytaires exercent un effet stimulant sur la sécrétion d'aldostérone dans les cellules corticosurrénales de la lignée H295R et l'expression du gène *CYP11B2* codant l'aldostérone synthase (110).

➤ Les cellules vasculaires

Les glandes surrénales sont richement vascularisées et reçoivent une part importante du débit cardiaque proportionnellement à leur poids et leur taille (107). Les artères surrénaliennes se divisent en artérioles capsulaires d'où émergent deux types de vaisseaux nourriciers : i) les artères médullaires qui franchissent le cortex sans donner de collatérales et qui vascularisent le centre de la glande, et ii) les artères corticales qui vascularisent le cortex surrénalien de manière centripète en donnant naissance à un réseau de capillaires sinusoïdes. La richesse de ce réseau est telle que chaque cellule stéroïdogène corticosurrénaliennne est en contact direct avec au moins un capillaire sanguin (108). Ces capillaires se jettent dans les veines surrénales qui rejoignent ensuite la veine centrale. Cette dernière rejoint, à gauche, la veine rénale et à droite la veine cave inférieure (109), (110). Cette organisation histologique permet également l'établissement de communications entre les cellules endothéliales surrénaliennes et les cellules corticosurrénaliennes, en particulier avec les cellules de la zone glomérulée, grâce à la libération de différents facteurs endothéliaux, telles que l'adrénomédulline, les prostacyclines ou le NO (111). La libération de ces molécules semble, au moins en partie, sous la dépendance de l'ACTH et de l'ANGII (112). Le flux sanguin surrénalien est donc étroitement couplé à la libération d'hormones stéroïdes. Ce couplage fonctionnel fait également intervenir les endothélines, peptides synthétisés à la fois par les cellules endothéliales et les cellules de la zone glomérulée. Les endothélines ont non seulement une puissante action vasoconstrictrice, près de dix fois celle de l'ANGII (113), mais elles stimulent également de manière directe, la sécrétion d'aldostérone par les cellules de la zone glomérulée humaine en activant les récepteurs ETA et ETB, exprimés par les cellules stéroïdogènes (114), (115), (116).

Les acides époxyeicosatriénoïques (EETs), dérivés de l'acide arachidonique, sont d'autres médiateurs classiquement produits par l'endothélium vasculaire. Les EETs sont de puissants vasodilatateurs, libérés en réponse à l'augmentation du débit sanguin (117). Dans le cortex surrénalien, ces molécules sont sécrétées par les cellules de la zone glomérulée sous l'effet de l'ANGII (117) et de l'ACTH (118). Ces molécules favorisent l'apport des substrats nécessaires à la stéroïdogénèse surrénaliennne dont la synthèse d'aldostérone (71). Les cellules de la glomérulée paraissent donc capables de moduler leur propre apport sanguin et, consécutivement, leur activité sécrétoire.

➤ Les cellules et les fibres nerveuses

Le système nerveux autonome (SNA) régule les activités automatiques qui sous-tendent les fonctions essentielles de l'organisme. Le SNA reçoit des afférences sensitives, de différents organes, du muscle cardiaque, des muscles lisses et il émet en retour des efférences motrices vers ces mêmes organes (**Figure 8**). L'intégration de ces différents signaux est réalisée au niveau des noyaux du tronc cérébral, en particulier du noyau du tractus solitaire. Les principaux neurotransmetteurs du SNA sont l'acétylcholine, la noradrénaline et l'adrénaline. Le SNA est constitué de deux composantes principales, le système nerveux sympathique qui favorise la dépense énergétique et la réponse au stress de type « combattre ou fuir » et le système nerveux parasympathique, qui favorise le stockage énergétique et la récupération.

Sur le plan anatomique, l'organisation des efférences du SNA comporte deux neurones (**Figure 8**), l'un préganglionnaire et l'autre postganglionnaire. Le neurone préganglionnaire, dont le corps cellulaire est localisé dans la moelle spinale, fait synapse au niveau d'un ganglion nerveux avec un neurone postganglionnaire. Les neurones préganglionnaires sont situés, pour la composante sympathique, dans la moelle dorsale et lombaire tandis qu'ils sont localisés dans la moelle cervicale et sacrée pour la composante parasympathique. Le ganglion peut être soit un ganglion prévertébral pour le système nerveux sympathique, soit un ganglion préviscéral pour le système nerveux parasympathique.

Sur le plan fonctionnel, l'arrivée d'un potentiel d'action au niveau du ganglion nerveux déclenche la libération d'acétylcholine dans la fente synaptique par les neurones préganglionnaires. L'acétylcholine se fixe sur les récepteurs postsynaptiques à un récepteur nicotinique. Par la suite, un nouveau potentiel d'action se propage le long du trajet des fibres postganglionnaires pour déclencher la libération de noradrénaline pour les fibres sympathiques et d'acétylcholine pour les fibres parasympathiques au voisinage des récepteurs muscariniques du viscère innervé. Il est à noter que dans la médullosurrénale, le neurone préganglionnaire fait synapse directement avec les cellules chromaffines qui sécrètent principalement l'adrénaline.

Une troisième composante du SNA, le système NANC (Non-adrénergique Non cholinergique), a été décrite en particulier dans les poumons, le système digestif et le système cardiovasculaire (119), (120), (121), (122). Les fibres NANC sont distinctes des composantes sympathique et parasympathique du SNA. Elles peuvent cheminer dans les mêmes trajets nerveux que ces dernières (123). Le système NANC a été découvert au cours d'enregistrements des réponses à la

stimulation électrique dans différents organes et tissus en présence de bloqueurs pharmacologiques des systèmes cholinergique et adrénergique.

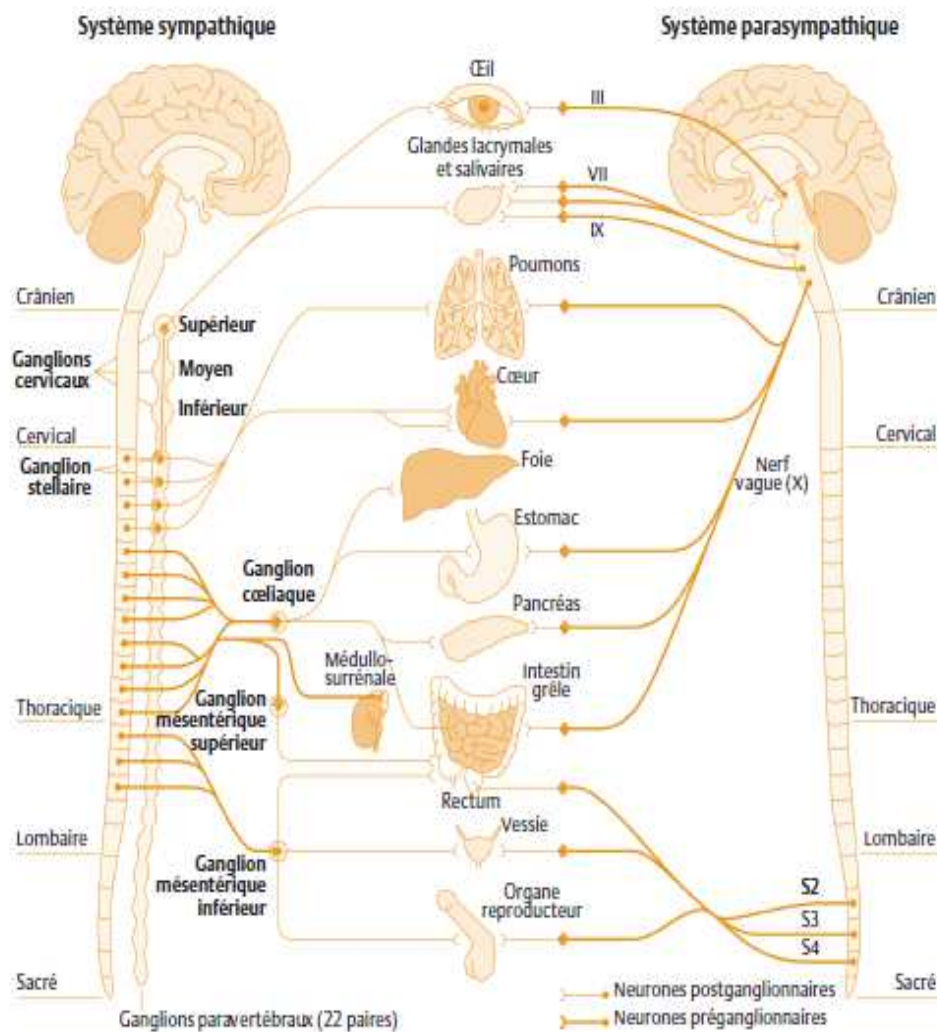


Figure 8. Organisation anatomique du système nerveux autonome (d'après Beaulieu et al, 2010). Le SNA est composé de neurones préganglionnaires (—), dont les corps cellulaires sont présents dans la moelle spinale et font synapse au niveau d'un ganglion nerveux avec des neurones postganglionnaires (—). Les neurones préganglionnaires sont situés, pour la composante sympathique, dans les moelles dorsale et lombaire, tandis que ces neurones sont localisés dans les moelles cervicale et sacrée pour la composante parasympathique. Ces neurones font ensuite synapse avec des neurones postganglionnaires. Les corps cellulaires de ces derniers sont localisés dans les ganglions nerveux, et leurs axones innervent les tissus cibles. Les ganglions sont soit prévertébraux pour le système nerveux sympathique, soit préviscéraux pour le système nerveux parasympathique.

Le NANC est subdivisé en deux types fonctionnels qui agissent sur la cellule musculaire lisse bronchique : un système NANC excitateur (NANCe) et un NANC inhibiteur (NANCi). Au niveau pulmonaire, le NANCe entraîne une bronchoconstriction tandis que le NANCi favorise une bronchodilatation. Ainsi, un déséquilibre entre les niveaux d'activité des systèmes NANCe et NANCi semble être impliqué dans les processus physiopathologiques de la maladie asthmatique (124).

La nature des neurotransmetteurs mis en jeu dans la commande NANC reste discutée. De plus, les mécanismes modulant le système NANC ne sont pas précisément connus (125). Cependant, différentes molécules semblent participer à la neurotransmission et aux effets du système NANC. Ce sont soit des neuropeptides, tels que la substance P, le CGRP, le VIP et le NPY, soit des neurotransmetteurs non peptidiques, tels que la sérotonine (5-HT), le GABA, ainsi que l'ATP (adénosine 5'-triphosphate) et le NO (126) (**Tableau 1**).

Le système NANCe met principalement en jeu de la SP et de la neurokinine A, tandis que le système NANCi implique le VIP, le NO (127) et l'ATP (128). Les médiateurs du système NANC jouent également le rôle de régulateur de la libération des neurotransmetteurs des systèmes nerveux sympathique et parasympathique (cotransmetteurs de l'acétylcholine et de la noradrénaline) (129). A titre d'exemple, le NPY et l'ATP sont des cotransmetteurs de la noradrénaline dont ils potentialisent les effets au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques (130). Il est démontré également que le VIP est un cotransmetteur de l'acétylcholine dans les terminaisons des fibres cholinergiques (131). Enfin, les circonstances physiologiques qui amènent à l'activation du système NANC restent imprécises.

Type	Substance	Localisation dans le système nerveux	Fonction(s)	Composante du NANC
Amine	5-HT	Neurones entériques	Réflexes péristaltiques	NANCi
	NO	Nerfs gastriques et pelviens / cotransmetteur des jonctions neuromusculaires	Vidange gastrique	NANCi
	ATP	Neurones sympathiques postganglionnaires des vaisseaux sanguins	Effet vasoconstricteur rapide des vaisseaux sanguins	NANCe
Peptide	VIP	Nerfs parasympathiques	Glandes salivaires	NANCi
Peptide	Substance P	Ganglion sympathique / Neurones entériques	Dépolarisation lente / Cotransmetteur de l'acétylcholine / colocalisée avec le CGRP dans les neurones sensitifs cardiovasculaires/ Effet vasodilatateur	NANCe
Peptide	NPY	Neurones sympathiques postganglionnaires	Effect vasoconstricteur de longue durée	NANCe

Tableau 1. Médiateurs du système non adrénergique non cholinergique (NANC) excitateur (NANCe) et inhibiteur (NANCi) (d'après Katzung et al, 2012 et Offermans et Rosenthal, 2008). Le NANC assure un contrôle autonome par des neurotransmetteurs non-adrénergiques non-cholinergiques. Parmi ces médiateurs, nous pouvons noter la présence de molécules dérivées d'acides aminés (5-HT) ou d'autres petites molécules (NO, ATP), et des neuropeptides (VIP, SP, NPY).

➤ L'innervation du cortex surrénalien

La médullosurrénale et la corticosurrénale sont innervées par des fibres noradrénergiques issues de neurones postganglionnaires localisés dans le ganglion coeliaque (124) et appartenant au contingent splanchnique (128). L'innervation du cortex surrénalien a été bien décrite chez l'animal, en particulier chez le rat (132), le cochon (133), le mouton (134) et le hamster (135). En revanche, chez l'homme la description de l'innervation est encore incomplète (132) et plus complexe dans la mesure où elle peut être présentée de différentes manières selon les critères anatomiques ou fonctionnels utilisés. Ainsi, ont été rapportés dans la littérature, d'une part une innervation du cortex avec une organisation en composantes extrinsèque et intrinsèque, et d'autre part une innervation par le SNA, avec ses composantes sympathique, parasympathique et NANC (**Figure 9**). La composante extrinsèque est composée de neurones dont le corps cellulaire est extra-surrénalien, et la composante intrinsèque désignant des neurones dont le corps cellulaire est localisé dans la glande surrénale (136). Dans la mesure où notre travail s'intéresse au rôle du tissu nerveux dans le contrôle de la stéroïdogénèse, nous avons choisi de décrire l'innervation surrénalienne sous l'angle fonctionnel en abordant successivement, ses composantes parasympathique, sympathique et NANC.

Dans la glande surrénale humaine, les innervations parasympathique et sympathique ont été mises en évidence par des approches immunohistochimiques (137), (138), (139), (140), (141). Ainsi, les contingents parasympathiques et sympathiques cheminent dans la surrénale et empruntent des trajets nerveux communs pour innover les trois couches du cortex surrénalien (142). Des fibres préganglionnaires innervent directement le cortex surrénalien ou font un relais avec des fibres postganglionnaires (143). A partir du relais ganglionnaire, des axones innervent les cellules corticosurrénaliennes situées dans les trois couches du cortex surrénalien (144), (143). Les fibres sympathiques postganglionnaires de type noradrénergique innervent d'une part, les vaisseaux surrénaliens et d'autre part, les cellules corticosurrénaliennes de la zone glomérulée (145), (146). De manière similaire, chez le rat et chez l'homme, des fibres cholinergiques postganglionnaires, appartenant donc au système nerveux parasympathique, sont également décrites dans le cortex surrénalien (140), (147), (148). La distribution des fibres nerveuses suggère que le contrôle neurogène du cortex surrénalien s'effectuerait par la libération de neurotransmetteurs présents dans les fibres nerveuses corticales (149), (150).

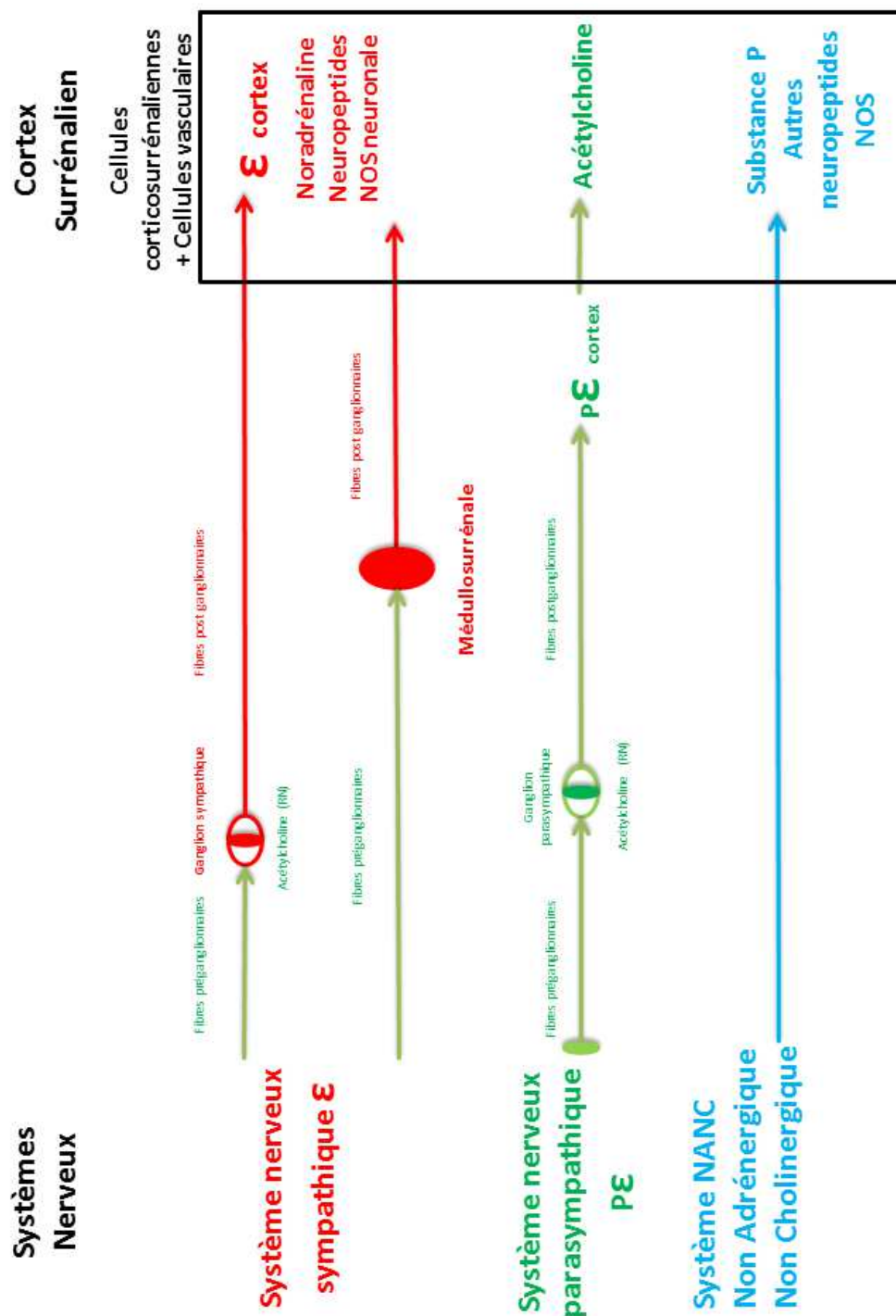


Figure 9. Innervation du cortex surrénalien par les différentes afférences nerveuses. Le cortex surrénalien reçoit des afférences de fibres postganglionnaires sympathiques, de fibres postganglionnaires provenant de la médullosurrénale et de fibres postganglionnaires provenant du système parasympathique ainsi que des fibres du système nerveux NANC

Sur le plan fonctionnel, le rôle physiologique du contrôle de la synthèse des stéroïdes surrénaliens par le système nerveux est encore débattu. Ce système serait impliqué dans la régulation des variations des sécrétions corticosurrénaliennes indépendantes de l'ACTH et du SRA (151). L'équipe d'Engeland a montré que les fibres nerveuses afférentes splanchniques participent

au contrôle des sécrétions corticosurréaliennes de deux manières. D'une part, elles peuvent réguler les sécrétions de façon directe via l'interaction des terminaisons nerveuses avec les cellules du cortex surréalien et d'autre part de manière indirecte via les vaisseaux surréaliens par le biais d'une modulation du débit sanguin local (151). Ainsi, la commande nerveuse splanchnique semble être inhibitrice des sécrétions corticosurréaliennes en conditions basales mais stimulante en conditions de stress (149).

L'innervation du cortex intègre également une voie d'origine hypothalamique. Cette voie emprunte les noyaux suprachiasmatiques, chemine jusqu'à la colonne intermedio-latérale de la moelle spinale, puis atteint la glande surrénale via les trajets nerveux précédemment décrits (143), (152). Elle permettrait une régulation directe de la sécrétion de cortisol par les signaux lumineux intégrés par les noyaux supraoptiques constituant un mécanisme de régulation de la sécrétion de cortisol indépendant de l'ACTH, susceptible de participer au rythme nycthéméral de la sécrétion de glucocorticoïdes (152).

Enfin, pour ce qui concerne le contingent non-adrénergique, non-cholinergique (NANC) du SNA, les études sont avant tout descriptives, en particulier pour l'innervation par la SP. Ainsi des fibres à SP sont mises en évidence à la fois dans la médullosurrénale (153) et dans le cortex surréalien (154). L'innervation du cortex surréalien humain par des fibres à SP a en outre été étudiée par l'équipe de Heym de façon exhaustive (155), (156). Ces travaux ont conduit à l'identification de 6 types de fibres selon la nature du neurotransmetteur colocalisé avec la SP : le *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) pour le type I, la cholécystokinine pour le type II, la NOS pour le type III, la dynorphine pour le type IV, la somatostatine pour le type V et le VIP pour le type VI. Toutes les fibres doublement marquées sont présentes à la fois dans le cortex et la medulla à l'exception des fibres nerveuses positives pour la SP et la NOS qui sont observées exclusivement dans le cortex surréalien. De plus, en microscopie électronique, des varicosités à SP sont visualisées au contact des cellules de la zone glomérulée (155) ce qui suggère un rôle direct de la substance P dans la régulation de la sécrétion d'aldostérone.

2. Les tachykinines

La dénomination « tachykinines » (TKs) a pour origine les termes, issus du grec, « tachus » signifiant « rapide » et kinin pour « mise en mouvement ». Les TKs appartiennent à la superfamille des neuropeptides (157) qui correspondent à des peptides synthétisés et libérés par les neurones

via la voie de sécrétion régulée pour agir sur des cibles neuronales (158). Les tachykinines sont une superfamille de peptides présents à la fois chez les invertébrés et chez les vertébrés (159), (160). Chez ces derniers, ils ont été plus particulièrement caractérisés chez les mammifères (161), (162).

Les TKs sont des peptides possédant une séquence consensus comportant les acides aminés Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ à l'extrémité C-terminale (Figure 9). L'acide aminé en position X étant soit un acide aminé aromatique (Phénylalanine, Tyrosine) soit un acide aminé aliphatique (Valine, Isoleucine). Cette extrémité C-terminale se lie au récepteur des TKs et l'active.

La diversité des tachykinines provient de plusieurs mécanismes correspondant à la duplication génique d'un gène ancestral (163) ayant généré 3 gènes chez l'homme (*TAC1*, *TAC3* et *TAC4*), l'épissage alternatif des préARNs et la maturation post-traductionnelle des peptides (**Figure 10**) (164), (165), (166). Les ARNm sont traduits en précurseurs qui sont maturés par des enzymes de clivage protéolytique en différents peptides biologiquement actifs, dont la SP (pour *TAC1*), la neurokinine B (pour *TAC3*) et l'hémokinine (pour *TAC4*). Un système de régulation de la production des enzymes de clivage affine encore plus le système. Ainsi la maturation de la pré-tachykinine requiert l'action des prohormone convertases de manière analogue à celle de la POMC (Proopiomélanocortine) (167).

2.1. La substance P

La SP a été isolée en 1931 dans le cerveau et l'intestin de cheval par Ulf Von Euler et John Gaddum. C'est le premier peptide synthétisé sous forme de poudre, d'où la lettre « P ». Les premiers travaux expérimentaux sur la substance P ont révélé son action stimulante sur la contraction des fibres musculaires lisses et le péristaltisme intestinal chez le lapin. En 1954, John Gaddum a mis en évidence de fortes concentrations tissulaires de SP dans les centres cérébraux du vomissement (168). En 1971, la séquence primaire du peptide de onze acides aminés a été déterminée par le groupe de Susan Leeman (169). Vingt ans plus tard, en 1991, le récepteur de la SP a été identifié, cloné et baptisé NK1 (170). Parallèlement, le développement des premiers antagonistes non peptidiques du récepteur NK1 a été initié (171).

Les données de biologie moléculaire et de biochimie ont permis de comprendre le mécanisme de synthèse des différents peptides. Ainsi, le gène *TAC1* génère un pré-ARN messager qui mature en quatre variants d'épissage, α TAC1, β TAC1, γ TAC1 et δ TAC1 (**Figure 10**). Ces quatre variants sont tous traduits en pré-proprotéines comprenant la SP. D'autres peptides sont également synthétisés à partir du gène *TAC1* dont la neurokinine A (codée par les variants β TAC1, γ TAC1).

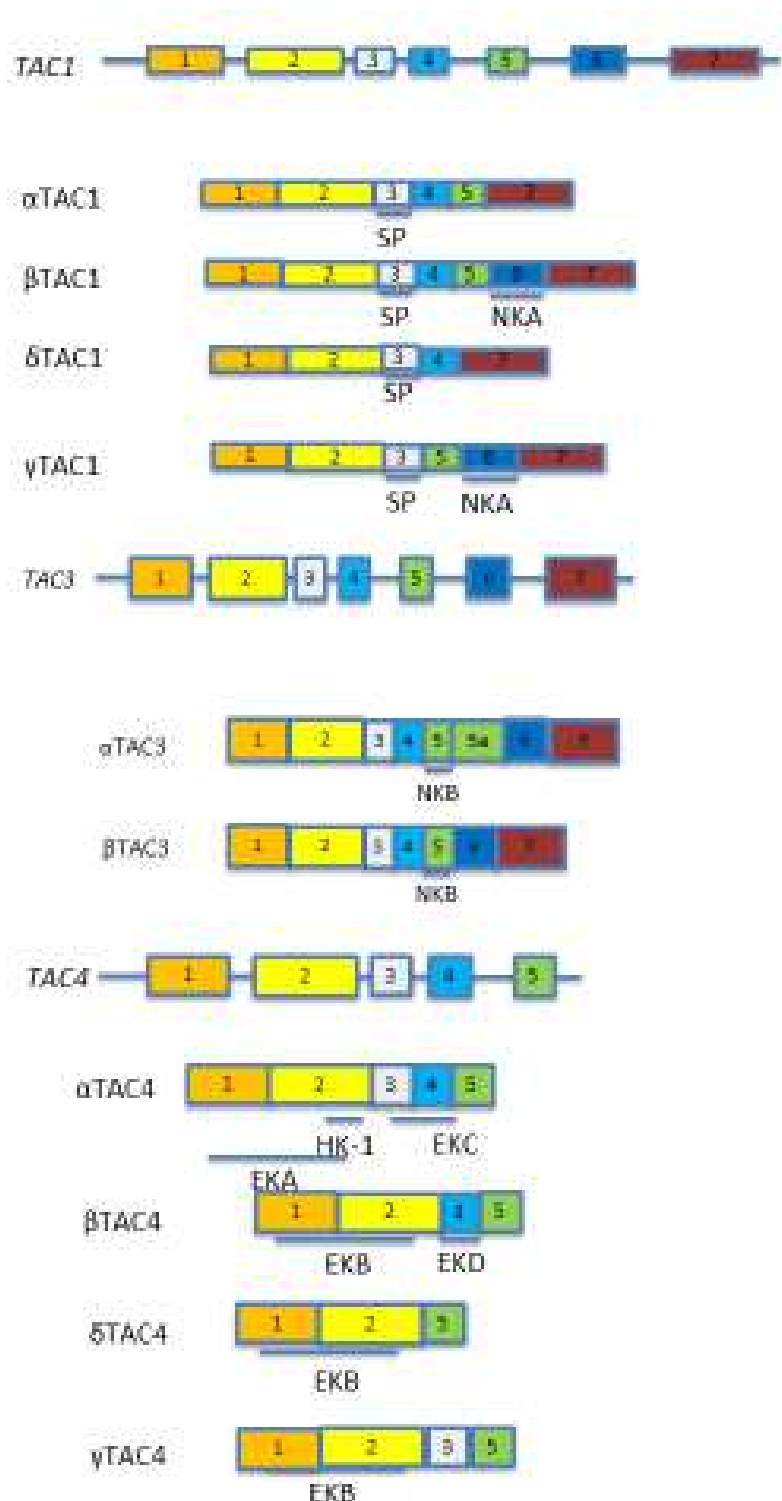


Figure 10. Structure des gènes et ARN messagers codant les tachykinines chez l'humain (d'après Steinhoff et al, 2014). Les peptides sont représentés par les barres bleues figurant sous les ARNm. Le gène TAC1 génère 4 variants d'épissages, α TAC1, β TAC1, γ TAC1, δ TAC. Ces 4 variants d'épissage sont traduits en précurseurs qui incluent la SP, le peptide le mieux caractérisé. Le gène TAC3 code pour 2 variants α TAC3, β TAC qui sont transcrits en un peptide, la NKB : neurokinine B. Enfin le gène TAC4 est transcrit en α TAC4, β TAC4, γ TAC4, δ TAC4 qui génèrent, l'HK-1 (hémokinine), l'EKA (endokinine A), l'EKB (endokinine B), l'EKC (endokinine C) et l'EKD (endokinine D) (d'après Steinhoff et al, 2014).

La SP est retrouvée dans les différentes parties du système nerveux, central, périphérique et autonome (**Figure 11**) (172) où elle intervient dans divers processus physiologiques tels que la nociception (172), les nausées et vomissements (168). Comme énoncé précédemment, la SP est un neurotransmetteur du SNA, en particulier du système NANC. La SP est distribuée dans plusieurs structures du SNC, tels que le striatum, l'amygdale, l'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire, et dans le système nerveux périphérique au sein des fibres nerveuses sensibles (196), (173). Au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire, de fortes concentrations de SP sont mises en évidence dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (174). Chez la brebis, la SP stimule directement la sécrétion de LH (175). Enfin un effet stimulant de la SP sur la sécrétion d'ACTH est mis en évidence chez le volontaire sain (176).

On retrouve également de la SP dans des structures nerveuses du cœur (177). En effet, des fibres nerveuses à SP sont présentes à proximité d'artérioles et des vaisseaux coronaires (178). La SP exerce des effets vasodilatateurs puissants via la synthèse de NO chez l'homme (179), (180) et induit une vasodilatation endothélium-dépendante des artères de l'avant-bras (180), médiée par le récepteur NK1 (179). Dans les artères coronaires, l'injection de SP induit une vasodilatation coronaire sans effet sur la pression artérielle (181), (182).

Dans l'appareil digestif, la SP est impliquée dans la neurotransmission au sein du système nerveux entérique (SNE) à côté de neurotransmetteurs plus classiques tels que l'acétylcholine, la sérotonine et la dopamine. La SP module la contraction des cellules musculaires de la couche musculieuse digestive (motilité intestinale) et la sécrétion de mucus (183) ainsi que dans l'inflammation et la douleur (184), (185).

Dans l'appareil pulmonaire, la SP, aux côtés de la NKA, est l'un des principaux médiateurs du système NANCe. La SP est libérée par des terminaisons nerveuses en réponse à des stimuli mécaniques, thermiques, chimiques, et inflammatoires (186). Elle induit une bronchoconstriction chez l'homme via l'activation des récepteurs NK1 (187).

Dans la glande surrénale, la SP est présente dans le cortex surrénalien et/ou la médullosurrénale suivant les espèces. Des fibres nerveuses à ranakinine, une tachykinine présente chez la grenouille, ont été mises en évidence chez l'espèce *Rana ridibunda* (188), (189). Dans la surrénale de rat, La SP est présente dans le cortex surrénalien. La SP a été observée dans certaines fibres nerveuses autour des vaisseaux sanguins et dans les faisceaux nerveux épais passant à

travers le cortex surrénalien et se dirigeant vers la médullosurrénale. Quelques cellules chromaffines sont également positives dans la médullosurrénale (190), (191). La section du nerf vague et/ou du nerf splanchnique ou la destruction du ganglion sympathique coeliaque ne modifient pas la densité de ces fibres dans le cortex surrénalien ce qui suggère qu'il s'agit d'une innervation intrasurrénalienne non cholinergique non adrénergique (149). Sur le plan fonctionnel, la ranakinine stimule les sécrétions d'aldostérone et de corticostérone par les glandes interrénales de la grenouille *Rana ridibunda* (189), (192). Il a été montré que chez le rat, la SP stimule *in vitro* et *in vivo* la sécrétion surrénalienne d'aldostérone, probablement *via* le relais des cellules chromaffines, de manière indépendante du SRA et de l'axe corticotrope (193).

Le catabolisme de la SP est assuré par des enzymes de type endopeptidases qui génèrent plusieurs fragments (194). Parmi ces enzymes figurent : l'ECA, la néprilysine (NEP), l'enzyme de conversion de l'endothéline et la dipeptidyl peptidase-4 (DPP4). L'ECA produit un fragment SP [1-8] (195), (196), la DPP4 génère quant à elle la SP [5-11]. D'autres fragments de la SP ont également été identifiés: les fragments SP [1-4], SP [1-7], SP [1-9], SP [3-11], SP[2-11] ou SP [6-11] (197). Ces fragments présentent plus ou moins des effets biologiques. Par exemple, le fragment SP [6-11] semble capable de produire des effets anxiogènes chez le rat après activation du récepteur NK1 (198).

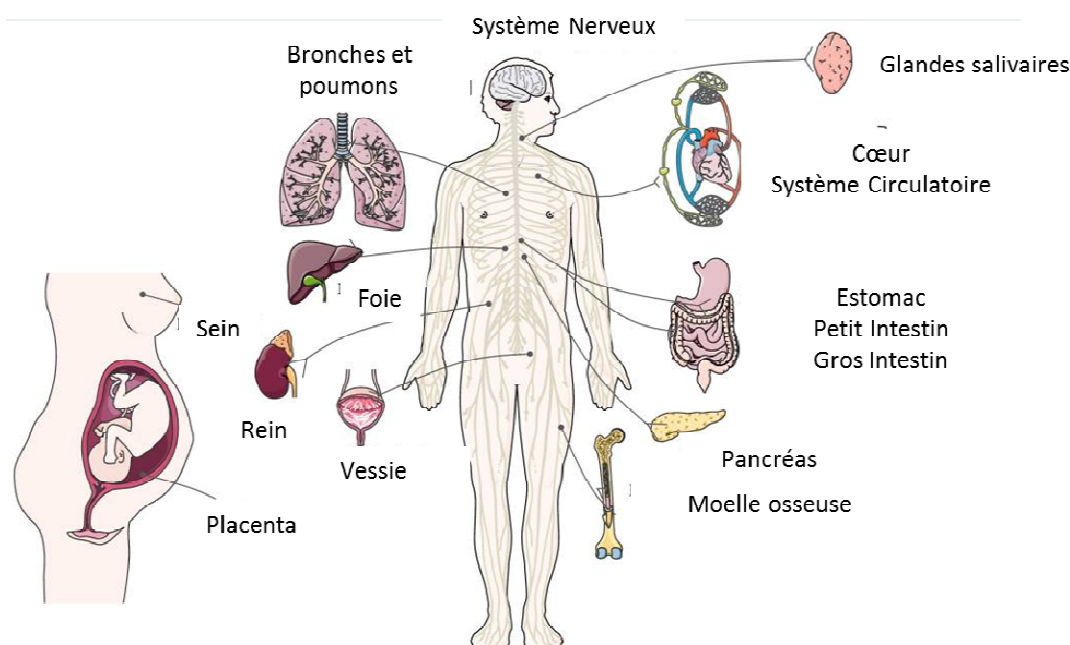


Figure 11. Distribution tissulaire du récepteur NK1 humain (d'après Garcia-Recio & Gascón, 2015). Le récepteur de la substance P est présent dans le système nerveux, le système cardiovasculaire, les tractus digestif et génito-urinaire, le poumon et l'appareil reproducteur.

2.2. La neurokinine B

Le gène *TAC3* est transcrit en un pré-ARN messenger qui mature en deux variants d'épissage α TAC3 et β TAC3, traduits ensuite en un peptide, la neurokinine B. La neurokinine B est localisée, en particulier, dans l'hypothalamus et dans le placenta. C'est non seulement un acteur majeur du contrôle neuroendocrine de la reproduction animale (199) mais également un élément important de la physiologie placentaire pendant la grossesse (200). Dans la surrénale ni *TAC3*, ni *TACR3* ne sont détectés à des niveaux aussi élevés que *TAC1* et *TACR1* dans des travaux antérieurs (201).

2.3. L'hémokinine et les endokinines

Le gène *TAC4* est transcrit en un préARN messenger qui génère ensuite quatre variants d'épissage : il s'agit de α TAC4, β TAC4, γ TAC4 et δ TAC4 qui sont traduits en différents peptides. L'hémokinine est codée par le variant α chez la souris, tout comme l'endokinine A et l'endokinine C chez l'homme (202). L'endokinine B est codée par les variants β TAC4, δ TAC4 et γ TAC4, tandis que l'endokinine D est codée par le variant β TAC4. L'hémokinine a été caractérisée dans le tissu hématopoïétique en 2000 (203). En 2003, ce sont les endokinines qui ont été caractérisées chez l'homme et qui reçurent ce nom en raison de leur expression dans les tissus endocrines comme le placenta et la glande surrénale ainsi que la lignée corticosurrénalienne humaine H295 (204) (205).

2.4. Les récepteurs des tachykinines

Les récepteurs des TKs appartiennent à la famille des GPCR. Dans l'espèce humaine, trois récepteurs des TKs ont été identifiés et nommés NK1, NK2, NK3 et codés par les gènes *TACR1*, *TACR2* et *TACR3*. Ces récepteurs sont composés de trois boucles extracellulaires (ECL1, 2 et 3), trois boucles intracellulaires (ICL 1, 2 et 3), sept domaines transmembranaires et d'une queue intracellulaire. Les TKs se lient à la partie extracellulaire des récepteurs par leur extrémité C-terminale (**Figure 12**). Ces récepteurs GPCR sont couplés à une protéine $G_{q/11}$ qui active la voie calcique ainsi que la voie ERK (206), (207).

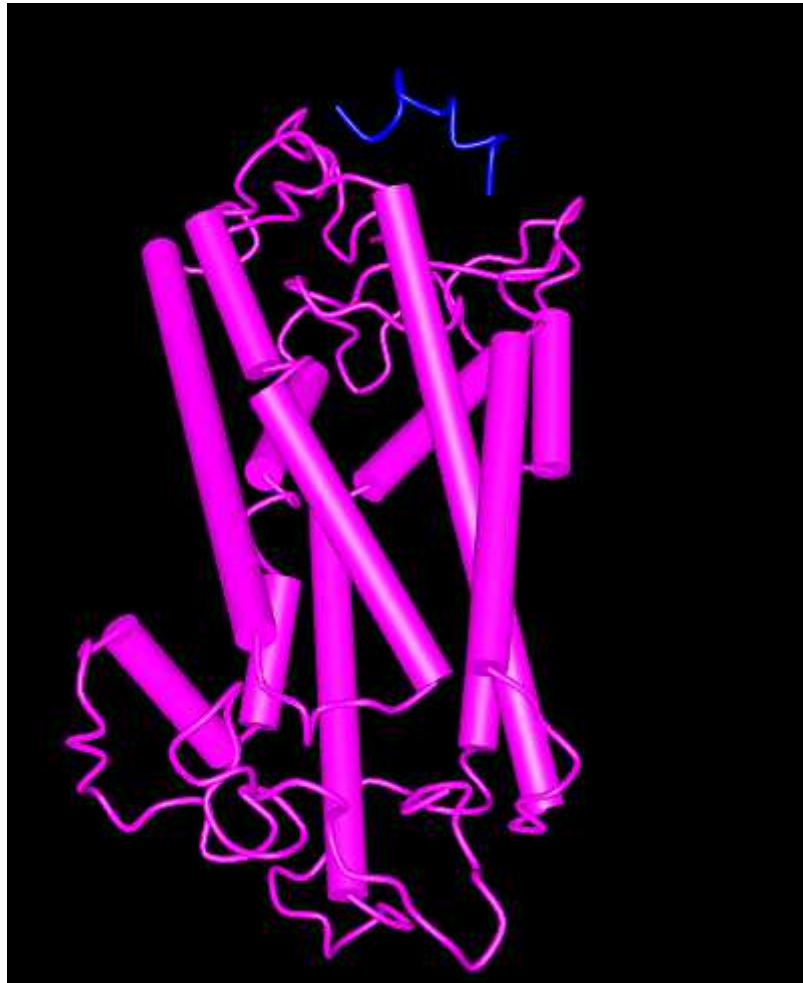


Figure 12. Représentation tridimensionnelle de la SP (en bleu) se fixant au récepteur NK1 (en violet). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/2KSB>

Le récepteur NK1 est réparti de manière ubiquiste dans les différents organes (207). Deux isoformes du récepteur NK1 ont été caractérisées, une isoforme complète et une isoforme tronquée ou courte (208) provenant de l'épissage alternatif d'un transcrit primaire du gène *TACR1* (170). L'isoforme complète est composée de 407 acides aminés tandis que l'isoforme courte est tronquée de 96 acides aminés à l'extrémité C-terminale. L'isoforme complète possède une queue intracellulaire indispensable au couplage à la voie calcique. Les deux isoformes du récepteur sont réparties différemment dans les différents organes (204). Ainsi, dans le système nerveux, l'isoforme complète est exprimée de manière prédominante par rapport à la forme courte. En revanche, en dehors du système nerveux, les ARN messagers codant les deux isoformes montrent des niveaux d'expression variables suivant les tissus incluant la surrénale (196), (204), (209).

Le récepteur NK2 est présent dans le système nerveux central (SNC) (210), dans le tractus digestif (estomac, gros intestin), dans les vaisseaux (artères et veines) ainsi que dans les cellules musculaires lisses bronchiques (211). Au niveau du SNC, ce récepteur est localisé dans le noyau caudé, le putamen, l'hippocampe, la substance noire et le cortex cérébral (210). Au niveau intestinal, l'activation du récepteur NK2 module le péristaltisme intestinal de manière similaire au récepteur NK1 (184). Il a été rapporté que l'activation du récepteur NK2 par son ligand préféré, la neurokinine A (NKA), au niveau de l'endothélium ou des cellules musculaires lisses déclenche la vasoconstriction des artères coronaires ou des veines saphènes (212), (213).

Le récepteur NK3 est, quant à lui, localisé dans des neurones hypothalamiques, les neurones KNdy, produisant la kisspeptine, neurokinine B et dynorphine qui sont des neurones contrôlant les neurones à GnRH impliqués dans la régulation de l'axe gonadotrope (214) (215), (216).

➤ Pharmacologie des récepteurs des tachykinines

Les récepteurs NK1, NK2 et NK3 présentent différentes sensibilités pour les peptides de la famille des tachykinines (**Tableau 2**). Des études pharmacologiques, ont été réalisées à partir de membranes de cellules de lignées cellulaires de type CHO (chinese hamster ovary) exprimant les récepteurs recombinants NK1, NK2 et NK3 ainsi que des lignées cellulaires exprimant naturellement l'un des types de récepteurs comme les glioblastomes (NK1) ou la lignée de cancer colique, CaCo2 (NK2) (217). Ces études ont révélé que le récepteur NK1 présente une affinité pour la SP environ 2 fois plus forte ($K_i = 3,6 \text{ nM}$) que celle de l'hémokinine 1 ($K_i = 6 \text{ nM}$), six fois plus forte que celle des endokinines A/B ($23,8 \text{ nM}$) et plus de cent fois plus forte que celle de la neurokinine A (495 nM). Le NK1 n'a aucune affinité pour les autres tachykinines dont la neurokinine B et les endokinines C et D. La SP est donc le ligand préférentiel du NK1. Par comparaison la NKA se lie préférentiellement au NK2 alors que la NKB est le peptide le plus affin du NK3. En effet l'affinité du récepteur NK2 pour la NKA ($K_i=4,4 \text{ nM}$) est près de 47 fois plus importante que celle de la SP ($K_i=188,2 \text{ nM}$), près de 50 fois plus importante que celle des endokinines A/B ($K_i=185,4 \text{ nM}$), près de 200 fois plus forte que celle de l'hémokinine ($K_i=782,5 \text{ nM}$) et près de 500 fois plus importante que celle de la neurokinine B ($K_i=1379,5 \text{ nM}$). Le récepteur NK3 a l'affinité maximale pour la NKB ($K_i=29,3 \text{ nM}$) atteignant près de 6 fois celle de la NKA ($K_i=176\text{nM}$). Sa capacité de liaison pour la SP, les endokinines A/B et l'hémokinine est beaucoup plus faible comme en atteste par des $K_i>10\mu\text{M}$.

	Récepteurs des tachykinines		
Ligands	NK1	NK2	NK3
SP	3,6+/-1,2	188,2+/-16,0	10139+/-908,3
HK-1	6+/-2,4	782,5+/-24,5	36230 +/-2530
NKA	495,1+/-75,3	4,4+/-0,1	176,3 +/- 93,1
NKB	*	1379,5+/-287,5	29,3 +/- 9,7
EKA/B	23,8+/-3,4	185,4+/-21,7	12130 +/- 221,8
EKC	*	*	55527 +/- 5788,3
EKD	*	*	28080 +/- 1700

Tableau 2. Constantes de dissociation K_i des tachykinines pour les différents récepteurs NK1, NK2 et NK3 humains (d'après NM Page et al, 2003). Les résultats correspondent aux valeurs de K_i (nM) déterminées par le déplacement d'antagonistes spécifiques de chaque récepteur, marqués au tritium. Ces valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes +/- déviation standard. * Absence de déplacement significatif à 10^{-5} M.

➤ Système de transduction des récepteurs des tachykinines

La liaison de la SP à l'isoforme longue du récepteur NK1 active plusieurs voies de signalisation cellulaire (**Figure 13**) (218) : [i] la voie calcique et la voie des β -arrestines via l'activation d'une protéine $G_{q/11}$ et [ii] la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) via la protéine G_s . Comme l'ANGII activant le récepteur AT1, la liaison de la SP à l'isoforme longue couplé à une protéine $G_{q/11}$, active une phospholipase C β clivant un phospholipide membranaire, le PIP2 pour générer deux produits, IP3 et DAG. L'IP3 se fixe sur un récepteur au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui provoque une libération de Ca^{2+} vers le cytoplasme. Le DAG reste fixé à la membrane cellulaire, puis active la protéine kinase C (PKC) qui, à son tour, phosphoryle le récepteur NK1 et favorise le recrutement des β -arrestines.

La voie ERK est également activée par les deux isoformes du récepteur NK1 de manière différentielle : la forme longue entraîne une phosphorylation rapide et soutenue de la voie ERK tandis que la forme courte induit une phosphorylation différée (222).

Il a également été montré que la liaison de la SP au récepteur NK1 peut activer une protéine G_s qui entraîne le recrutement d'une adénylyl cyclase conduisant à la formation d'AMPc (219), (220). L'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle ensuite ses différentes cibles moléculaires(207). En revanche l'isoforme courte du récepteur NK1 n'est pas couplée à la voie protéine $G_{q/11}$, PLC et calcium cytosolique.

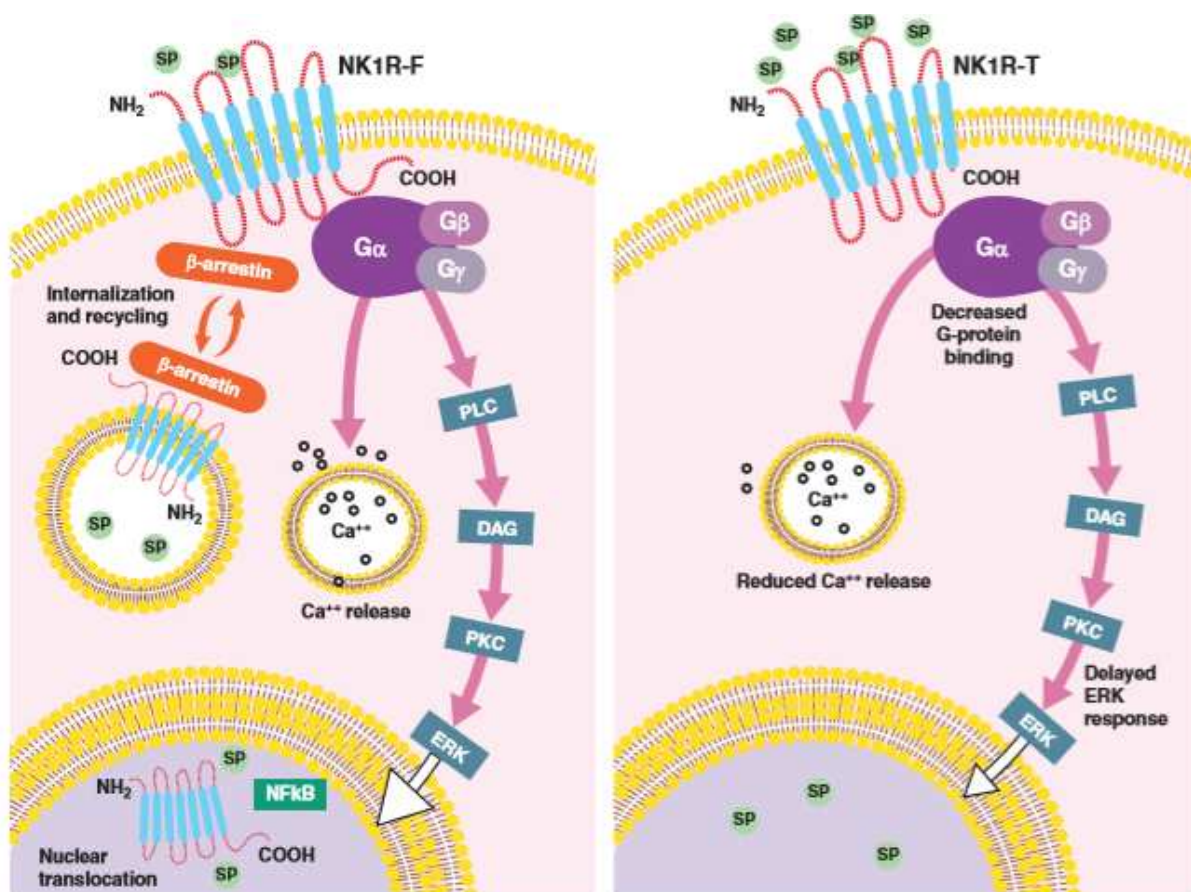


Figure 13. Voies de transduction du signal activées par les 2 isoformes du récepteur NK1, NK1R-F ou forme longue, et NK1R-T ou forme courte/tronquée (D'après Spitsin et al, 2017). Les 2 isoformes du récepteur NK1 activent toutes deux la voie ERK. La fixation de la SP sur l'isoforme longue active la voie calcique et entraîne l'internalisation du récepteur NK1 tandis que la fixation de la SP sur l'isoforme courte n'active que très faiblement la voie calcique.

Le récepteur NK1 peut être désensibilisé via son internalisation. Ce mécanisme concerne plus particulièrement l'isoforme longue du récepteur via l'activation des β -arrestines par la protéine $G_{q/11}$. La liaison de la SP sur le récepteur NK1 permet le recrutement des protéines $G_{q/11}$ et G_s qui activent in fine des kinases, telles que la PKC, et les protéines G-protein Receptor Kinases (GRK) (221). Ces kinases sont transloquées vers la membrane plasmique où elles phosphorylent la partie intracellulaire du récepteur NK1. La phosphorylation de la queue du récepteur NK1 permet le

recrutement des bêta-arrestines. Ces protéines adaptatrices orientent le récepteur NK1 couplé à la SP vers les endosomes. L'acidification du pH dans les endosomes favorise la dissociation du récepteur NK1 et de son ligand. Le récepteur est alors recyclé vers la membrane plasmique tandis que la SP est dégradée dans les lysosomes. La queue intracellulaire étant absente dans l'isoforme courte du récepteur, cette dernière ne peut pas interagir avec la β -arrestine et être internalisée (207).

Les récepteurs NK2 et NK3, qui appartiennent également à la famille des RCPG, sont aussi couplés à une Gq/11 et à une protéine Gs stimulant respectivement une PLC et une adénylyl cyclase.

2.5. Les tachykinines et leurs récepteurs en physiopathologie

Les TKs et leurs récepteurs sont impliqués dans différents mécanismes physiopathologiques, tels que l'inflammation, la nociception, les cancers, mais également dans diverses pathologies touchant différents appareils, digestif, respiratoire, urogénital, cutané ainsi que les systèmes nerveux et immunitaire (222).

➤La douleur

Le stimulus douloureux active des récepteurs nociceptifs ou nocicepteurs au niveau d'un tissu périphérique (cutané, viscère plein, viscère creux). Les nocicepteurs sont de types thermique, chimique, mécanique ou polymodal et sont présents dans des fibres nerveuses soit faiblement myélinisées, les fibres A δ soit des fibres amyélinisées C. Le message nociceptif est ensuite transmis vers le cortex cérébral grâce au relais de trois neurones (223). Les axones des fibres A δ et C conduisent l'influx nerveux depuis les nocicepteurs jusqu'à la corne postérieure de la moelle spinale. A ce niveau, la transmission synaptique est assurée par la substance P et du glutamate pour les fibres C et de glutamate pour les fibres A δ . Le signal nerveux suit ensuite les voies de transmission spino-thalamique puis le trajet thalamo-cortical (Figure 14).

➤L'inflammation neurogène

L'inflammation neurogène est une réponse inflammatoire résultant de la libération locale par des neurones afférents, de différents médiateurs inflammatoires et de neuropeptides, tels que la SP et le CGRP. Cette inflammation s'accompagne d'une vasodilatation avec une extravasation plasmatique et un œdème tissulaire. Ainsi, une agression tissulaire active des fibres nerveuses

sensitives locales, qui en retour via un arc réflexe (224), induisent la libération de SP et de CGRP par des fibres afférentes (**Figure 14**). La dégranulation des mastocytes proches des terminaisons nerveuses libère de l'histamine qui provoque à son tour la libération de SP et CGRP par les fibres nerveuses locales (222). La SP circule donc par voie antidromique par rapport au trajet de l'influx nerveux véhiculé vers les centres médullaires. Globalement, ce système complexe aboutit à la libération de SP au niveau des sites lésionnels et périlésionnels (**Figure 14**).

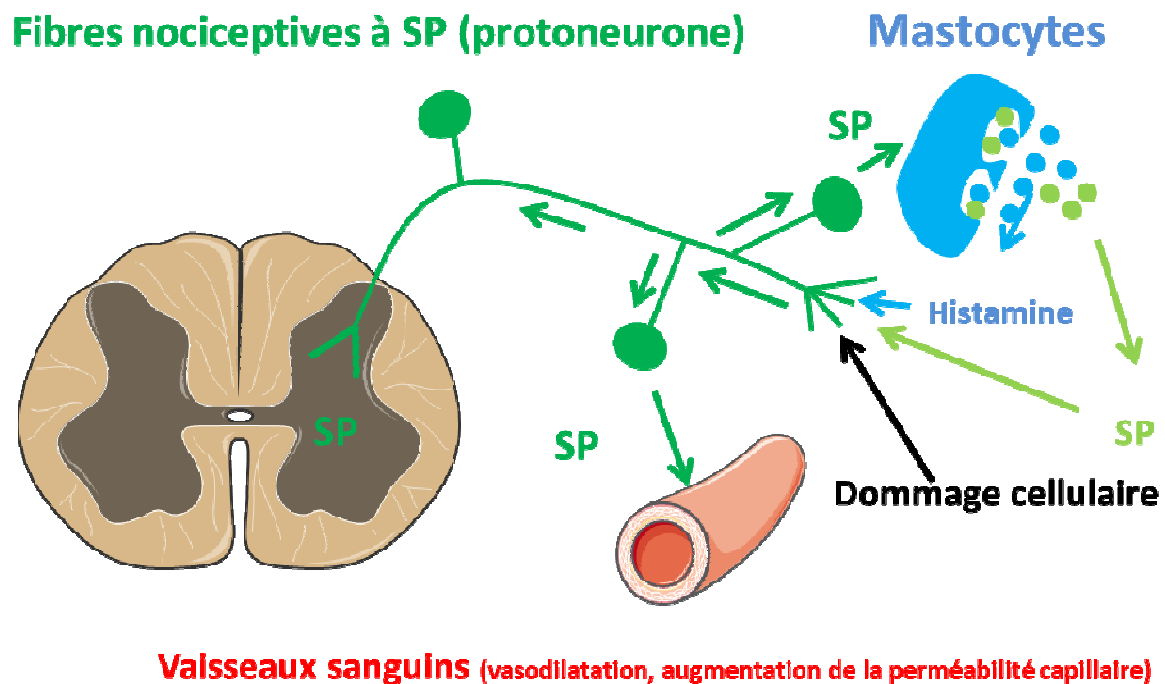


Figure 14. Voies nerveuses impliquées dans l'influx nociceptif et l'inflammation neurogène. De manière générale, un dommage cellulaire provoque l'activation de fibres nociceptives et une inflammation neurogène. La transmission de l'influx nociceptif du tissu périphérique vers la moelle, implique la substance P à plusieurs niveaux : la substance P assure la transmission synaptique de l'influx nociceptif entre le protoneurone et le deutoneurone situé dans la corne postérieure de la moelle dans des fibres de type C. La substance P est également libérée par des fibres nerveuses périphériques sous l'action d'une stimulation antidromique lié à un réflexe d'axone, qui provoque la dégranulation de nombreux médiateurs mastocytaires (histamine, substance P, etc...) au voisinage des terminaisons nerveuses, ainsi qu'une vasodilatation des artérioles et une augmentation de la perméabilité capillaire. Ces différents acteurs participent à l'inflammation neurogène (schéma d'après <https://courses.washington.edu/conj/sensory/pain.html>)

➤ Les vomissements

La SP est impliquée dans le réflexe du vomissement (207). Ce réflexe est sous la dépendance de plusieurs noyaux du tronc cérébral qui intègrent des influx de différentes origines, dont l'*area postrema*, centre médullaire comprenant la zone cible chémoréceptrice ou zone gâchette, et le noyau du tractus solitaire. Ce centre reçoit les stimuli efférents provenant du tractus gastrointestinal qui cheminent principalement via le nerf vague (nerf X). L'*area postrema* reçoit tous les influx, et en retour produit le réflexe de vomissement via différents nerfs commandant les contractions des muscles (striés et viscéraux). Le noyau du tractus solitaire coordonne les contractions musculaires nécessaires à l'effort de vomissement. De nombreux neurotransmetteurs dont la 5-HT et la SP stimulent les récepteurs présents dans la zone gâchette.

➤ Le cancer

La SP participe à la progression du cancer (225), (184), (226) en favorisant la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, ainsi que l'angiogénèse tumorale (225), (227). De fait, le récepteur NK1 a été retrouvé dans les cellules cancéreuses de différentes tumeurs comme les astrocytomes, les glioblastomes, les cancers médullaires de la thyroïde ainsi que dans les vaisseaux intra- et péri-tumoraux (228). De plus, il a été observé une augmentation des concentrations plasmatiques de SP chez des patients atteints de tumeurs neuroendocrines digestives par rapport aux sujets contrôles (228), (229), (230).

➤ Les pathologies cardiovasculaires

L'implication de la SP a été évaluée dans différentes pathologies cardiovasculaires (177), telles que l'hypertension artérielle (HTA) et les cardiopathies ischémiques.

Les résultats obtenus dans différents modèles murins d'HTA suggèrent un rôle de la SP dans la physiopathologie de cette affection. Dans le modèle de rats hypertendus DOCA-salt obtenu par administration d'un minéralocorticoïde de synthèse, l'acétate de désoxycorticostérone, et du chlorure de Na⁺ pendant sept jours (231), les concentrations plasmatiques de SP étaient significativement augmentées par rapport aux animaux contrôles. De façon concordante, l'expression des ARNs codés par le gène *TAC1* est augmentée dans le ventricule cardiaque gauche dans un autre modèle de rat hypertendu SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) (232)(233). Les études physiologiques ont montré que l'administration intracérébroventriculaire augmente la pression artérielle chez le rat normotendu, suggérant que le neuropeptide pourrait jouer un rôle, au niveau central, dans la pathogénie de l'hypertension artérielle. Ces données indiquent que

l'HTA est associée à une élévation de la production du peptide. Toutefois il a été rapporté une augmentation significative de la pression artérielle moyenne chez des souris knock-out pour *TACR1* (234). A contrario, d'autres études suggèrent que l'HTA serait associée à une diminution des concentrations sanguines de SP. Chez les sujets avec une hypertension artérielle essentielle, on observe une réduction des concentrations plasmatiques de SP par rapport à des sujets normotendus (235). De même, l'augmentation de la pression artérielle observée après administration d'un antagoniste du récepteur NK1, le CP96345 dans le modèle de rat hypertendu est en faveur d'un effet hypotenseur de la SP circulante (236).

Dans la pathologie ischémique cardiaque, la SP exerce des effets bénéfiques à court terme mais délétères sur le long terme. En effet, à court terme, la SP lutte contre les effets néfastes des mécanismes d'ischémie et de reperfusion myocardique notamment via son action vasodilatatrice puissante qui permet une meilleure reperfusion et donc une amélioration de la fonction cardiaque (237). En revanche, sur le long terme, la SP semble exercer des effets néfastes sur le remodelage myocardique via l'activation des mastocytes cardiaques, qui favorisent la fibrose du muscle cardiaque.

2.6. Le développement des médicaments ciblant les tachykinines

Les tachykinines et leurs récepteurs constituent des cibles pharmacologiques intéressantes dans différentes pathologies (224), (238), (239). Ainsi, des antagonistes des récepteurs des tachykinines ont été développés dans le domaine de la pharmacologie pulmonaire pour traiter l'asthme (239), en neuropharmacologie, pour traiter des syndromes dépressifs et anxieux ainsi que les nausées et vomissements induits par les chimiothérapies et plus récemment en neuroendocrinologie pour moduler la commande centrale de l'axe gonadotrope (240). Récemment, un essai clinique de phase 2, a évalué avec succès un antagoniste du récepteur NK3 dans le traitement des bouffées de chaleur chez des femmes ménopausées (240).

2.6.1. Le développement des antagonistes NK1

Plus de trois cents brevets ont été déposés et une douzaine de molécules antagonistes du récepteur NK1 ont été étudiées au cours des dernières années (241). En revanche, seuls deux antagonistes des tachykinines ont obtenus une autorisation de mise sur le marché. Il s'agit de l'aprépitant et sa prodrogue, le fosaprépitant (207) pour la prévention des nausées et vomissements post-chimiothérapie et/ou post-opératoires (242).

2.6.2. L'aprépitant

L'aprépitant, ou MK-869 est un antagoniste sélectif non compétitif du récepteur NK1 développé par Merck (243). Au total, l'aprépitant est prescrit suivant un schéma d'administration thérapeutique de trois jours comprenant une gélule de cent vingt-cinq milligrammes le premier jour, suivie d'une gélule de quatre-vingts milligrammes le deuxième puis le troisième jour en association avec un corticostéroïde de synthèse et un antagoniste du récepteur 5-HT3. L'aprépitant a été administré chez plus de 6500 patients au cours des différents essais contrôlés randomisés, réalisés au cours de son développement comme antiémétique (244). L'aprépitant présente une constante d'inhibition médiane IC50 de l'ordre de 0,12 nmol/L pour le récepteur NK1. Les effets antiémétiques de l'aprépitant sont relayés par la fixation du médicament sur le récepteur NK1 localisé dans l'*area postrema*. A ce niveau, la barrière hématoencéphalique est très perméable ce qui rend la zone sensible aux différents molécules émetisantes, endogènes ou xénobiotiques (245). Dans ce contexte, l'aprépitant, en association avec un antagoniste du récepteur 5-HT3 et la dexaméthasone, a permis de diminuer de manière significative l'incidence des nausées et vomissements associés aux chimiothérapies en comparaison avec le traitement de référence, combinant antagoniste du récepteur 5-HT3 et dexaméthasone (246).

L'aprépitant est absorbé par voie orale avec une biodisponibilité absolue comprise entre 59 et 67% (247). Le volume de distribution de l'aprépitant est de l'ordre de 66 litres (247). Le pic moyen d'absorption (Cmax) est atteint quatre heures après l'administration du produit. La demi-vie du médicament varie de neuf à quatorze heures.

L'aprépitant est entièrement métabolisé dans le foie par des cytochromes dont le CYP3A4, le CYP2C9 et dans une moindre mesure le CYP1A2. Des enzymes de conjugaison de type UDP-glucuronosyltransférases, tel que UGT1A4, produisent des métabolites glucuronidés de l'aprépitant éliminés ensuite dans les urines (248), (249). De plus, l'aprépitant est un inhibiteur du cytochrome CYP3A4, l'un des principaux cytochromes métabolisant les médicaments et un inducteur faible du cytochrome CYP2C9. Un certain nombre d'interactions médicamenteuses d'ordre pharmacocinétique sont mises en évidence entre l'aprépitant et d'autres médicaments métabolisés par ces mêmes cytochromes (250). A titre d'exemple, une revue systématique récente met en évidence 30 interactions médicamenteuses d'ordre pharmacocinétique, entre l'aprépitant et des médicaments anticancéreux (bosutinib, cabitaxel, cyclophosphamide), des glucocorticoïdes de synthèse (dexaméthasone, méthylprednisolone), une benzodiazépine

hypnotique (le midazolam), un opioïde (l'oxycodone), un antipsychotique (la quétiapine), des inhibiteurs de la recapture de sérotonine, et la warfarine (anti-vitamine K) (251).

Parmi les effets indésirables les plus fréquents de l'aprépitant, on peut noter une cytolyse hépatique, des céphalées, la survenue de troubles digestifs tel qu'une altération du transit (constipation, diarrhée) et des troubles de type hoquet et vertiges. Des effets indésirables liés aux interactions médicamenteuses mentionnées précédemment sont également rapportés. Ainsi, l'administration concomitante d'aprépitant et d'oxycodone peut entraîner une dépression respiratoire, l'association d'aprépitant et quétiapine est à risque de somnolence, l'association d'aprépitant et d'inhibiteurs de recapture de la sérotonine est à risque de vomissement tandis que l'aprépitant associé à la warfarine peut entraîner une diminution de l'INR (International Normalized ratio), qui risque d'entraîner des récurrences thrombo-emboliques (251). Enfin, l'aprépitant est un agent pharmacologique très sélectif du récepteur NK1 et relativement bien toléré sur le plan clinique, en particulier lors de l'administration de fortes doses et ce, sur quelques semaines (252).

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La sécrétion surrénalienne d'aldostérone est sous la dépendance du système rénine-angiotensine circulant. Elle est également soumise à l'influence de nombreux facteurs paracrines intra-surréaliens, en particulier des neuromédiateurs. De fait, le cortex surrénalien est innervé par différents types de fibres nerveuses provenant du SNA, de types catécholaminergique, purinergique (ATP) et peptidergique (NPY, VIP, SP). Les facteurs neuronaux peuvent être sécrétés par des fibres nerveuses situées au contact des cellules de la zone glomérulée. C'est en particulier le cas de la substance P, dont le rôle en physiologie surrénalienne a été évalué chez l'animal mais très peu chez l'homme.

L'objectif général de ce travail de thèse s'intègre donc dans le vaste cadre de l'étude de l'influence du système nerveux sur la sécrétion des hormones corticosurréaliennes. Notre étude a consisté à explorer le rôle de la substance P dans la régulation de la production de minéralocorticoïdes dans l'espèce humaine. A cet effet, nous avons utilisé plusieurs approches expérimentales : [i] la RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) pour détecter et quantifier les ARN codant les tachykinines et leurs récepteurs dans la glande surrénale, [ii] l'immunohistochimie dans le but de visualiser l'interaction entre les fibres surréaliennes à SP et les cellules stéroïdogènes de la zone glomérulée, [iii] des approches fonctionnelles et pharmacologiques visant à évaluer les effets de la substance P sur la sécrétion d'aldostérone par les cellules corticosurréaliennes humaines en culture, ainsi que les voies de transduction impliquées, [iv] une approche clinique, l'étude APHOS ayant pour objectif d'évaluer l'effet d'un antagoniste du récepteur NK1, l'aprépitant, sur la sécrétion d'aldostérone chez des volontaires sains.

METHODES

Patients

Les prélèvements de surrénales de patients en état de mort encéphalique avec don d'organe ont été réalisées conformément au protocole établi conjointement, par le Pr. Hervé Lefebvre (INSERM UMR 1239 et CHU-Hôpitaux de Rouen) et le Dr Edgard Menguy, médecin coordinateur de l'unité de prélèvements et greffes du CHU-Hôpitaux de Rouen. Ce protocole a reçu une autorisation de l'Agence de Biomédecine. Il requiert la participation des chirurgiens urologues du CHU de Rouen avec lesquels notre équipe a établi des liens de collaboration depuis plusieurs années. Les glandes surrénales sont recueillies extemporanément lors du prélèvement des reins par le chirurgien urologue et placées immédiatement dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), contenant 1% d'une solution d'antifongique et d'antibiotique. Un échantillon de surrénale est examiné par un médecin anatomopathologiste pour confirmer le caractère non pathologique de la glande surrénale. Des prélèvements de surrénales sont également issus de patients ayant bénéficié d'une néphrectomie élargie. Le service d'anatomopathologie a fourni toutes les coupes de tissus fixés pour les expériences histologiques dans cette étude. Des fragments de tissu surrénalien ont été utilisés frais pour les études fonctionnelles, fixés et inclus en paraffine afin de réaliser des coupes histologiques ou congelés à -80°C en vue d'extraire les acides nucléiques.

Cultures cellulaires

Les surrénales sont rapidement transportées au laboratoire puis disséquées du tissu adipeux péricurrénalien. Les surrénales sont émincées en fragments de quelques millimètres. Ces derniers subissent ensuite une digestion enzymatique par incubation à 37°C dans une solution de collagénase IA (60 mg/ml ; Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et de DNase de type I (4 mg/ml ; Sigma–Aldrich), pendant 45 minutes dans un incubateur avec 5% de CO₂, après une dissociation mécanique par pipetages successifs. Les enzymes sont éliminées par centrifugation des cellules. A l'issue de ces étapes, les cellules sont mises en suspension dans le milieu de culture composé de 50% DMEM, 50% HAM F12 (Fisher Scientific), 5% sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), 1% antibiotique/antimycotique et 1% Insuline-Transferrine-Sélénium (Gibco), à la densité de 10⁶ cellules/mL. En fonction des expériences réalisées, les suspensions cellulaires sont distribuées dans des plaques de culture cellulaire Costar® (Corning) comptant 24 puits pour les études pharmacologiques, 6 puits pour les études d'expression des ARN messagers et des protéines et 96 puits pour la mesure de calcium. 48 heures après la mise en culture et

l'adhésion des cellules, les milieux de culture sont renouvelés. La veille des études fonctionnelles, les cellules sont placées dans un milieu appauvri à 1% de SVF. Pour les expériences de stimulation, les cellules sont incubées avec du DMEM + 1% antibiotique/antifongique additionné ou non de différentes substances. La SP, l'hémokinine, l'angiotensine II, le PD0325901 fournis par Sigma-Aldrich. L'aprépitant a été obtenu chez Selleck Chemicals (Houston, Etats-Unis). Les endokinines A/B, C and D ont été achetées chez Biorbyt (Cambridge, United Kingdom) et le GR 159897 chez Tocris (Lille, France). Après 24 heures d'incubation, les surnageants de culture et/ou les cellules sont collectés.

Dosages des stéroïdes par radioimmunos dosage

Le dosage d'aldostérone ou de cortisol est réalisé selon une méthode radioimmunologique mise au point au laboratoire, par compétition entre l'hormone marquée au tritium et l'hormone à doser. Les milieux de culture prélevés ont été conservés à -20°C jusqu'au dosage. L'incubation avec l'anticorps primaire a été réalisée pendant toute la nuit à +4°C. Après séparation, au charbon, la radioactivité de la fraction liée à l'anticorps est quantifiée sur un compteur bêta (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). La sensibilité des dosages est de 80 pg/mL pour l'aldostérone et de 150 pg/mL pour le cortisol. La réaction croisée des anticorps anti-cortisol et anti-aldostérone avec la corticostérone est inférieure à 0,001%.

RT-PCR

Les ARNs surrénaux ont été extraits des tissus congelés et des cellules en culture à l'aide de Tri-Reagent (Sigma-Aldrich) puis purifiés sur des mini colonnes Nucleospin RNAII (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ARNs ont été convertis en ADNc (ADN complémentaire) en utilisant le système de transcription inverse ImProm-II (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Les ARNm polyA de surrénale, de moelle spinale, d'intestin grêle et placenta humains (Clontech, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux), ainsi que des ARNm de lignées cellulaires LAD2 et Caco-2 ont été utilisés comme contrôles positifs. L'amplification par PCR a été réalisée en duplicate en utilisant le tampon de mélange Master SYBR Green I (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) avec un système de PCR en temps réel QuantStudio 3 (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France) avec des amorces spécifiques (**Tableau 3**). La quantification des ARNs dans chaque échantillon a été normalisée en utilisant l'ADNc de *PPIA* codant la cyclophiline, comme gène de référence avec soit une courbe standard soit la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Nom du gène	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Numéro d'accèsion sur GenBank	Position de l'amorce	Longueur de l'amplicon (paires de bases)
PPIA	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	TTGCCATTCTGGACCCAAA	NM_021130.3	458-477	241
TAC1	GACTGTCCGTCGCAAAATCC	CCTCCTTGATCTGGTCGCTG	NM_013996.2, NM_013997.2, NM_013998.2, NM_003182.2	224-243	150
TAC3	CTAGATCCCCTCCACTCGGT	TCCTCCTGTGGCTCCTTACA	NM_001178054.1; NM_013251.3	39-58	227
TAC4	CACTGAAGCAGAGACCTGGG	TCCCCATCAGCCCAAAGAAC	NM_170685.2; NM_001077503.1; NM_001077504.1; NM_001077505.1; NM_001077506.1	87-106	101
TACR1	CCCGTGCTGGTGATTGGCTAT	TTTTGACCACCTTGCGCTTG	NM_015727.2; NM_001058.3	1207-1227	124
TACR2	GCTTCTACTCCACCGTCACCAT	GCTACAAACATCACCGCGAGC	NM_001057.2	1095-1116	148
TACR3	TCATAGCGAGTGGTACTTTGGC	GACAGTCTGGGTTTCAAGGGA	NM_001059.2	582-603	147
TACR1 forme courte	TGAGCTCCACCATGTACAACC	CCCACTTGCTCCTCTTGCT	NM_015727.2	1469-1489	165
TACR1 forme longue	AAAGTCAGCCGCTGGAGAC	TCATGGTCTTGAGTCACTTCG	NM_001058.3	1633-1652	139
CYP11B2	TCCAGGTGTGTTCAAGTATCC	GAAGCCATCTCTGAGGTCTGTG	NM_000498.3	2705-2726	146
STAR	GGCTACTCAGCATCGACCTC	CATCCCACTGTACCAGATG	NM_000349.2	986-1005	250
CYP21A2	GAGTTCTGTGAGCGCA	CACGTCCACAATTTGGAT	NM_000500.7	453-468	201
HSD3B2	TTGGACAAGGCCTTCAGACA	ACAGGCGGTGTGGATGAC	NM_000198.3	272-291	150

Tableau 3. Séquences nucléotidiques et numéro d'accèsion GenBank des amorces utilisées en RT-PCR

Western-blot

Les cellules corticosurréaliennes en culture sont incubées pendant 30 et 60 ou 240 minutes avec les sécrétagogues puis elles sont rincées avec une solution de PBS (*Phosphate buffered saline*). Les cellules sont lysées par une solution de RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) et par grattage. Les lysats cellulaires sont ensuite conservés à -80°C. Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford. Les protéines sont diluées dans une solution de Laemmli (Biorad, Marnes la Coquette, France) contenant du SDS (dodécylsulfate de sodium). Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Biorad) grâce à un système de transfert Transblot Turbo Transfer System (Biorad). Après incubation avec des anticorps primaires

et secondaires (**Tableau 4**), les protéines d'intérêt (ERK, phospho-ERK, vinculine) sont détectées par chimioluminescence sur le système Chemidoc (Biorad) (**Tableau 4**).

	Référence	Fournisseur	Espèce hôte	Dilution	Temps Incubation
Anticorps primaire					
ERK 1 et 2	M5670	Sigma	lapin	1/40000	nuit
phospho-ERK	4370	Cell Signaling	souris	1/1000	nuit
Vinculine	MCA465GA	Biorad	souris	1/1000	nuit
Anticorps secondaire					
Anti-IgG lapin	31460	Thermo Scientific	chèvre	1/10000	90 minutes
Anti-IgG souris	31430	Thermo Scientific	chèvre	1/10000	90 minutes

Tableau 4. Anticorps utilisés au cours du Western-blot

Immunohistochimie et immunofluorescence

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

Pour l'immunofluorescence, un immunobloquage des sites non spécifiques est réalisé par incubation avec du sérum non-immun (Normal Donkey Serum) pendant 30 minutes. Les lames sont ensuite incubées une nuit à +4°C avec un anticorps primaire (Tableau 5) dilué dans le tampon. Après rinçage, un anticorps secondaire conjugué à différents fluorochromes (Alexa 488, Alexa 594, Alexa 647 nm) est appliqué pendant 90 minutes à température ambiante. Les noyaux des cellules sont colorés au DAPI pendant 5 minutes. Pour réduire l'autofluorescence, les coupes sont incubées avec du noir soudan (0.5% dans une solution de 70% d'éthanol). Les lamelles sont ensuite montées avec du Dako Fluorescence Mounting Medium. Les acquisitions d'images sont réalisées sur un microscope confocal Leica de type TCS SP8 MP (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) sur la plateforme d'imagerie PRIMACEN (Université de Rouen).

Concernant les études d'immunohistochimie conventionnelle, les coupes réhydratées sont traitées par une solution de blocage des enzymes endogènes (peroxydases) (Dako Corporation, Les Ulis, France) pendant 5 minutes. Les lames sont incubées avec les anticorps primaires (**Tableau 5**) dilués dans l'Antibody Diluent Reagent Solution (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) en chambre humide à température ambiante pendant 30 à 60 minutes. Après lavage et incubation avec un anticorps secondaire couplé à l'HRP (horseradish peroxidase), la révélation est réalisée avec le kit En Vision+ System-HRP (Dako, Glostrup, Danemark). Enfin, une contre-coloration à l'hématoxyline est effectuée puis les coupes déshydratées par des bains d'éthanol sont montées entre lames et lamelles grâce à une solution d'inclusion Eukitt. Les acquisitions d'images sont réalisées sur un microscope Nikon sur la plateforme d'imagerie PRIMACEN.

Anticorps primaires

Protéine détectée	Espèce animale hôte	Fournisseur	Référence	Concentration finale	Démasquage antigénique
Aldostérone Synthase	Souris	Dr. Gomez-Sanchez	PMID24325867	1/100	Tris EDTA pH=9
Substance P	Rat	Interchim	MM-0001-1	1/25	Citrate pH=6
Récepteur NK1	Lapin	Sigma Aldrich	T5950	1/200	Citrate pH=6
Protéine S100	Lapin	Dako Corporation	20311	1/300	Citrate pH=6
Tyrosine Hydroxylase	Souris	Chemicon-Merck Millipore	MAB 318	1/100	Citrate pH=6
Choline Acétyl Transférase	Goat	Millipore	#AB144P	1/200	Citrate pH=6

Anticorps secondaires

Protéine détectée	Espèce animale hôte	Longueur d'onde	Fournisseur	Concentration finale
IgG lapin	Âne	Alexa 488 ou Alexa 594 nm ou Alexa 647 nm	Life Technologies	1/300
IgG souris				
IgG chèvre				
IgG rat				

Tableau 5. Anticorps primaires utilisés en immunohistochimie et en immunohistofluorescence (en haut) et anticorps secondaires utilisés en immunohisto-fluorescence (en bas)

Mesure du calcium intracellulaire

Les cellules corticosurréaliennes cultivées en plaque 96 puits à fond transparent (Greiner, Courtaboeuf, France) sont rincées par un tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) à 37°C. La mesure des concentrations intracellulaire de calcium est faite avec la trousse FLIPR Calcium 5 Assay Kit (Molecular Devices) sur la FlexstationTM-III96 associé au logiciel SoftMax Pro (version 5.4) (Molecular Devices) (PRIMACEN). Les concentrations finales de SP varient de 10^{-12} M à 10^{-6} M. Les contrôles positifs utilisés sont l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) à 10^{-5} M et l'AlI à 10^{-6} M.

Etude APHOS

L'étude APHOS est un essai clinique de type preuve de concept qui a pour objectif d'évaluer les effets d'un antagoniste du récepteur NK1, l'aprépitant sur la sécrétion d'aldostérone chez des volontaires sains. Il s'agit d'un essai contrôlé, randomisé, en double aveugle, en cross-over, avec deux séquences thérapeutiques, aprépitant versus placebo, administrés dans un ordre aléatoire. La première séquence thérapeutique d'une durée de 7 jours suivie d'une période de wash-out de 14 jours. L'étude a été réalisée au Centre d'Investigations Cliniques du CHU de Rouen. L'investigateur principal était le Pr. Hervé Lefebvre. L'étude est enregistrée sur la base clinicaltrial.gov et porte le numéro NCT00977223. Vingt hommes ont été inclus dans l'étude. L'effet de l'aprépitant sur les sécrétions surréaliennes a été évalué en mesurant les concentrations d'aldostérone plasmatique et urinaire des 24 heures (critère principal), de rénine et de cortisol (critères secondaires) à l'état basal et après stimulation, par comparaison à la séquence placebo.

Des tests dynamiques agissant sur les sécrétions corticosurréaliennes ont été réalisés dans chaque séquence : [i] un test réalisé au 3ème jour comportant un passage d'une position debout pendant 2 heures à une position de décubitus pendant 2 heures, [ii] un test pharmacologique par l'administration de métoclopramide (10 mg IV) au 5ème jour, [iii] un test d'hypoglycémie insulinique au 7ème jour de chaque séquence thérapeutique (0,1 mg/kg d'insuline ordinaire IV). Au cours de chaque séquence, différents examens biologiques ont été réalisés (**Figure 15**).

Statistiques

Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM (déviation standard à la moyenne) ou médiane $\pm$ interquartile. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software, San Diego, Etats-Unis d'Amérique) en utilisant des tests non paramétriques pour séries

appariées (Test de Wilcoxon) et séries non appariées (Test de Mann-Whitney). Pour les tests ANOVA non paramétrique en série appariées, un test de Kruskal-Wallis a été utilisé. Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme significative.

INTITULES	V1 J-7	V2 JO	J1 S	J2 D	V3 J3 L	V4 J4 Ma	V5 J5 Me	V6 J6 J	V7 J7 V	V8 V	J'1 S	J'2 D	V9 J'3 L	V1 0 J'4 Ma	V11 J'5 Me	V1 2 J'6 J	V13 J'7 V	V14
Visite de pré-inclusion : information, interrogatoire, examen clinique	X																	
ECG	X																	
Présentation des résultats des examens biologiques		X																
Vérification critères d'inclusion et de non-inclusion	X	X																
Inclusion et randomisation		X																
Mesure ambulatoire de la PA sur 24 H					X	†							X	†				
Examen clinique, tolérance, observance		X			X		X		X	X			X		X		X	X
Consultation diététique		X																
Recueil E/VEIG, traitements concomitants		X			X	X	X		X	X			X	X	X		X	X
Prescription du traitement à l'étude		X																
Administration TTT par IDE					X	X	X	X					X	X	X	X		
Prise des gélules – séquence thérapeutique																		
3 Epreuves de stimulation																		
1/ Test d'orthostatisme					X								X					
2/ Test au métoclopramide (priméran® 10 mg IV)							X							X				
3/ Test d'hypoglycémie insulinaire (actrapid®)									X								X	
Biologie :																		
NFS	X																	
Ionogramme sanguin (Na, K, Cl, RA)	X				X	X	X	X					X	X	X	X		
Glycémie capillaire							X							X			X	
Glycémie									X	X	X	X					X	
Urémie	X																	
Transaminases	X				X				X				X				X	X
Créatinémie	X																	
Sérologies HIV	X																	
Sérologies hépatites B et C	X																	
Aldostéronémie					X	X	X	X					X	X	X	X		
Réninémie					X	X	X	X					X	X	X	X		
Cortisolémie					X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
ACTH									X	X	X	X					X	
Créatininurie	X				X	†							X	†				
Aldostéronurie	X				X	†							X	†				
Cortisol libre urinaire (CLU)	X				X	†							X	†				
Natriurèse	X				X	†							X	†				
Visite médicale de fin d'étude																		X

Figure 15. Calendrier du déroulement de l'étude APHOS.

RESULTATS

Article : Le contrôle nerveux de la sécrétion d'aldostérone par la substance P chez l'homme : une nouvelle action anti-aldostérone pour un médicament antiémétique

Julien Wils, Céline Duparc, Anne-Françoise Cailleux, Caroline Guiheneuf, Isabelle Boutelet, Christophe Dubessy, Saloua Cherifi, Bruno Cauliez, Françoise Gobet, Guillaume Defortescu, Jean-François Ménard, Estelle Louiset, Hervé Lefebvre

La production d'aldostérone, qui joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie hydrominérale et de la régulation de la pression artérielle, est stimulée par le système rénine-angiotensine (SRA). En outre, on sait que divers facteurs régulateurs paracrines, y compris les cytokines, les neurotransmetteurs conventionnels, et les neuropeptides, sont capables de moduler la sécrétion de corticostéroïdes. Ces signaux sont libérés dans le tissu surrénalien par divers types cellulaires dont les neurones. Un réseau complexe de fibres nerveuses, dont des fibres à substance P (SP), un neuropeptide de la famille des tachykinines, a été observé dans la région sous-capsulaire du cortex surrénalien humain. Bien que certaines données indiquent que la SP stimule la corticostéroïdogenèse chez le rongeur, son rôle dans le contrôle de la fonction corticosurrénalienne chez l'homme demeure incertain. Nous avons donc étudié le rôle de la SP dans le contrôle de la production d'aldostérone et de cortisol par des approches *in vitro* et *in vivo*. Nous avons détecté les transcrits du gène *TAC1* codant la SP dans les échantillons de surrénales. L'immunohistochimie a montré la présence de fibres nerveuses SP-positives principalement visualisées dans la zone glomérulée et distinctes des fibres adrénergiques et cholinergiques. Ces fibres appartiennent donc au système nerveux non-adrénergique non-cholinergique (NANC). Les actions biologiques de la SP sont connues pour être principalement relayées par un type de récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs NK1. Ce type de récepteurs est codé par le gène *TACR1* et possède deux isoformes, à savoir les variants courts (TACR1s) et longs (TACR1l). Les analyses RT-PCR en temps réel ont permis de détecter des ARNm de *TACR1* et en majorité l'isoforme TACR1s dans les glandes surrénales. Les cellules productrices d'aldostérone expriment le récepteur NK1 et sont situées à proximité des fibres nerveuses à SP, suggérant fortement que la SP peut moduler la corticostéroïdogenèse par l'activation du NK1R. De manière cohérente, la SP stimule, de manière dose-dépendante, via la voie ERK, les sécrétions d'aldostérone et de cortisol par des cellules corticosurrénales en culture. L'effet de la SP est plus puissant sur la synthèse d'aldostérone. L'action de la SP sur la sécrétion d'aldostérone est abolie par l'aprépitant, un antagoniste du NK1R. La SP stimule l'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse de l'aldostérone. Globalement, ces données montrent donc que, dans le cortex surrénalien humain, la SP stimule la synthèse d'aldostérone par l'activation de NK1R. Pour évaluer le rôle physiologique de la SP sur le contrôle de la production d'aldostérone par la SP, un essai clinique a été réalisé chez des volontaires sains. Ce protocole a montré que l'aprépitant par rapport à un placebo diminue la production globale d'aldostérone (aldostéronurie des 24 heures) et réduit significativement l'aldostéronémie en position couchée. De plus, l'aprépitant n'affecte pas la rénine en position couchée. En revanche, l'aprépitant n'a aucune influence sur les taux plasmatiques d'aldostérone en position debout. Ces données indiquent donc que l'effet de la SP sur la fonction minéralocorticoïde ne résulte pas d'un effet indirect mettant en jeu le SRA. Globalement ces résultats suggèrent que le système NANC exerce, via la libération intra-surrénalienne de SP, un tonus stimulant sur la sécrétion d'aldostérone qui intervient dans le maintien de la production de minéralocorticoïdes en position couchée.

Neural control of aldosterone secretion by substance P in human:

A new anti-aldosterone action for an antiemetic drug

Julien Wils^{1,2*}, Céline Duparc^{1*}, Anne-Françoise Cailleux^{3,4}, Caroline Guiheneuf³, Isabelle Boutelet¹, Christophe Dubessy¹, Saloua Cherifi¹, Bruno Cauliez⁵, Françoise Gobet⁶, Guillaume Defortescu⁷, Jean-François Ménard⁸, Estelle Louiset^{1§}, Hervé Lefebvre^{1,3§}

Affiliations:

¹Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, DC2N, 76000, Rouen, France. ²Rouen University Hospital, Department of Pharmacology, Rouen, France. ³Rouen University Hospital, Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Rouen, France. ⁴Rouen University Hospital, Clinical Investigation Centre, INSERM, CIC1404, Rouen, France. ⁵Rouen University Hospital, Department of Biochemistry, Rouen, France. ⁶Rouen University Hospital, Department of Pathology, Rouen, France. ⁷Rouen University Hospital, Department of Urology, Rouen, France. ⁸Rouen University Hospital, Department of Biostatistics, Rouen, France.

* These authors contributed equally to this work

§ These authors share senior authorship

Corresponding author: Hervé Lefebvre, Normandie Université, UNIROUEN, INSERM, U1239, Rouen, France. University Hospital of Rouen, 76031 Rouen cedex, France. Tel.: (33) 232 88 90 81; herve.lefebvre@chu-rouen.fr.

One Sentence Summary:

The autonomic nervous system exerts a stimulatory action on aldosterone secretion involving the tachykinin substance P.

Abstract:

Aldosterone production by the human adrenal gland is regulated by plasma angiotensin, corticotrophin and potassium. We show that the neuropeptide substance P (SP) released by intraadrenal nerve fibres, stimulates aldosterone secretion *in vitro* via binding to the neurokinin type 1 receptor (NK1R) which is expressed by aldosterone producing cells in the adrenal cortex. The action of SP is mediated by the extracellular signal-regulated kinases (ERK) pathway and involves upregulation of enzymes implied in early steps of steroidogenesis. We also conducted a prospective, double blind, placebo-controlled clinical trial aimed to investigate the impact of the NK1R antagonist aprepitant on aldosterone secretion in healthy volunteers. Aprepitant decreased aldosterone production by around 30% but did not influence the aldosterone response to upright posture. These results demonstrate that the autonomic nervous system exerts a stimulatory tone on mineralocorticoid synthesis through SP, and thus plays a role in the maintenance of hydromineral homeostasis.

The human adrenal cortex produces diverse steroid hormones including aldosterone, the end product of the mineralocorticoid synthesis pathway, which is released by the zona glomerulosa, and the glucocorticoid hormone cortisol being secreted by the zona fasciculata. Both mineralocorticoid and glucocorticoid secretions are principally under the control of circulating regulatory factors. Whereas cortisol biosynthesis is dependent on the pituitary adrenocorticotrophic hormone (ACTH), the production of aldosterone, which plays a major role in the maintenance of hydromineral homeostasis and blood pressure regulation, is stimulated by the systemic renin angiotensin system (RAS) and plasma potassium (1). In addition, numerous *in vitro* studies have shown that diverse regulatory paracrine factors, including conventional neurotransmitters, cytokines and neuropeptides, are able to modulate corticosteroid secretion. These signals are released within the adrenal tissue by various cell types such as chromaffin cells, endothelial cells, immune cells and neurons (2). In particular, a complex network of nerve fibres, comprising both preganglionic cholinergic and postganglionic noradrenergic fibres, has been described in the outer part of the cortex where nerve trunks seem to accompany blood vessels (3). The functional role of adrenocortical nerve fibres remains a matter of debate but the visualization of varicosities, which are sites of neurotransmitter release, close to steroidogenic cells suggests that corticosteroid production could be controlled by neural inputs.

Tachykinins represent a family of neuropeptides including substance P (SP), neurokinins A and B (NKA and NKB), hemokinin-1 (HK-1) and endokinins A-D (EKA, EKB, EKC and EKD), that are involved in the control of pain, emesis, gonadotropic function and participate in the pathogenesis of menopausal hot flushes (4–7). Interestingly, the occurrence of substance P-immunoreactive fibres has been observed in the subcapsular region of the human adrenal cortex (8). Although some evidence indicated that SP may stimulate corticosteroidogenesis and exert trophic actions on the adrenal cortex (9, 10), its role in the control of the adrenocortical function remains unclear.

To elucidate this issue, we have first investigated expression of genes encoding tachykinins (*TAC1,3,4*) in human adrenals. We failed to detect *TAC3* mRNA whereas *TAC1* and *TAC4* were found to be expressed in the adrenal samples (Fig.1A). *TAC1* mRNAs were principally represented by β and γ transcripts, suggesting that SP and NKA could be produced. Immunohistochemistry showed the presence of SP-positive nerve fibres which were mainly visualized in the zona glomerulosa of the cortex and, more rarely, between cell cords of the zona fasciculata (Fig.1B-D), as previously observed (8). SP-containing fibres were also visualized in the wall of adrenal arteries in the vicinity of the capsule of the gland (Fig. S1). Although travelling in the same intraadrenal nerve trunks, the SP-positive fibres are distinct from adrenergic and cholinergic fibres (Fig. 1E, F).

They thus belong to the non-adrenergic non-cholinergic (NANC) nervous system which is considered by some authors as the third constituent of the autonomic nervous system beside the sympathetic and parasympathetic components (11). We then investigated whether SP may influence corticosteroidogenesis. The biological actions of tachykinins are mediated by 3 types of G protein-coupled receptors named NK1, NK2 and NK3 (NK for neurokinin), respectively encoded by the *TACR1*, *TACR2* and *TACR3* genes (5). In addition, alternative splicing of the *TACR1* primary transcript generates two isoforms, *i.e.* the short (*TACR1s*) and long (*TACR1l*) variants. The NK1 receptor (NK1R) has a high affinity for SP and weakly binds NKA, while the NK2 receptor (NK2R) is principally activated by NKA (12). Real time RT-PCR analyses allowed detection of high levels of *TACR1s* mRNA whereas *TACR2* mRNA levels were low and *TACR3* mRNA was undetectable (Fig. 2A). NK1R immunoreactivity was principally observed in the zona glomerulosa which displayed continuous staining whereas much weaker or no labeling was detected in the zona fasciculata (Fig. 2B). Interestingly, arteriole walls also harboured NK1R immunolabeling (Fig. S2). In addition, NK1R-positive adrenocortical cells were located close to nerve fibres containing SP (Fig. 2C). Interestingly, aldosterone-producing cells, which thus express aldosterone synthase encoded by *CYP11B2*, were labelled by NK1R antibodies (Fig. 2D, E). The NK1R is also detected in zona glomerulosa cells negative for *CYP11B2*, which have formerly been shown to express *CYP11B1*, a key enzyme for cortisol production (13). These immunohistochemical studies strongly suggested that tachykinins may modulate corticosteroidogenesis through activation of the NK1R. Consistently, SP and NKA dose-dependently stimulated aldosterone secretion from cultured adrenocortical cells (Fig. 3A, B). However, SP which is known to bind NK1R with higher affinity than NKA (5), was more potent to stimulate mineralocorticoid synthesis than NKA (Fig. 3B). By comparison, other tachykinins produced no or weak activation of mineralocorticoid production (Fig. 3B). The action of SP on aldosterone secretion was blunted by the NK1R antagonist aprepitant and mildly inhibited by GR159897, a NK2R antagonist (Fig. 3C). SP also stimulated cortisol release with similar efficacy but lower potency (Table S4), suggesting that the increase in plasma cortisol levels observed *in vivo* after SP injection in healthy volunteers mainly results from activation of pituitary corticotrophs, as also indicated by the concomitant rise of plasma ACTH concentrations (14). Globally, these data thus show that, in the human adrenal cortex, SP enhances steroidogenesis principally through activation of NK1R, its biological action being more potent to stimulate aldosterone than cortisol secretion. This effect likely involves locally released SP because the plasma levels of the peptide do not normally exceed 10^{-11} M (15), a concentration which has no action on corticosteroidogenesis *in vitro*.

It is now well established that the intracellular calcium signalling pathway is a major regulator of aldosterone synthesis, both in physiological and pathophysiological conditions (1). As a matter of fact, the stimulatory effect of angiotensin II on aldosterone secretion is mediated by an increase in cytosolic calcium concentration, and aldosterone-producing adenomas have been shown to harbour somatic mutations affecting membrane ion channels and pumps, which *in fine* trigger an influx of calcium in adrenocortical cells (16, 17). High concentration of SP only induced a small increase in cytosolic calcium concentration in cultured adrenocortical cells (Fig. 3D). This observation probably results from the fact that the short variant of NK1R, which appears to represent the major form of the receptor in human adrenocortical cells, only weakly activates the calcium transduction pathway (18). Conversely, NK1Rs is known to stimulate the ERK/MAP kinase pathway (18) which is involved in the aldosterone response to both AngII and other regulatory factors such as adipocyte secretory products (1, 19). In agreement with these results, our data show that SP-evoked aldosterone secretion is blocked by the ERK inhibitor PD0325901 and SP stimulates ERK phosphorylation in adrenocortical cells (Fig. 3E, F). We have then investigated the impact of SP on the expression of the genes involved in aldosterone synthesis (Fig. 3G). SP had no significant effect on the levels of *STAR* and *CYP11B2* transcripts but increased the expression of *HSD3B2* and *CYP21A2*, encoding 3 β HSD2 and 21-hydroxylase. Enhanced expression of 3 β HSD enzymes has been shown to result in aldosterone overproduction in mice (20) through an increase in substrates for aldosterone synthase. It appears thus as a reliable mechanism to mediate the impact of SP on zona glomerulosa steroidogenesis.

Complementary *in vivo* studies were necessary to determine whether SP actually exerts a physiological role in the regulation of aldosterone secretion. SP is known to stimulate emesis and NK1R antagonists, like aprepitant, are now commonly used in the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting (21). We have conducted a prospective placebo-controlled double blind study aimed at investigating the impact of aprepitant *per os* on corticosteroid levels in 20 healthy volunteers (Fig. S3). Aprepitant had no effect on urinary cortisol level nor on plasma cortisol and ACTH levels, both in basal conditions and in response to the insulin stimulation test which mimics the action of stress on the hypothalamo-pituitary adrenal axis (Fig. 4A-C and Fig. S4). It seems thus that the previously reported stimulatory effect of substance P on ACTH production (14) does not involve the NK1R. Conversely, aprepitant reduced global aldosterone production assessed by measurement of daily urinary aldosterone excretion (Fig. 4D, Table S5). The NK1R antagonist had no influence on plasma aldosterone levels in standing position but significantly reduced aldosteronemia in recumbency (Fig. 4E, F). Although renal arteries are known to receive substance P innervation in mammals (22), the impact of aprepitant on aldosterone

secretion in supine position was not mediated by the RAS, as shown by the lack of influence of the drug on plasma renin (Fig. 4G). Aprepitant also had no influence on kalemia (Fig. S5). These data thus indicate that the decrease in plasma aldosterone levels triggered by aprepitant likely results from inhibition of the direct stimulatory action of SP on adrenocortical cells. It is also conceivable that the NK1R antagonist, *via* its binding to the NK1 receptors expressed in adrenal arteriole walls, may inhibit the vasorelaxant action of SP and thus reduce the adrenal blood flow which is a major activator of corticosteroidogenesis (23). Otherwise, the duration of the treatment was probably too short to give rise to a compensatory increase in plasma renin levels and/or an elevation of kalemia in response to the diminution of plasma aldosterone concentration. The observation that antagonizing the adrenal NK1R leads to a decrease in recumbent plasma aldosterone levels shows that the NANC system exerts, *via* intraadrenal release of SP, a stimulatory tone on aldosterone secretion which is involved in the maintenance of basal mineralocorticoid production. From an evolutionary perspective, it is interesting to notice that the control of aldosterone production by tachykinins exists in amphibians and rodents (9, 24), its conservation among species being highly indicative of its physiological importance. This original mechanism of regulation seems to be complementary to the systemic RAS whose action is predominant in situations necessitating strong stimulation of aldosterone production, like adaptation to the upright position and salt deprivation.

References

1. N. G. Hattangady, L. O. Olala, W. B. Bollag, W. E. Rainey, *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 151–162 (2012).
2. M. Ehrhart-Bornstein, *et al.*, *Endocr. Rev.* **19**, 101–143 (1998).
3. A. B. Gilchrist, A. Leake, B. G. Charlton, *Acta Anat. (Basel)*. **146**, 31–35 (1993).
4. M. L. Nichols *et al.*, *Science*. **286**, 1558–1561 (1999).
5. M. S. Steinhoff, *et al.*, *Physiol. Rev.* **94**, 265–301 (2014).
6. J. K. Prague *et al.*, *Lancet*. **389**, 1809–1820 (2017).
7. R. Saito, Y. Takano, H.-O. Kamiya, *J. Pharmacol. Sci.* **91**, 87–94 (2003).
8. C. Heym, *et al.*, *Histochem. Cell Biol.* **104**, 233–243 (1995).
9. J. P. Hinson, L. A. Cameron, A. Purbrick, S. Kapas, *J. Endocrinol.* **140**, 91–96 (1994).
10. G. Mazzocchi, C. Macchi, L. K. Malendowicz, G. G. Nussdorfer, *Neuropeptides*. **29**, 53–58 (1995).
11. J. G. Widdicombe, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, S171–175 (1998).
12. N. M. Page *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6245–6250 (2003).
13. C. E. Gomez-Sanchez *et al.*, *Mol. Cell. Endocrinol.* **383**, 111–117 (2014).
14. V. Coiro *et al.*, *Neuroendocrinology*. **56**, 459–463 (1992).

15. S. Hubers, S. Wei, N. Brown, *Hypertension*. **68**, AP180 (2016).
16. M. Choi *et al.*, K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*. **331**, 768–772 (2011).
17. M.-C. Zennaro, S. Boulkroun, F. Fernandes-Rosa, *Endocr. Rev.* **38**, 516–537 (2017).
18. J.-P. Lai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12605–12610 (2008).
19. K. Vleugels *et al.*, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. **119**, 644–648 (2011).
20. M. Doi *et al.*, *Nat. Med.* **16**, 67–74 (2010).
21. P. J. Hesketh *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **35**, 3240–3261 (2017).
22. G. Bredy-Dobrev, *et al.*, *Biomed. Biochim. Acta*. **47**, 25–30 (1988).
23. J. P. Hinson, G. P. Vinson, S. Kapas, R. Teja, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**, 381–389 (1991).
24. F. Leboulenger *et al.*, *Endocrinology*. **133**, 1999–2008 (1993).

Acknowledgements

We thank Dr. Edgar-Yves Menguy and the staff at the Unité de Coordination des Prélèvements et Greffes (University Hospital of Rouen) for their help with organ donation. We are grateful to Pr Jacques Weber (Centre d'Investigations Cliniques 1404) for his collaboration and Dr Celzo Gomez-Sanchez for his generous gift of CYP11B2 antibodies. We thank Elodie Colas and Huguette Lemonnier for their skilful technical assistance. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, MSD France, and the Conseil Régional de Normandie.

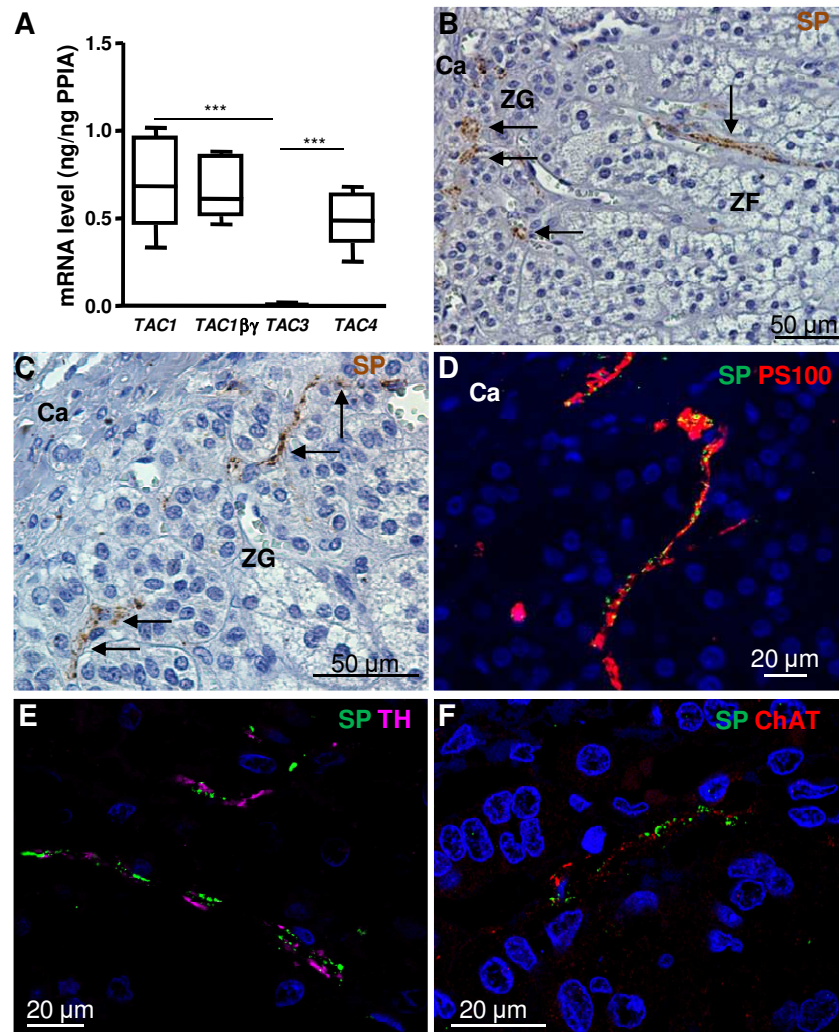
Fig. 1. Expression of substance P in the human adrenal gland. (A) Expression of *TAC1*, *TAC1βγ*, *TAC3* and *TAC4* mRNAs in adrenals. (B and C) Immunohistochemical detection of SP in the adrenal cortex. SP immunoreactivity is principally observed in nerve fibres (arrows) located under the capsule (Ca) in the vicinity of zona glomerulosa (ZG) cells and between cell cords of the zona fasciculata (ZF). (D) Double immunofluorescence detection of SP and the panneuronal marker protein S100 (PS100). SP immunoreactivity is discontinuously visualized in intracortical varicose nerve (PS100-positive) fibres. (E, F) Double immunofluorescence detection of SP and tyrosine hydroxylase (TH; E), a marker of adrenergic nerve fibres, or choline acetyltransferase (ChAT), a marker of cholinergic nerve fibres (F). SP antibodies label non-adrenergic non-cholinergic fibres.

Fig. 2. Expression of tachykinin receptors in the human adrenal gland. (A) Expression of *TACR1*, *TACR1s*, *TACR2* and *TACR3* mRNAs in normal human adrenals. (B) NK1 receptor (NK1R) immunoreactivity in the subcapsular region of the cortex. (C and D) Double immunofluorescence detection of SP and NK1R (C) or CYP11B2 (aldosterone synthase; D) in the zona glomerulosa. SP-positive varicose fibres are close to NK1R-positive and CYP11B2-positive

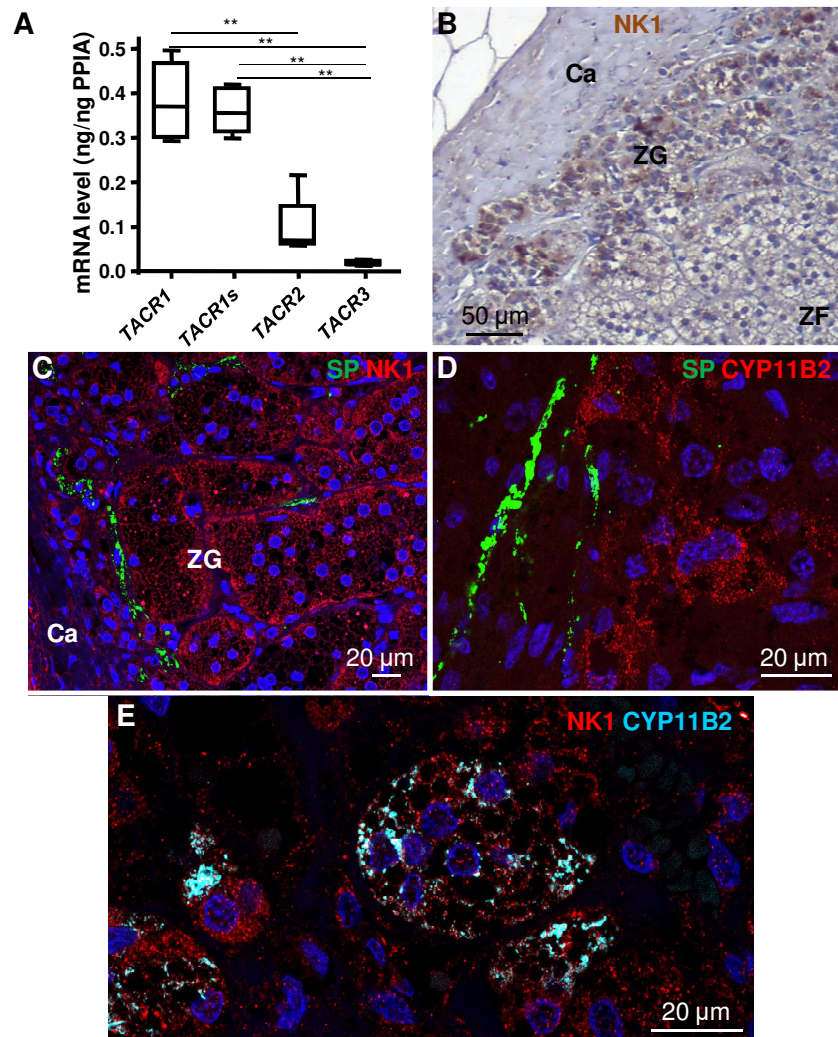
adrenocortical cells. (E) Double immunofluorescence detection of NK1R and CYP11B2 in the zona glomerulosa. CYP11B2-positive cells express the NK1R which is also detected in CYP11B2-negative cells.

Fig. 3. Effect of tachykinins on steroidogenesis and transduction pathways associated to tachykinin receptors in cultured adrenocortical cells. (A) Effect of SP on aldosterone (●) and cortisol (□) secretion, expressed as % of basal level (BL). (B) Effect of diverse tachykinins on aldosterone production. Neurokinin A (◇), endokinins AB (○), C (Δ), D (□) and hemokinin (▽) had no significant influence on aldosterone release. (C) Effect of SP on aldosterone secretion in the absence (●) or presence of the NK1R antagonist aprepitant (○) and the NK2R antagonist GR159897 (□). Aprepitant abolished whereas GR159897 mildly inhibited the aldosterone response to SP. (D) Effect of SP on cytosolic calcium concentrations measured by microfluorimetry. SP at high concentration only induced a slight increase in calcium concentrations in comparison with AngII (10^{-6} M) and ATP (10^{-5} M) which were used as controls. RFU; Relative Fluorescence Unit. (E) Western blot analysis of phospho-ERK (pERK) levels. SP (10^{-6} M) and AngII (10^{-6} M) significantly increased the level of pERK. (F) The ERK pathway inhibitor PD0325901 reduced SP-induced aldosterone secretion. (G) Effect of SP (10^{-6} M; ■) on the expression levels of genes encoding steroidogenic enzymes. SP significantly increased HSD3B2 and *CYP21A2* but did not modify *STAR* and *CYP11B2* mRNA levels. *, $p < 0.05$; ** $P < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

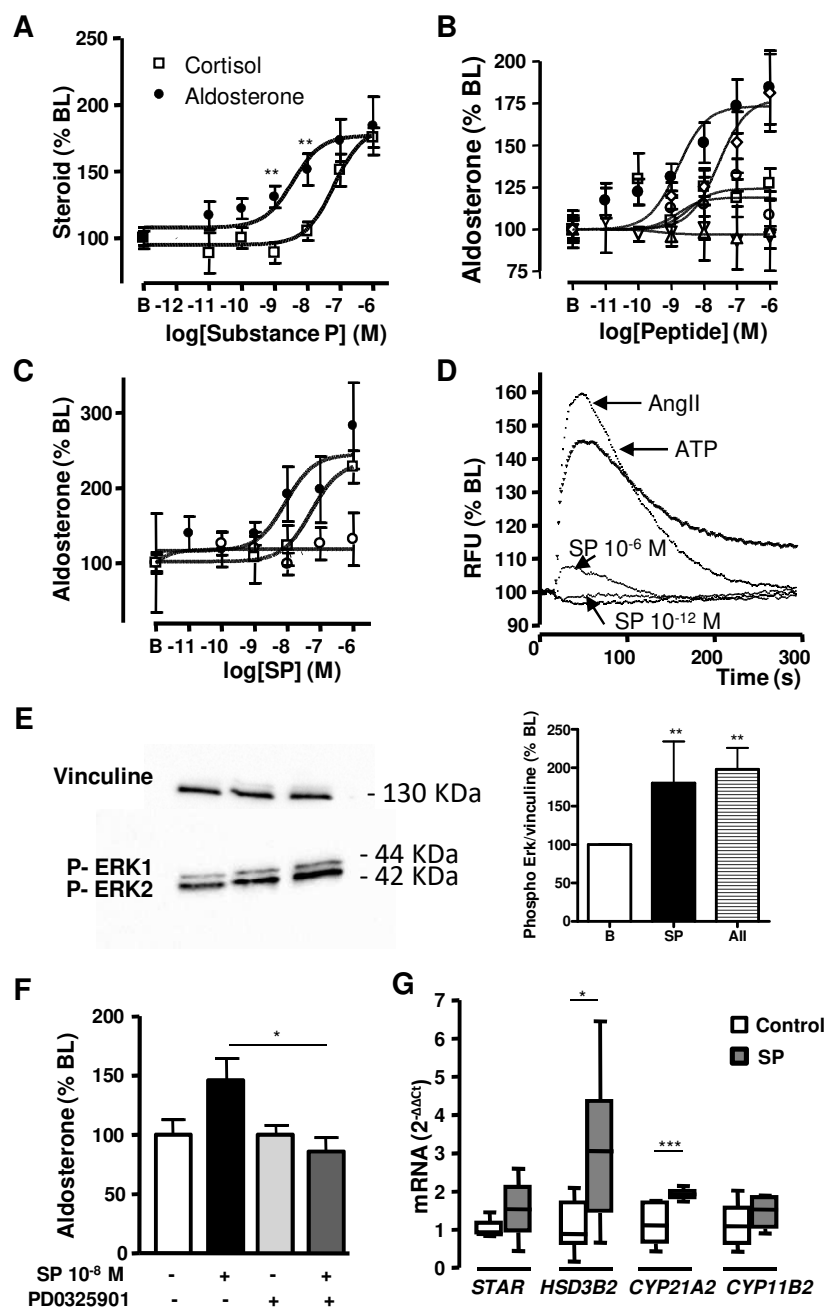
Fig. 4. Effect of oral administration of the NK1R antagonist aprepitant on corticosteroid concentrations in healthy volunteers. (A-C) In comparison with placebo (□), aprepitant (■) did not affect 24-h urinary cortisol excretion (A), basal (8 a.m.) plasma cortisol (B) and ACTH (C) levels (D4, 4th day of treatment). (D, E) Aprepitant reduced 24-h urine aldosterone (D), decreased supine plasma aldosterone levels at day 4 and day 5 (D5), whereas it had no effect on plasma aldosterone concentration in standing position (E). (F, G) Aprepitant reduced the plasma aldosterone to cortisol ratio (F) but did not impact plasma renin levels in recumbency (G). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.



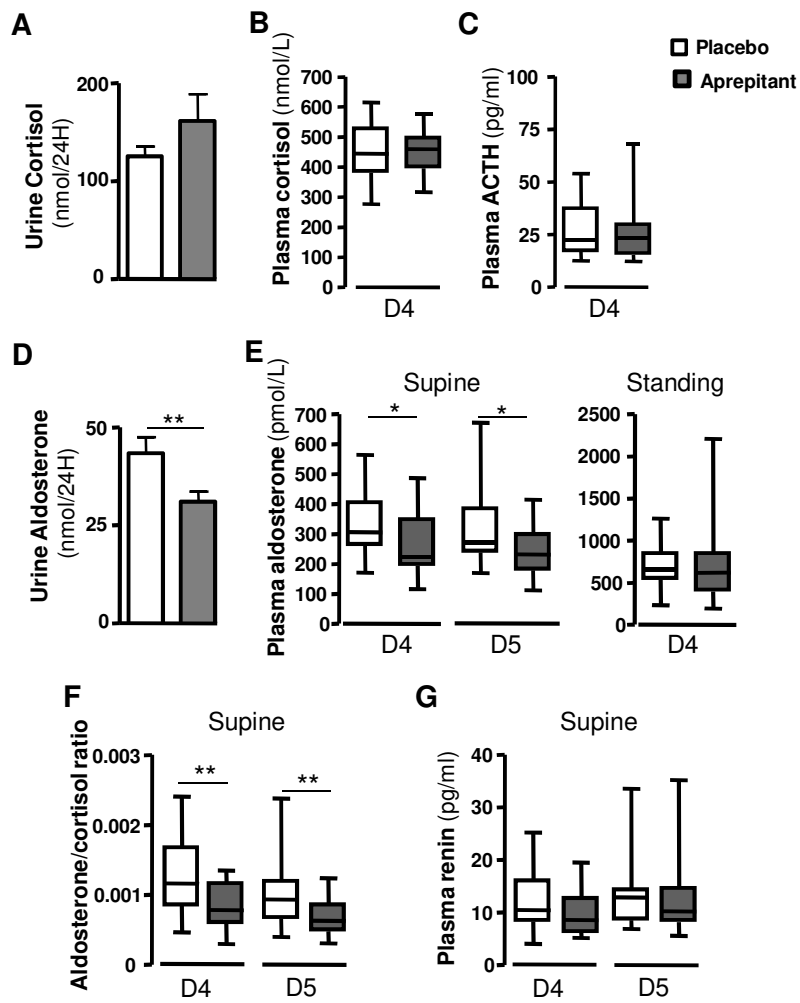
Wils et al
Figure 1



Wils et al
Figure 2



Wils et al
Figure 3



Wils et al
Figure 4

Supplementary

Materials and methods

Data

Tables S1 to S5

Figs. S1 to S8

References (1-33)

Materials and methods

Tissues

Adrenal glands were obtained from patients undergoing expanded nephrectomy for kidney cancer and brain-dead organ donors. Adrenals were collected at surgery and immediately dissected by the pathologist. Adrenal explants were immersed in culture medium until cell dissociation, frozen for RT-PCR analysis, or fixed in formalin for histological study. The protocol of collection of the tissues and the experimental procedures were approved by the French National Biomedicine Agency (Agence de Biomédecine) and the regional ethics committee. Written informed consents were obtained from all subjects or patients' closest relatives.

Cell culture

Fresh adrenal samples were incubated for 45 min at 37 °C in cell dissociation solution containing collagenase type 1A (60 mg/ml; Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and desoxyribonuclease 1 type 4 (4 mg/ml; Sigma–Aldrich) dissolved in DMEM culture medium supplemented with 1% antibiotic–antimycotic solution (Gibco, Life Technologies, ThermoFisher Scientific; Illkirch; France). Dispersed adrenocortical cells were cultured at a density of 10⁶ cells/ml in culture medium (50% DMEM, 50% Ham–F12; Gibco) supplemented with 1% antibiotic–antimycotic solution, 1% insulin–transferrin–selenium solution (Gibco) and 5% fetal calf serum (Sigma–Aldrich). Cells were placed on 6-, 24- or 96-well culture plates (Corning, Costar, ThermoFisher Scientific) at 37 °C in a 5% CO₂–95% air atmosphere with 100% relative humidity. The culture medium was changed 24 h after plating for reducing fetal calf serum to 1% and to remove non-adherent chromaffin cells.

Real-time RT-PCR

Total RNA from adrenal glands derived from expanded nephrectomy or adrenocortical cell cultured on 6-well plates were extracted by using Tri Reagent (Sigma–Aldrich) and purified on Nucleospin RNAII (Macherey–Nagel, Hoerd, France). Human adrenal, spinal cord, small intestine, placenta polyA mRNAs (Clontech, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France), as well as ARN extracted

from LAD2 and Caco2 cell lines [given by Dr. D Metcalfe (National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Institutes of Health, Bethesda, MD) and Dr Moïse Coeffier (Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, Rouen, France), respectively] were also used as control specimen. Purified RNA and polyA mRNAs were converted into cDNA by using ImProm-II RT System (Promega). Real-time PCR amplifications were performed using SYBR Green I Master Mix (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) in a QuantStudio 3 System (ThermoFisher) with specific primers (Table S1). Samples were analyzed in duplicates. Quantification of cDNAs in each adrenal sample was normalized to *PPIA* (cyclophilin) by using standard curves established by using dilution series of cDNAs derived from polyA mRNAs. For cell cultures, gene expression was normalized to *PPIA* by using the average ΔCt value of the basal culture condition ($\Delta\Delta Ct$). The final fold expression changes were calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Immunohistology

Immunohistochemical and immunohistofluorescence studies were performed on formalin fixed and deparaffinized tissue sections. Sections were heated at 95 °C for 20 min in 10 mM citrate buffer (pH 6) and/or Tris EDTA (pH 9) for antigen retrieval. For immunohistochemical experiments, sections were then treated with peroxidase blocking reagent (Dako Corporation, Les Ulis, France) and successively incubated for 1 hour at room temperature with primary antibodies diluted in Zymed (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and anti-immunoglobulin streptavidin–biotin complex coupled to peroxidase (Table S2). Immunoreactivities were revealed with diaminobenzidine (Dako Corporation). The tissue sections were counterstained with hematoxylin and examined on an Eclipse E600D microscope (Nikon). For immunohistofluorescence experiments, tissue sections were treated with normal donkey serum and then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in PBS added with bovine serum albumin (1 mg/ml) and Triton X-100 (0.1%). Immunoreactivities were revealed with fluorescent-conjugated anti-immunoglobulin antibodies (Table S2). Nuclei were visualized by DAPI staining (1 µg/ml; Sigma-Aldrich). Fluorescence was examined on a TCS SP8 MP confocal microscope (Leica Corp., Heidelberg, Germany). Specificity controls of immunoreactions were performed by omitting the primary or secondary antibodies. All images were obtained on PRIMACEN, the Cell Imaging Platform of Normandie, University of Rouen Normandie.

Hormone secretion

Adrenocortical cells cultured on 24-well plates were incubated with fresh DMEM (control experiments) or DMEM with different concentrations of tachykinin peptides including substance P,

neurokinin A, or hemokinin obtained from Sigma-Aldrich, and endokinins A/B, C, D (Biorbyt; Cambridge, United Kingdom). Substance P was applied in the absence or presence of neurokinin receptor antagonists, aprepitant (10^{-9} M; Selleck Chemicals; Houston, Etats-Unis) and GR159897 (10^{-9} M; Tocris Bioscience; Bio-Techne Europe, Lille, France) or the MEK inhibitor PD0325901 (10^{-8} M; Sigma-Aldrich). Incubation experiments were conducted in quadruplicate at 37 °C for 24 h. Cell culture supernatants were collected and stored at -20°C until hormone assay. Aldosterone and cortisol concentrations in culture supernatants were measured using radioimmunoassay procedure (RIA) using specific antibodies (25) and tritiated steroid hormones (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France). RIA sensitivities were 80 pg/mL and 150 pg/mL for aldosterone and cortisol, respectively. Cross-reactivity of aldosterone antibodies with corticosterone, cortisol, testosterone, and $\Delta 4$ -androstenedione were less than 0.001 %. Cross-reactivity of cortisol antibodies was <0.001% for aldosterone, <0.004% for progesterone and 17-hydroxyprogesterone, <0.01% for desoxycorticosterone, <0.3% for cortisosterone, and <5% for desoxycortisol.

Cytosolic calcium concentration

Intracellular Ca^{2+} concentrations were measured on adrenocortical cells cultured on 96-well black plates with clear bottom by using a scanning fluorometer Flexstation III (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) and the SoftMax Pro software on PRIMACEN. Before recording, cultured cells were loaded with FLIPR Calcium 5 Assay Kit (Molecular Devices) during 1 h at 37 °C. The wavelengths of excitation and emission were 485 nm and 525 nm, respectively. Substance P was added at final concentrations ranging from 10^{-12} to 10^{-6} M. Angiotensin II (Sigma-Aldrich) and adenosine triphosphate (ATP; Sigma-Aldrich) were used as positive controls. Incubation experiments were conducted in quadruplicate.

Western blot

Adrenocortical cells cultured on 6-well plates were incubated with fresh DMEM (control experiments) or DMEM supplemented with substance P (10^{-6} M) for 30 min or 60 min at 37 °C. Substance P was applied in the absence or presence of PD0325901 (10^{-8} M). Angiotensin II (10^{-6} M) was used as positive control. Incubation experiments were conducted in duplicate. After incubation periods, cultured cells were rinsed once in PBS at 37 °C and homogenized in radio immuno-precipitation assay (RIPA) buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with proteinase inhibitors (Sigma-Aldrich) and phosphatase inhibitors mixture 1 and 2 (Sigma-Aldrich). After centrifugation, the total protein concentration was determined using Bradford protein assay (Bio-Rad; Marnes-la-Coquette, France). Twenty nanograms of total proteins were diluted in Laemmli buffer (Bio-Rad), separated on mini-protean TGX stain free gels 12% (Bio-Rad) and transferred onto nitrocellulose membrane (Transfert pack, Bio-Rad) by using a Transblot turbo blotting system

(Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% non-fat dry milk in PBS-Tween. They were incubated with primary antibodies overnight at 4°C, and then with HRP-conjugated secondary antibodies for 90 min at room temperature (Table S3). Immunoreactivities were revealed by chemiluminescence with clarity Western ECL substrate (Bio-Rad) and visualized on ChemiDoc Imaging Systems (Bio-Rad). Signals were quantified with Image lab (Bio-Rad). Expression was normalized to vinculin.

Clinical trial

Protocol design

Twenty healthy male volunteers, aged 21.3 ± 1.7 years, were enrolled in a prospective proof-of-concept, double blind, cross-over, placebo-controlled study after written informed consent (ClinicalTrial identifier: NCT00977223). The experimental protocol was in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the Institutional Review Board of the University Hospital of Rouen and the regional ethics committee (Comité de Protection des Personnes de Haute-Normandie). The whole study was performed in the Centre for Clinical Investigation of the University Hospital of Rouen (CIC INSERM 1404). Non inclusion criteria were signs or history of liver, kidney, cardiovascular (including hypertension and orthostatic hypotension) and neurological dysfunction, and BMI > 27 kg/m². Mean body mass index was 22.4 ± 1.7 kg/m². None of them had taken any medications prior to the study. Clinical examination, including measurements of blood pressure and heart rate, blood count, and plasma electrolyte levels, were normal. Aprepitant (125 mg at Day (D) 1 and 80 mg for D2-D7) and placebo were given orally at 08.00 AM to all volunteers by the investigators in a double blind fashion during two 7-day treatment periods performed in a random order at 2-week interval (Fig. S3). The aprepitant and placebo capsules were of identical appearance. All subjects maintained their regular diet during the study as confirmed by monitoring of natriuresis which remained globally stable. Such protocol of administration allows obtaining from D3 a plasma aprepitant concentration of 2.5 to 3 µM (26), a level much higher than the IC₅₀ of the molecule to the recombinant human NK1R (*i.e.* 0.1 nM) (27). During the 2 treatment periods, the subjects underwent a series of pharmacological and physiological tests including upright and supine positions (test 1) at D4, a metoclopramide (10 mg iv; Primpéran, Synthélabo Laboratories, Meudon-la-Forêt, France) stimulation test (test 2) at D5, an insulin tolerance test (0,1 U/kg iv; Actrapid, Novo Nordisk, Courbevoie, France) (test 3) at D7. For all tests, the impact of the procedures on the adrenocortical function was evaluated by measuring plasma aldosterone, cortisol, renin, ACTH and electrolyte levels. For test 1, blood samples were obtained at 8 AM after 2 h of upright position and another two-hour of recumbency (10 AM), for test 2 before (t0; 9 AM after one

hour of recumbency) and every 30 min for 2 h after administration of metoclopramide, for test 3 before (t0; 9 AM after one hour of recumbency) and every 15 min for 90 min after injection of insulin. The effect of aprepitant on basal and stimulated corticosteroid secretion was appreciated by evaluating the variations of plasma aldosterone levels (primary endpoint) and cortisol, renin, ACTH and electrolyte concentrations (secondary endpoints) in comparison with placebo regimen. The determination of plasma cortisol levels also allowed calculation of the aldosterone/cortisol ratio, which facilitates the interpretation of plasma aldosterone fluctuations by excluding the variations of mineralocorticoid secretion related to the nycthemeral rhythm of ACTH. Assessment of basal production of aldosterone and cortisol has also been carried out by measurement of 24-h urinary aldosterone (primary endpoint) and free cortisol (secondary endpoint) from D3 to D4, before the beginning of stimulation tests. The impact of aprepitant treatment on hydromineral homeostasis and cardiovascular status has been evaluated by 24-hr ambulatory blood pressure monitoring at D3/D4 (secondary endpoint).

Hormone assays

Plasma and urine aldosterone, plasma ACTH, cortisol, and renin levels were measured by immunoassays using respectively the following commercial kits: Immunotech RIA Aldosterone (Marseille, France), Immulite 2500 ACTH and cortisol (Siemens, Villepinte, France), Cisbio Renin III Generation (Saclay, France). For determination of urine aldosterone and cortisol levels, immunoassays were preceded by a step of acid hydrolysis and steroid extraction by dichloromethane, respectively. Intra- and inter-assay variations were <10% for ACTH, cortisol, aldosterone and renin.

Statistical analysis

Results are expressed as median and InterQuartile Range (IQR) or mean $\pm$ SEM. Relative changes were described as percentages of basal level. were analyzed using the Prism 4 program (GraphPad Software, Inc.). Statistical significance was assessed by non-parametric Mann Whitney test or Bonferroni test after one-way ANOVA for data obtained *in vitro*, and non-parametric Wilcoxon matched pairs test for data obtained *in vivo*. The amounts of aldosterone and renin released in response to metoclopramide stimulation test were appreciated by evaluating the area under the curve (AUC) with the Prism 4 software. Statistical significance between kinetics and dose-response curves were analyzed by Two-way ANOVA. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Data

We have previously demonstrated that serotonin (5-HT), released by intraadrenal mast cells, stimulates aldosterone secretion through activation of the 5-HT₄ receptors (5-HT₄R) expressed by zona glomerulosa cells (28, 29). In this respect, administration of agonists of 5-HT₄R, such as zacopride, cisapride and metoclopramide, have been reported to increase plasma aldosterone concentration in healthy volunteers (30-32). In the gastrointestinal tract, it has been shown that SP is able to mediate the prokinetic action of 5-HT in response to activation of 5-HT₄R (33). These observations suggested that the action of 5-HT on mineralocorticoid function may be partly indirect *via* local release of SP. In order to explore this hypothesis, a pharmacological test was conducted with metoclopramide (10 mg iv), a partial agonist of 5-HT₄R, in combination with aprepitant. Surprisingly, metoclopramide-induced aldosterone secretion, expressed as relative variation to basal level, was significantly enhanced by aprepitant ($p=0.002$; two-way ANOVA, Fig. S5). These data allow excluding an indirect action of the 5-HT₄R agonist through SP nerve fibres. Conversely, the potentiation of the aldosterone response to metoclopramide by the NK₁R antagonist appeared to be the consequence of an increase in renin production which was not observed under stimulation by metoclopramide alone, as previously reported (32). It is conceivable that the elevation of plasma renin concentrations may result from an impact of the metoclopramide/aprepitant combination on the intrarenal blood flow.

References

1. N. G. Hattangady, L. O. Olala, W. B. Bollag, W. E. Rainey, Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 151–162 (2012).
2. M. Ehrhart-Bornstein, J. P. Hinson, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum, G. P. Vinson, Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr. Rev.* **19**, 101–143 (1998).
3. A. B. Gilchrist, A. Leake, B. G. Charlton, Innervation of the human adrenal cortex: simultaneous visualisation using acetylcholinesterase histochemistry and dopamine beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Acta Anat. (Basel)*. **146**, 31–35 (1993).
4. M. L. Nichols *et al.*, Transmission of chronic nociception by spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*. **286**, 1558–1561 (1999).
5. M. S. Steinhoff, B. von Mentzer, P. Geppetti, C. Pothoulakis, N. W. Bunnett, Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol. Rev.* **94**, 265–301 (2014).
6. J. K. Prague *et al.*, Neurokinin 3 receptor antagonism as a novel treatment for menopausal hot flashes: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. **389**, 1809–1820 (2017).
7. R. Saito, Y. Takano, H.-O. Kamiya, Roles of substance P and NK(1) receptor in the brainstem in the development of emesis. *J. Pharmacol. Sci.* **91**, 87–94 (2003).
8. C. Heym, B. Braun, Y. Shuyi, L. Klimaschewski, M. Colombo-Benkmann, Immunohistochemical correlation of human adrenal nerve fibres and thoracic dorsal root neurons with special reference to substance P. *Histochem. Cell Biol.* **104**, 233–243 (1995).
9. J. P. Hinson, L. A. Cameron, A. Purbrick, S. Kapas, The role of neuropeptides in the regulation of adrenal zona glomerulosa function: effects of substance P, neuropeptide Y, neurotensin, Met-enkephalin, Leu-enkephalin and corticotrophin-releasing hormone on aldosterone secretion in the intact perfused rat adrenal. *J. Endocrinol.* **140**, 91–96 (1994).
10. G. Mazzocchi, C. Macchi, L. K. Malendowicz, G. G. Nussdorfer, Evidence that endogenous substance-P (SP) is involved in the maintenance of the growth and steroidogenic capacity of rat adrenal zona glomerulosa. *Neuropeptides*. **29**, 53–58 (1995).
11. J. G. Widdicombe, Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, S171–175 (1998).
12. N. M. Page *et al.*, Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 6245–6250 (2003).
13. C. E. Gomez-Sanchez *et al.*, Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol. Cell. Endocrinol.* **383**, 111–117 (2014).
14. V. Coiro *et al.*, Stimulation of ACTH/cortisol by intravenously infused substance P in normal men: inhibition by sodium valproate. *Neuroendocrinology*. **56**, 459–463 (1992).
15. S. Hubers, S. Wei, N. Brown, Quantification of substance P in human blood by mass spectroscopy. *Hypertension*. **68**, AP180 (2016).
16. M. Choi *et al.*, K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*. **331**, 768–772 (2011).
17. M.-C. Zennaro, S. Boulkroun, F. Fernandes-Rosa, Genetic causes of functional adrenocortical adenomas. *Endocr. Rev.* **38**, 516–537 (2017).

18. J.-P. Lai *et al.*, Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 12605–12610 (2008).
19. K. Vleugels *et al.*, ERK1/2 MAPKs and Wnt signaling pathways are independently involved in adipocytokine-mediated aldosterone secretion. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.* **119**, 644–648 (2011).
20. M. Doi *et al.*, Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat. Med.* **16**, 67–74 (2010).
21. P. J. Hesketh *et al.*, Antiemetics: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J. Clin. Oncol.* **35**, 3240–3261 (2017).
22. G. Bredy-Dobrev, D. Zafirov, K. Nieber, P. Oehme, M. Papasova, Effects of substance P on isolated preparations from rabbit and rat renal arteries. *Biomed. Biochim. Acta.* **47**, 25–30 (1988).
23. J. P. Hinson, G. P. Vinson, S. Kapas, R. Teja, The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **40**, 381–389 (1991).
24. F. Le Boulenger *et al.*, Immunohistochemical distribution, biochemical characterization, and biological action of tachykinins in the frog adrenal gland. *Endocrinology.* **133**, 1999–2008 (1993).
25. H. Lefebvre *et al.*, Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin₄ receptor subtype. *Neuroscience.* **47**, 999–1007 (1992).
26. A. K. Majumdar *et al.*, Pharmacokinetics of aprepitant after single and multiple oral doses in healthy volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **46**, 291–300 (2006).
27. M. S. Steinhoff, B. von Mentzer, P. Geppetti, C. Pothoulakis, N. W. Bunnett, Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol. Rev.* **94**, 265–301 (2014).
28. H. Lefebvre *et al.*, Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 5001–5007 (2001).
29. C. Duparc *et al.*, Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E550–560 (2015).
30. H. Lefebvre *et al.*, Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **77**, 1662–1666 (1993).
31. H. Lefebvre *et al.*, The serotonin-4 receptor agonist cisapride and angiotensin-II exert additive effects on aldosterone secretion in normal man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 504–507 (1995).
32. J.H. Pratt, A. Ganguly, C.A. Parkinson, M.H. Weinberger, Stimulation of aldosterone secretion by metoclopramide in humans: apparent independence of renal and pituitary mediation. *Metabolism* **30**, 129–134 (1981).
33. E. P. Bouras, M. Camilleri, D. D. Burton, S. McKinzie, Selective stimulation of colonic transit by the benzofuran 5HT₄ agonist, prucalopride, in healthy humans. *Gut.* **44**, 682–686 (1999).

Table S1: Sequences and GenBank accession numbers of primers used for RT-PCR

Gene	Primer	Sequence primer (5'-3')	Accession number	Product size (bp)
<i>PPIA</i>	F	ATGGCACTGGTGGCAAGTCC	NM_001300981.1	241
	R	TTGCCATTCCTGGACCCAAA	NM_021130.4	
<i>TAC1</i>	F	GACTGTCCGTCGCAAAATCC	<u>NM_013996.2</u>	150
	R	CCTCCTTGATCTGGTCGCTG	<u>NM_013997.2</u>	
			<u>NM_013998.2</u>	
			<u>NM_003182.2</u>	
<i>TAC3</i>	F	CTAGATCCCCTCCACTCGGT	<u>NM_001178054.1</u>	227
	R	TCCTCCTGTGGCTCCTTACA	<u>NM_013251.3</u>	
<i>TAC4</i>	F	CACTGAAGCAGAGACCTGGG	NM_170685.2	101
	R	TCCCCATCAGCCCAAAGAAC	NM_001077503.1	
			NM_001077504.1	
			NM_001077505.1	
			NM_001077506.1	
<i>TACR1</i>	F	CCCGTGCTGGTGATTGGCTAT	<u>NM_015727.2</u>	124
	R	TTTTGACCACCTTGCGCTTG	<u>NM_001058.3</u>	
<i>TACR1s</i>	F	TGAGCTCCACCATGTACAACC	NM_015727.2	165
	R	CCCACTTGTCCTCTTGCTCT		
<i>TACR1l</i>	F	AAAGTCAGCCGCCTGGAGAC	<u>NM_001058.3</u>	139
	R	TCATGGTCTTGGAGTCACTTCG		
<i>TACR2</i>	F	GCTTCTACTCCACCGTCACCAT	<u>NM_001057.2</u>	148
	R	GCTACAAACATCACCGCGAGC		
<i>TACR3</i>	F	TCATAGCGAGTGGTACTTTGGC	<u>NM_001059.2</u>	147
	R	GACAGTCTGGGTTTCAAGGGA		
<i>STAR</i>	F	GGCTACTCAGCATCGACCTC	NM_000349.2	250
	R	CATCCCCTGTGTCACCAGATG		
<i>HSD3B2</i>	F	TTGGACAAGGCCTTCAGACA	NM_000198.3	150
	R	ACAGGCGGTGTGGATGAC	NM_001166120.1	
<i>CYP21A2</i>	F	GAGTTCTGTGAGCGCA	<u>NM_000500.7</u>	201
	R	CACGTCCACAATTTGGAT	NM_001128590.3	
<i>CYP11B2</i>	F	TCCAGGTGTGTTCAGTAGTTCC	NM_000498.3	146
	R	GAAGCCATCTCTGAGGTCTGTG		

Table S2: Antibodies used for immunohistochemistry or immunohistofluorescence studies

Antibody	Source	Host	Dilution	Antigen retrieval
Aldosterone Synthase	Dr Gomez-Sanchez (13)	mouse	1/100	Tris EDTA pH 9
Substance P	MM-0001-1 Interchim	rat	1/25	Citrate pH 6
NK1 receptor	T5950 Sigma-Aldrich	rabbit	1/200	Citrate pH 6
Protein S100	20311 Dako Corporation	rabbit	1/300	Citrate pH 6
Tyrosine hydroxylase	MAB 318, clone LNC1 Merck Millipore	mouse	1/100	Citrate pH 6
Choline acetyl transferase	AB144P Merck Millipore	goat	1/200	Citrate pH 6
Anti-rat IgG/HRP	P045001 Dako	rabbit	1/100	
EnVision rabbit IgG/HRP	K4002 Dako	goat	Ready to use	
Alexa fluor 488 anti-rat IgG	A-21208 Life Technologies	donkey	1/300	
Alexa fluor 594 anti-rabbit IgG	A-21207 Life Technologies	donkey	1/300	
Alexa fluor 594 anti-mouse IgG	A-21203 Life Technologies	donkey	1/300	
Alexa fluor 594 anti-goat IgG	A-11058 Life Technologies	donkey	1/300	
Alexa fluor 647 anti-mouse IgG	FP-SC4110 Interchim	donkey	1/300	

Table S3: Antibodies used for western blot analyses

Antibodies	Source	Host	Molecular weight	Dilution
p44/42 MAPK (ERK1/2)	M5670	rabbit	42 & 44 kDa	1/40,000
phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	4370S Ozyme	rabbit	42 & 44 kDa	1/1000
Vinculine	MCA465GA Biorad	mouse	130 kDa	1/1000
anti-rabbit IgG, (H1L), peroxydase conjugated	31460 Pierce	goat		1/10000
anti-mouse IgG, (H1L), peroxydase conjugated	31430 Pierce	goat		1/10000

Table S4 : Effect of tachykinins on steroid production by cultured human adrenocortical cells

	Maximum efficacy [Emax]	Half maximal effective concentration [EC50]
Cortisol		
SP	182 ± 2 %	62.3 ± 0.3 nM
Aldosterone		
SP	245 ± 3%	3.6 ± 0.3 nM
SP + Aprepitant	118 ± 1%	NA
SP + GR159897 (10 ⁻⁹ M)	234 ± 1%	52.3 ± 0.3 nM
Neurokinin A	177 ± 2%	72.8 ± 0.4 nM
Endokinin A/B	119 ± 1%	55 ± 0.3 nM
Endokinin C	NA	NA
Endokinin D	124 ± 2%	3.7 ± 0.4 nM
Hemokinin	NA	NA

NA, Not applicable

Table S5: Clinical characteristics of healthy volunteers

Healthy volunteers	22
Male	22
Age (year)	21.3±1.7
Body mass index (kg/m ²)	22.4±1.7
Systolic blood pressure (mmHg)	127.9±11.3
Diastolic blood pressure (mmHg)	69.3±7.4
Cardiac frequency (bpm)	70±11

Healthy volunteers	Age (year)	Body mass index (kg/m ²)	Systolic blood pressure (mmHg)	Diastolic blood pressure (mmHg)	Cardiac frequency (bpm)
1	22	24,3	130	69	88
3	20	21,2	142	58	63
4	25	20,3	127	77	72
5	22	20,5	118	66	59
6	22	22,6	144	76	62
7	23	23,1	132	73	62
8	20	20,2	126	65	82
9	24	23,8	151	65	79
10	19	21,8	136	70	72
11	20	24,6	115	62	60
13	19	21,4	122	65	101
14	20	22,4	129	75	67
15	22	21,1	134	74	64
16	21	19,6	122	70	69
17	22	24,6	111	55	62
18	21	25,3	129	66	65
19	20	24,9	138	83	63
20	21	22,8	106	71	80
21	24	22,2	119	63	55
22	20	21,6	128	83	78

Substance P

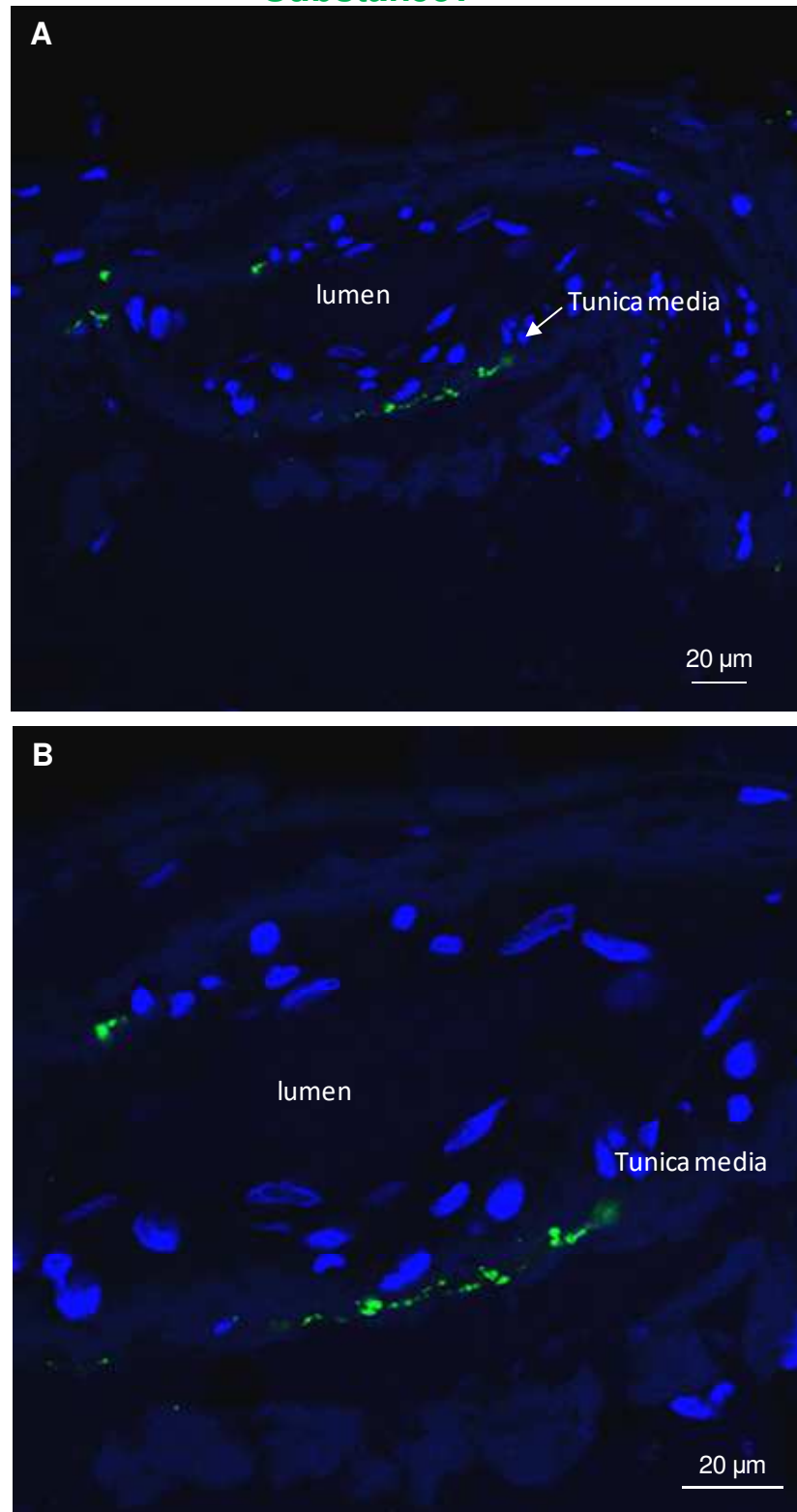
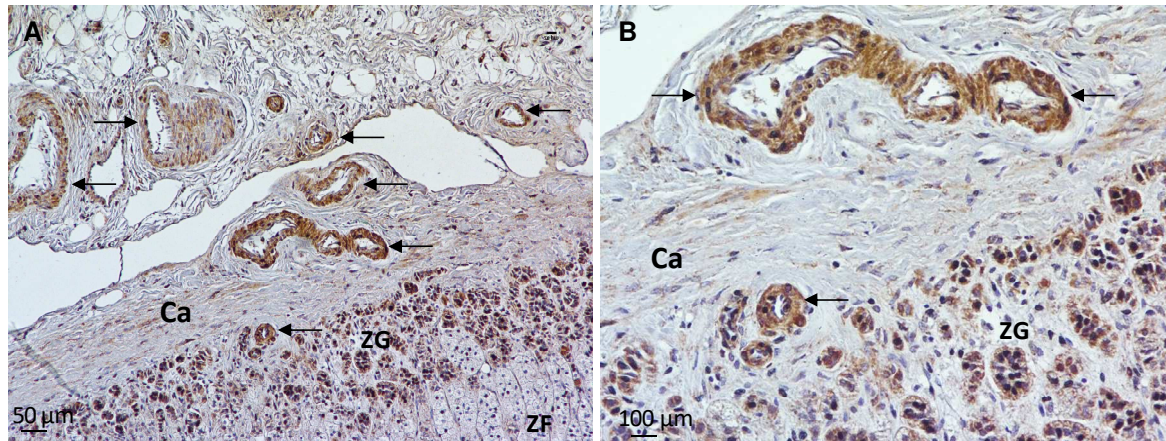


Fig. S1. Substance P in human adrenal arterioles. (A, B) Immunofluorescence detection of SP in the wall of arterioles irrigating the adrenal cortex. SP immunoreactivity is observed in nerve fibre varicosities located in the *tunica media* at low (A) and high (B) magnifications.

NK1 receptor



NK1 receptor

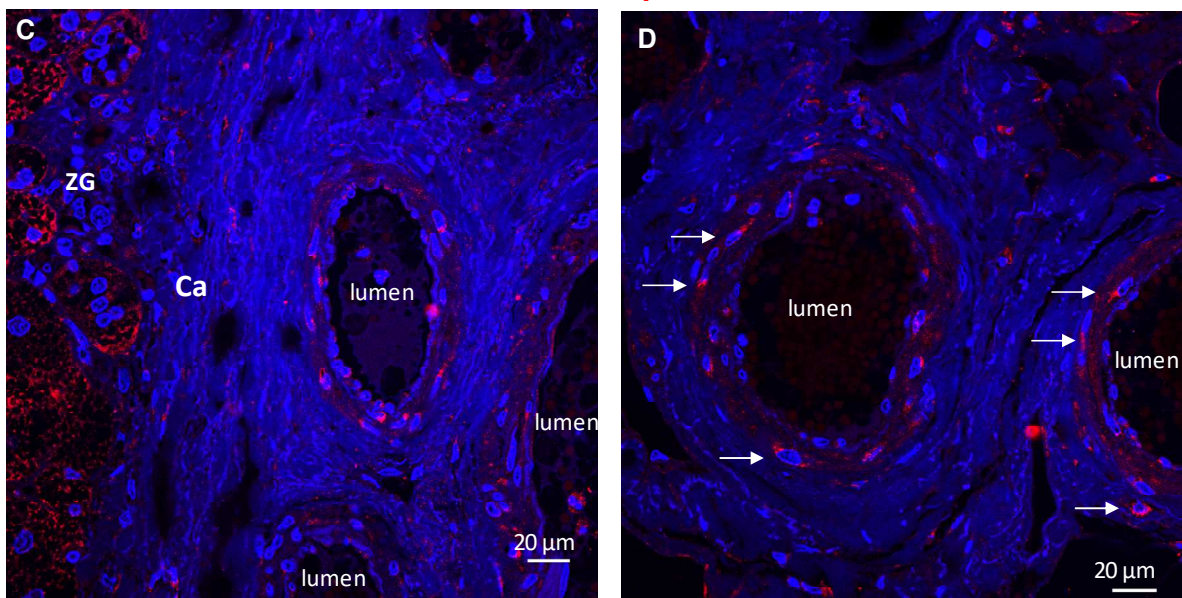


Fig. S2. NK1 receptor (NK1R) in human adrenal arterioles and cortex. (A-D) Immunohistochemical (A, B) and immunofluorescence (C, D) detection of NK1R immunoreactivity in the wall of arterioles irrigating the adrenal gland, and zona glomerulosa (ZG) in the subcapsular region of the cortex at low (A, C) and high (B, D) magnifications. Black arrows indicate NK1R-positive blood vessels. White arrows indicate NK1R-positive muscle cells in tunica media. Ca, capsule; ZF, zona fasciculata.

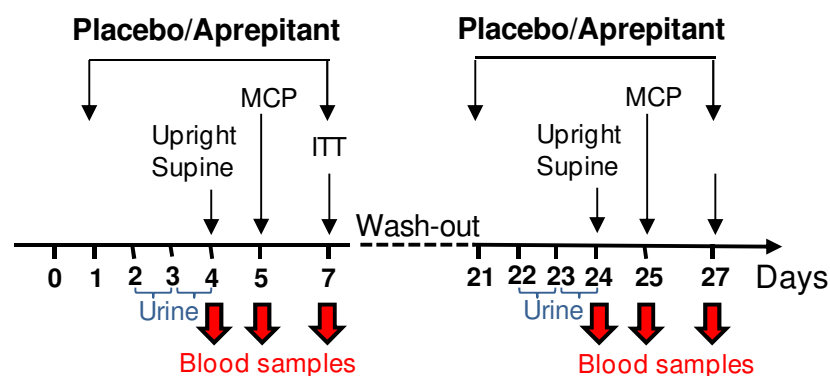


Fig. S3. Simplified flowchart of the clinical trial testing the effect of oral administration of the NK1R antagonist aprepitant on corticosteroid production in healthy volunteers. Healthy male volunteers underwent two one-week treatment (placebo and/or aprepitant in a random order) periods separated by a two-week wash-out period. Aprepitant was administered at the doses of 125 mg at day 1 and 80 mg per day for the six other days. Subjects underwent a series of tests including upright and supine positions at day 4 (D4) and D24, metoclopramide (MCP; 10 mg iv) stimulation tests at D5 and 25, and insulin tolerance tests (ITT; 0,1 U/kg iv) at D7 and D27. Blue braces indicate 24-hr urine collection. Red arrows indicate blood samples for analysis.

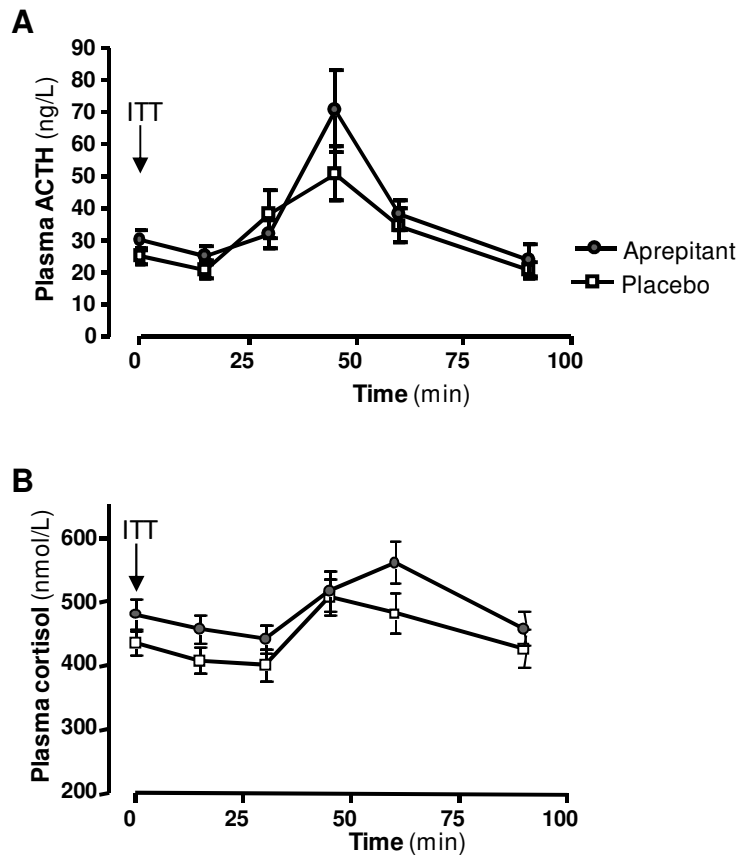


Fig. S4. Lack of effect of aprepitant on plasma ACTH and cortisol responses to insulin tolerance tests. (A, B) Kinetics of plasma ACTH (A) and cortisol (B) responses to insulin tolerance tests (ITT; 0,1 U/kg iv) in healthy volunteers under placebo (□) or aprepitant (●) at D7. Aprepitant did not modify the effect of insulin injections on ACTH and cortisol plasma levels ($p=0.4$ and $p=0.1$, respectively; Two-way ANOVA).

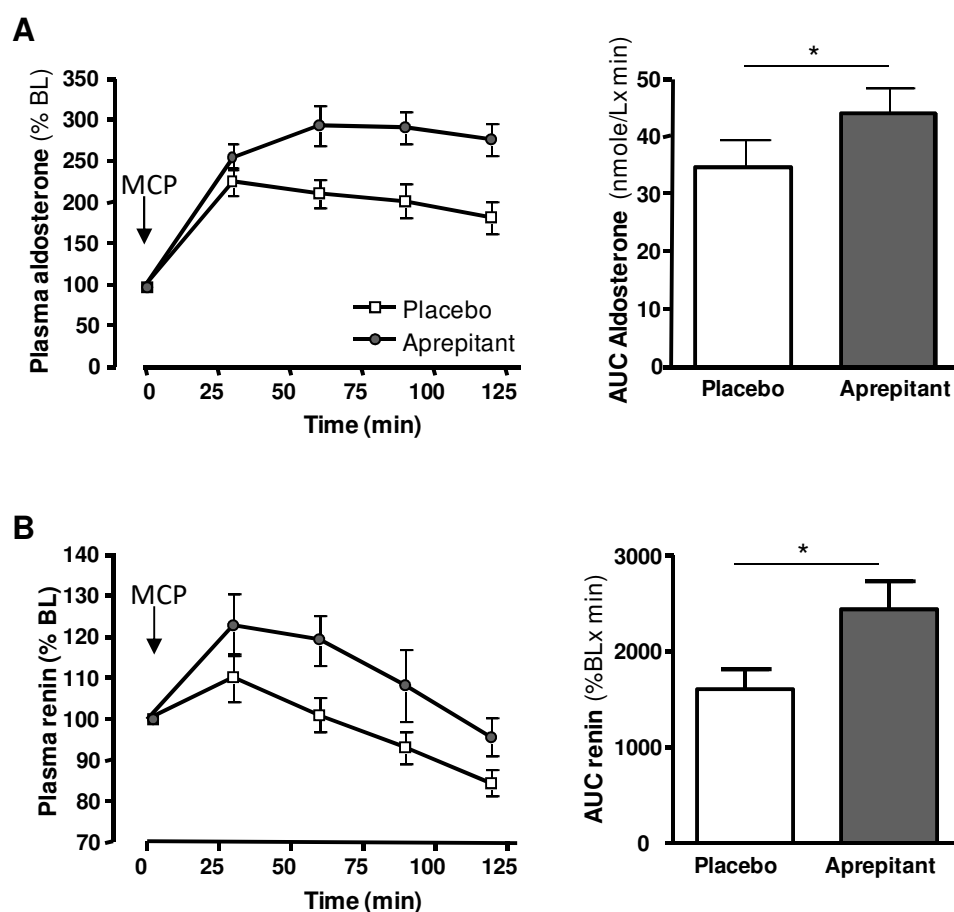


Fig. S5. Effect of aprepitant on plasma aldosterone and renin responses to metoclopramide. (A, B) Kinetics of plasma aldosterone (A) and renin (B) responses to metoclopramide (MCP, 10 mg iv) in healthy volunteers under placebo (□) or aprepitant (●) at D4. Aprepitant enhanced the effects of metoclopramide on aldosterone and renin plasma levels ($p=0.002$ and $p=0.02$, respectively; Two-way ANOVA). Variations of plasma concentrations are expressed as % basal level (BL). (C, D) AUCs were calculated from the 2 metoclopramide tests performed under placebo (□) and aprepitant (■), respectively. * $p<0.05$.

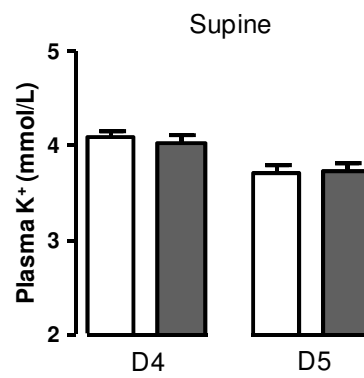


Fig. S6. Absence of effect of aprepitant on kaliemia in healthy volunteers. Aprepitant did not impact potassium levels in supine position at both day 4 and day 5.

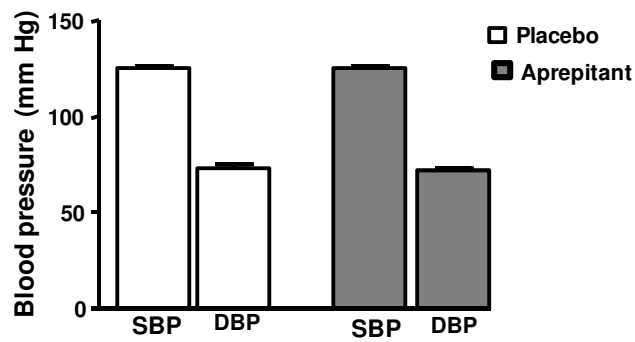


Fig. S7. Absence of effect of aprepitant on blood pressure. Mean systolic (SBP) and diastolic (DBP) blood pressures were measured in healthy volunteers at D3/D4 by using 24-hr ambulatory blood pressure monitoring.

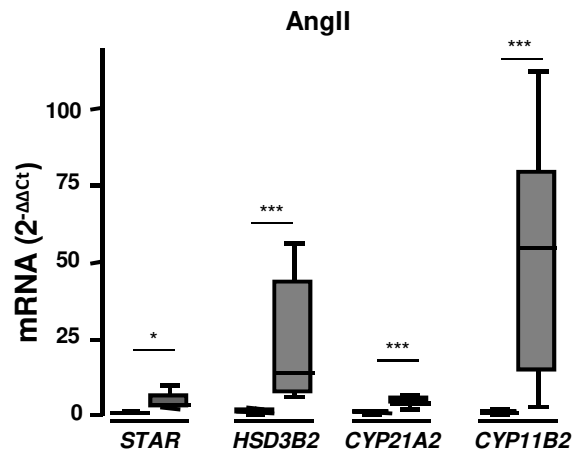


Fig. S8. Effect of angiotensin II on the expression levels of genes encoding cholesterol transporter and steroidogenic enzymes. Angiotensin II (10^{-6} M) increased *STAR*, *HSD3B2*, *CYP21A2* and *CYP11B2* mRNA levels (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le résultat principal de ce travail de recherche a été de montrer qu'il existe chez l'homme, un système de contrôle de la production d'aldostérone dans la glande surrénale d'origine neurogène, relayé par des fibres nerveuses à substance P, non-adrénergiques non cholinergiques.

1. Expression des tachykinines dans la glande surrénale

Nous avons détecté les ARNm des gènes *TAC1* et *TAC4* mais ceux de *TAC3* n'étaient pas décelables dans des extraits de surrénales saines. Les ARNm de *TAC1* étaient principalement représentés par les transcrits β et γ , suggérant que la SP et la NKA peuvent être synthétisées dans la surrénale. Ces résultats sont en accord avec ceux de Page et al et de Pinto et al obtenus chez l'homme (panels de tissus humains) par RT-PCR conventionnelle (127), (204), (201). Nous avons alors recherché la présence de SP et précisé sa localisation tissulaire au sein de la surrénale. Notre approche immunohistochimique a détecté des fibres nerveuses positives à la SP qui étaient principalement visualisées dans la zone glomérulée, lieu de la synthèse d'aldostérone et, plus rarement entre les cordons cellulaires de la zone fasciculée, au voisinage des cellules produisant les glucocorticoïdes. La présence de fibres à SP à proximité des cellules stéroïdogènes, suggère que le neuropeptide pourrait contrôler la sécrétion des hormones stéroïdiennes. De plus, l'existence de fibres à SP dans la paroi des artères surrénaliennes irriguant la glande surrénale suggère que ce peptide vasorelaxant pourrait augmenter le flux sanguin, ce qui pourrait indirectement favoriser la stéroïdogénèse. En effet, ce peptide pourrait contrôler le tonus des artérioles surrénaliennes, dont la vasodilatation entraîne une majoration de la disponibilité en substrat (cholestérol), favorisant indirectement la synthèse d'aldostérone (253).

Des fibres à SP avaient été observées auparavant dans le cortex surrénalien par Heym et al, mais leur appartenance aux différentes composantes du système nerveux autonome n'a pas été établie (155). Dans notre travail, nous avons identifié des fibres positives pour les marqueurs du système sympathique (contenant la tyrosine hydroxylase) et parasympathique (contenant la choline acétyltransférase), distinctes des fibres à SP, suggérant que ce neuropeptide pourrait être le neuromédiateur d'une troisième composante nerveuse non-adrénergique non-cholinergique (NANC), comme cela a été décrit au niveau pulmonaire (122). Des travaux, réalisés chez le rat, retrouvent des neurones à SP dans la médullosurrénale évoquant un contrôle présynaptique de la SP sur les cellules chromaffines (254). Cependant nous n'avons pas pu mettre en évidence un marquage médullosurrénalien à SP au cours de nos travaux réalisés chez l'homme.

Nous retrouvons l'expression de *TAC4* déjà décrite par Page et al. par PCR classique (217). Nous n'avons pas recherché les variants de *TAC4* produits dans la surrénale mais Page et al. ont précédemment montré que cet organe exprimait les 4 variants, codant les peptides potentiellement produits par *TAC4*, l'hémokinine et les endokinines (217).

Nos expériences de q-PCR montrent que *TAC4* est légèrement moins exprimé que *TAC1*. A ce jour, nous n'avons pas recherché la distribution des peptides dérivés de *TAC4* dans le tissu.

2.Expression des récepteurs des tachykinines dans la glande surrénale

Nous avons recherché les ARNm codés par les gènes *TACR1*, *TACR2* *TACR3* correspondant respectivement aux 3 types de récepteurs couplés aux protéines G nommés NK1, NK2 et NK3 responsables des actions biologiques des tachykinines. De plus, nous avons recherché les deux isoformes du récepteur NK1 générés à partir de l'épissage alternatif du transcrit primaire du gène *TACR1*, à savoir les variants court (*TACR1s*) et long (*TACR1l*). Nous avons montré que les niveaux d'expression des ARNm de *TACR1*, *TACR1s*, et *TACR1l* sont présents à des niveaux élevés, avec une prédominance de l'expression de *TACR1s* sur *TACR1l*, alors que ceux de *TACR2* sont faibles et que les ARNm de *TACR3* sont indétectables, ce qui corrobore les données de la littérature (201), (204). L'expression de *TACR1* est confirmée par l'étude immunohistochimique qui révèle la présence de NK1R (récepteur le plus affiné pour la SP), qui a été principalement observée tout le long de la zone glomérulée, tandis qu'un marquage beaucoup rare a été détecté dans la zone fasciculée. La présence de cellules corticosurréaliennes exprimant NK1R observées au voisinage des fibres nerveuses contenant la SP, traduit l'existence d'une organisation structurale compatible avec un contrôle direct de la stéroïdogénèse par la SP via son récepteur NK1. Nos résultats montrent que le récepteur NK1 est présent au niveau des cellules productrices d'aldostérone, les APCC, qui expriment l'aldostérone synthase, enzyme clé pour la synthèse de l'aldostérone codée par *CYP11B2*. Ces cellules, doublement marquées, sont disposées en amas répartis de manière discontinue dans la zone glomérulée sous la capsule. Ces résultats sont en faveur d'un contrôle de la fonction minéralocorticoïde par la SP. Nous montrons cependant qu'il existe également un marquage NK1 pour les cellules de la zone glomérulée négatives pour le *CYP11B2*, et qui expriment habituellement *CYP11B1*, une enzyme clé pour la production de cortisol (255), suggérant que la SP pourrait également moduler la glucostéroïdogénèse par l'activation du NK1R. La surrénale exprime à un faible niveau *TACR2*. Le récepteur NK2R a une très forte affinité pour la NKA qui est produite comme la SP par *TAC1*. La NKA pourrait donc potentiellement exercer des

effets biologiques dans la surrénale via le récepteur NK2. En revanche, l'absence d'expression de NK3 qui a la plus forte affinité pour la NKB codée par *TAC3*, permet d'exclure l'hypothèse d'un contrôle des fonctions surrénaliennes par la NKB.

De manière intéressante, nous montrons également que la paroi des artères surrénaliennes abrite un immunomarquage NK1R au voisinage des fibres nerveuses à SP innervant les vaisseaux, ce qui suggère un contrôle du tonus vasculaire par ce récepteur.

3. Effets de la SP sur les cellules corticosurrénaliennes humaines

Nous avons étudié l'effet des différentes tachykinines sur la production de stéroïdes surrénaliens dans notre modèle de culture de cellules corticosurrénaliennes humaines. La SP stimule de manière dose-dépendante la production d'aldostérone et de cortisol. L'effet prépondérant de la SP sur la synthèse d'aldostérone est concordant avec la forte expression du NK1 dans la zone glomérulée de la glande. Toutefois, la SP stimule la libération de cortisol avec une efficacité similaire mais avec une puissance moindre par rapport à l'aldostérone. Ceci s'explique probablement par la faible abondance du récepteur NK1 dans la zone fasciculée, et suggère que la réponse des glucocorticoïdes à la SP observée dans nos conditions de culture, provient probablement des cellules négatives pour CYP11B2 sous-capsulaires exprimant le NK1. En revanche, la neurokinine A, les endokinines et l'hémokinine augmentent très faiblement la sécrétion d'aldostérone (endokinines A/B et D) voire n'ont aucun effet (hémokinine et endokinines C). La forte puissance de la SP dans son action stimulante sur l'aldostérone est en faveur de l'implication du récepteur NK1 alors que la faible puissance de la NKA, agoniste du NK2, ne plaide pas pour la mise en jeu du récepteur NK2 dans l'effet de cette dernière sur la production de minéralocorticoïdes. L'implication des récepteurs NK1 et NK2 dans la réponse de l'aldostérone à la SP a été recherchée par une approche pharmacologique utilisant l'aprépitant, un antagoniste du NK1R, et le GR159857, un antagoniste du NK2R. Le fait que la réponse de l'aldostérone à la SP soit totalement inhibée par l'aprépitant, et légèrement diminuée par le GR159897 indique que l'action de la SP sur l'aldostérone est principalement relayée par le récepteur NK1 et peu par le NK2. L'ensemble de ces données montrent que, dans le cortex surrénalien humain, la SP à des concentrations suprananomolaires, stimule la stéroïdogénèse principalement par l'activation du NK1R, son action biologique étant plus puissante pour stimuler la sécrétion d'aldostérone que celle de cortisol. Cet effet physiologique implique probablement la libération locale surrénalienne de SP par les fibres nerveuses et non une action de la SP circulante car les concentrations

plasmatiques du peptide ne dépassent généralement pas 10^{-11} M chez l'homme, une concentration qui n'a aucune action sur la synthèse de cortisol ou d'aldostérone dans notre modèle *in vitro* (256). En effet, les concentrations efficaces médianes (EC50) obtenues dans le présent travail, sont respectivement de l'ordre de 3 et 60 nM pour l'aldostérone et le cortisol.

L'efficacité maximale (Emax) de la SP observé sur la sécrétion d'aldostérone dans nos conditions correspond à une augmentation de plus de 70% de la valeur basale d'aldostérone. Ce résultat original est proche des valeurs observées dans la littérature. Chez le rat vivant, l'administration locale de SP 10^{-5} M dans l'artère surrénalienne induit une augmentation de plus de 50% de la sécrétion d'aldostérone (257). En revanche, dans un modèle de glande interrénale périfusée de grenouille *Rana ridibunda*, la réponse de l'aldostérone à la ranakinine 10^{-5} M, une tachykinine spécifique de l'espèce proche de la SP, correspond à une augmentation de plus de 50% des concentrations basales (258).

L'ensemble des données de la littérature et de nos travaux révèle que la réponse de l'aldostérone à la SP ou aux tachykinines apparentées varie peu malgré : (i) une variabilité inter-espèce des peptides et de leurs récepteurs, comme cela a déjà été montré pour d'autres peptides régulateurs surrénaliens(136); (ii) des différences entre les modèles expérimentaux utilisés ; l'animal vivant, la périfusion d'explants surrénaliens et, dans notre cas, les cellules corticosurrénaliennes sélectionnées au cours d'une culture cellulaire prolongée.

Une des limites de notre modèle d'étude est liée au fait que les cellules corticosurrénaliennes proviennent de patients en coma dépassé ayant subi un stress important au cours de la réanimation, avec l'administration de différents médicaments, qui potentiellement peuvent altérer la stéroïdogénèse surrénalienne et la réceptivité des cellules corticosurrénaliennes à la SP.

4. Voies de signalisation de la SP impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne humaine

La voie calcique intracellulaire est connue pour être un régulateur majeur de la synthèse de l'aldostérone, puisqu'elle relaie l'effet stimulant de l'ANGII sur la sécrétion d'aldostérone via l'activation du récepteur de l'angiotensine de type 1 (AT1R). Dans notre modèle de culture cellulaire, une forte concentration de SP est nécessaire pour générer une faible augmentation de la concentration de calcium cytosolique, ce qui indique que l'effet de la SP n'est que très peu relayé par la voie calcique. Nos données suggèrent également que l'action de la SP ne met pas en jeu le NK1R long, qui est connu pour être couplé positivement à la voie calcique (259).

Cette observation s'explique probablement par le fait que le variant court du récepteur NK1, qui représente la forme majoritaire du récepteur dans les cellules corticosurréaliennes humaines, n'active que faiblement la voie de transduction du calcium.

Par ailleurs, le récepteur NK1Rs est capable de stimuler la voie ERK/MAP kinase qui est impliquée dans la réponse de l'aldostérone à l'ANGII et d'autres facteurs de régulation, tels que les produits de sécrétion adipocytaire (79), (260). En accord avec ces données, nos expériences de Western-Blot révèlent que la SP augmente, comme l'AngII, la phosphorylation de ERK. De plus, la sécrétion d'aldostérone stimulée par la SP est bloquée par le PD0325901, un inhibiteur de MEK qui phosphoryle la protéine ERK. Globalement, nos données démontrent par conséquent que la SP exerce des effets sécrétoires en activant le NK1 court couplé positivement à la phosphorylation de ERK.

L'activation de la voie ERK étant connue pour relayer les effets transcriptionnels de l'ANGII sur les gènes codant différents acteurs de la stéroïdogénèse, nous avons ensuite étudié l'impact de la SP sur l'expression des gènes impliqués dans la synthèse d'aldostérone. La SP n'a pas eu d'effet significatif sur les niveaux d'expression des transcrits de *StAR*, *CYP21* et *CYP11B2*, mais a significativement augmenté l'expression de *HSD3B2* codant la 3 β HSD2, et de *CYP21*, codant la 21-hydroxylase, deux enzymes impliquées dans la voie de synthèse de l'aldostérone. Dans la littérature, il a été rapporté que la majoration des niveaux d'expression des enzymes de type 3 β HSD, s'accompagne d'une augmentation de la production d'aldostérone dans un modèle murin d'hyperaldostéronisme, la lignée de souris Cry^{-/-} (261). Le renforcement de l'expression de la 3 β HSD entraîne une élévation de la production des substrats de l'aldostérone synthase favorisant la synthèse du minéralocorticoïde. Cette augmentation de l'expression des ARNm codant la 3 β HSD2 pourrait expliquer l'action stimulante de la SP sur la stéroïdogénèse dans la zone glomérulée.

5. Protocole APHOS : effet de l'antagoniste du récepteur NK1, l'aprépitant sur les sécrétions corticosurréaliennes chez l'homme

Afin de rechercher si la SP exerce un rôle physiologique dans la régulation de la sécrétion d'aldostérone chez l'homme, nous avons réalisé une étude clinique visant à évaluer l'effet d'un antagoniste du récepteur NK1, l'aprépitant sur les sécrétions surréaliennes. En effet, les antagonistes du récepteur NK1, comme l'aprépitant, sont maintenant couramment utilisés dans le traitement des nausées et des vomissements induits par la chimiothérapie et leur emploi en tant

qu'outils pharmacologiques, a été reconnue en recherche clinique (263), (264). Nous avons donc décidé de mener une étude prospective croisée et contrôlée contre placebo, en double aveugle, afin d'étudier l'impact de l'aprépitant sur les concentrations plasmatiques de corticostéroïdes chez 20 volontaires sains, en régime normosodé (NCT00977223). Le critère d'évaluation principal retenu a été la production d'aldostérone estimée par l'aldostérone urinaire des 24 heures et l'aldostérone plasmatique en condition basale et en réponse à différents tests physiologiques et pharmacologiques. Les critères secondaires comprenaient les concentrations plasmatiques de rénine, de cortisol et d'ACTH, la kaliémie et le cortisol libre urinaire des 24 heures. L'aprépitant a été administré par voie orale pendant une semaine, à la dose initiale de 125 mg (jour 1) suivie d'une dose quotidienne de 80 mg pendant les 6 jours restants. Ce schéma posologique est plus long que le protocole de 3 jours utilisé en prévention des nausées et vomissements post-chimiothérapie.

L'administration d'aprépitant n'a eu aucun effet ni sur le cortisol libre urinaire et sur les concentrations plasmatiques de cortisol et d'ACTH, tant en conditions basales qu'en réponse au test d'hypoglycémie insulinique, qui active l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en mimant l'action du stress. Ces résultats montrent que le récepteur NK1 n'est pas impliqué dans la libération basale ou stimulée par le stress du cortisol et de l'ACTH. De plus, ils suggèrent que l'effet activateur de la SP, sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien rapporté par Coiro et al, pourrait ne pas emprunter le NK1R (176).

En revanche, l'aprépitant a réduit de manière significative la production d'aldostérone. Ainsi, l'aldostéronurie des 24 heures a été diminuée de 28% et l'aldostéronémie en décubitus est diminuée à J4, de 19% et de manière plus marquée à J5, de 26%. Cette diminution des concentrations plasmatiques d'aldostérone sous aprépitant s'explique probablement par l'inhibition de l'action directe stimulatrice de la SP sur les cellules corticosurréaliennes. En effet, la diminution du rapport aldostérone / cortisol en décubitus, qui permet d'étudier les variations des concentrations plasmatiques d'aldostérone en tenant compte de celles de l'ACTH, suggère que les effets inhibiteurs de l'aprépitant sur la production d'aldostérone, ne sont pas dues à une action indirecte impliquant l'ACTH. De plus, bien que l'artère rénale reçoive une innervation SP-ergique, la diminution de l'aldostérone plasmatique en position couchée n'implique probablement pas le système rénine-angiotensine comme en témoigne l'absence d'effet de l'aprépitant en décubitus sur la rénine plasmatique. De même, l'aprépitant n'a pas modifié la kaliémie, connue pour être un stimulus majeur de la libération d'aldostérone. On peut également noter que le traitement n'a

modifié, ni la pression artérielle, ni la natriurèse des 24 heures, qui sont respectivement cause et témoin de l'impact du SRA sur l'équilibre hydro-sodé. A contrario, l'absence d'élévation de la rénine plasmatique malgré la baisse de près de 30% de l'aldostérone plasmatique pourrait résulter des effets opposés du blocage NK1 au niveau rénal et au niveau surrénalien.

Il est également à noter que la durée de 7 jours du traitement par aprépitant était probablement trop courte pour entraîner une augmentation compensatoire des concentrations plasmatiques de rénine et/ou de la kaliémie en réponse à la diminution de la concentration circulante d'aldostérone. Enfin, on ne peut pas éliminer le fait qu'une partie de l'effet inhibiteur de l'aprépitant sur l'aldostérone plasmatique ait pu résulter de la liaison de l'aprépitant aux récepteurs NK1 vasculaires surrénaliens, en supprimant l'action vasorelaxante de la SP à ce niveau. La conséquence pourrait être ainsi une baisse du débit sanguin surrénalien et une diminution secondaire de la synthèse d'aldostérone (267).

Au plan physiologique, l'observation que l'antagonisme du NK1R surrénalien conduit à une diminution des niveaux plasmatiques d'aldostérone en position couchée montre qu'un contrôle neurogène, reposant sur la composante eNANC via la libération intrasurrénalienne de SP, exerce un tonus stimulant sur la sécrétion d'aldostérone visant à maintenir la production des minéralocorticoïdes à l'état basal. En revanche, nos données montrent que la SP et son récepteur ne sont pas impliquées dans la réponse de l'aldostérone à l'orthostatisme. Ce mécanisme de régulation original semble complémentaire du SRA systémique dont l'action prédomine dans les situations nécessitant une forte stimulation de la production d'aldostérone, comme l'adaptation à la position debout et à la privation de sel. A cet égard, il est pertinent de noter que les patients anéphriques, qui présentent des concentrations de rénine plasmatique indétectables, ont des concentrations plasmatiques basales mesurables d'aldostérone mais ne parviennent pas à augmenter leur sécrétion d'aldostérone en orthostatisme (268). Ceci montre que la rénine n'est pas indispensable au maintien de la sécrétion basale d'aldostérone mais qu'elle joue un rôle majeur dans la réponse du minéralocorticoïde à l'orthostatisme.

Sur le plan de l'évolution, on sait que le contrôle de la production de minéralocorticoïdes par les tachykinines existe chez les organismes vertébrés tels que les amphibiens et les rongeurs. De plus, la séquence codant le récepteur NK1 comme celle codant le récepteur des minéralocorticoïdes, a été retrouvée dans le génome de tous les vertébrés incluant les poissons, ce qui laisse penser que le NK1 pourrait être impliqué dans la régulation de la production des minéralocorticoïdes chez

nombre d'espèces animales. En revanche, l'aldostérone n'est pas produite chez les poissons à l'exception du dipneuste qui est un poisson doté à la fois de branchies et de poumons lui permettant de survivre lors de l'assèchement des rivières. On peut émettre l'hypothèse que le système nerveux tachykininergique qui préexistait à l'aldostérone, ait été utilisé pour contrôler la sécrétion d'aldostérone et maintenir l'homéostasie hydro-sodée nécessaire à la survie des animaux lors de la transition de la vie aquatique à la vie terrestre. La conservation du système tachykininergique parmi les facteurs régulateurs de la sécrétion d'aldostérone de la grenouille à l'homme est révélatrice de son importance physiologique (269).

6. Effets de la SP sur la prolifération et la migration cellulaires corticosurréaliennes

Dans différents organes, la SP exerce également des effets favorisant la différenciation et la prolifération cellulaires, grâce à la voie ERK, via le récepteur NK1. En effet, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est transactivé par le récepteur NK1, activant la voie ERK ce qui conduit à augmenter la synthèse d'ADN (270), (271), (272).

A côté de ces effets prolifératifs, dans la surrénale de rat, la SP exerce des effets trophiques sur la zone glomérulée induisant une hypertrophie cellulaire. Ces modifications s'accompagnent d'une augmentation du volume des mitochondries et du réticulum endoplasmique avec une diminution de leur contenu en gouttelettes lipidiques (193). La voie ERK pourrait relayée les effets trophiques de la SP sur les cellules de la zone glomérulée.

Par ailleurs, il a été rapporté que la SP favorise la migration de cellules progénitrices mésenchymateuses (273). En particulier, le peptide induit la migration des progéniteurs des cellules endothéliales de la moelle osseuse vers les vaisseaux présentant une lésion de l'endothélium (274). De manière intéressante, dans le cortex surrénalien, les cellules progénitrices sont présentes dans la région sous-capsulaire (275), (276). Compte tenu de la localisation préférentielle des fibres à SP dans cette zone, ces cellules progénitrices pourraient migrer dans le cortex surrénalien sous l'influence de la SP puis se différencier en cellules productrices d'aldostérone.

7. Implications physiologiques du système tachyninergique dans la production d'aldostérone

7.1. Stimuli physiologiques augmentant la transmission nerveuse dans la surrénale

Les résultats de notre étude nous conduisent à rechercher les conditions physiologiques qui provoquent la libération de SP au voisinage des cellules de la zone glomérulée. Le sommeil

constitue un exemple de situation physiologique de mise au repos du système rénine-angiotensine au cours du décubitus. Durant cette période, la SP pourrait être l'un des principaux facteurs contrôlant la production d'aldostérone.

Dans un travail antérieur, Skrabanek et al ont décrit des pics de concentrations plasmatiques de SP avec des intervalles réguliers de 90 minutes chez des volontaires sains. Les auteurs rattachaient l'émission des pics aux phases de sommeil paradoxal et plus particulièrement à l'activité de neurones impliqués dans le contrôle du sommeil (277). De manière parallèle, des pics de sécrétion d'aldostérone ont été décrits chez les volontaires sains au cours de la nuit durant le sommeil (278). L'ACTH n'est pas impliquée dans cette pulsatilité puisque le freinage de l'axe corticotrope par la dexaméthasone ne modifie que très peu le rythme sécrétoire de l'aldostérone durant le sommeil, suggérant que d'autres systèmes interviennent dans la régulation de la sécrétion d'aldostérone pendant le repos nocturne (279). Ces données suggèrent, que la sécrétion d'aldostérone en période de sommeil pourrait être contrôlée par la SP, libérée lors de l'activation neuronale des fibres SP-ergiques.

7.2. Contrôle de la sécrétion d'aldostérone par les tachykinines au cours de la grossesse

Durant la grossesse, le placenta produit des quantités importantes de tachykinines, en particulier de neurokinine B (NKB). Cette tachykinine qui subit une modification post-traductionnelle particulière qui permet d'augmenter sa demi-vie, qui passe de 20 minutes à 20 heures (279). Les très fortes concentrations circulantes de NKB sont capables d'activer le récepteur NK1 des centres du vomissement, qui est responsable de la survenue des vomissements du premier trimestre de grossesse (280), (281). Compte tenu de ces données, on peut supposer que les tachykinines circulantes d'origine placentaire, pourraient également stimuler la sécrétion d'aldostérone en activant le NK1 présent dans les cellules surrénaliennes et augmenter l'aldostéronémie durant la grossesse (282).

7.3. Interactions intrasurrénaliennes entre la SP et la 5-HT sur la production d'aldostérone

Dans les travaux antérieurs de notre équipe, il a été démontré que la 5-HT, libérée par les mastocytes intra-surréaliens, stimulait la sécrétion d'aldostérone par les récepteurs 5-HT₄ exprimés par les cellules de la zone glomérulée (283), (284). Dans ce contexte, il a été rapporté que l'administration d'agonistes du récepteur 5-HT₄, tels que le zacopride, le cisapride et le métoclopramide, augmente les concentrations plasmatiques d'aldostérone chez des volontaires sains (285), (286), (voir article 2 en annexe). Il a par ailleurs été montré dans différents organes

dont le poumon (287), que des fibres à SP innervent les mastocytes et que l'activation des fibres à SP augmente les sécrétions mastocytaires. Par ailleurs, des fibres à SP expriment le récepteur 5-HT₄. Ces données sont donc en faveur d'une communication bidirectionnelle potentielle entre les mastocytes et les fibres à SP.

Dans le tractus gastro-intestinal, il a été montré que la SP est capable de relayer l'action prokinétique de la 5-HT en réponse à l'activation du récepteur 5-HT₄ (288). Ces observations suggèrent que l'action de la 5-HT sur la fonction minéralocorticoïde pourrait se produire, au moins partiellement, de manière indirecte via la libération locale de SP. Afin d'explorer cette hypothèse, un test pharmacologique a été réalisé chez le volontaire sain avec du métoclopramide (10 mg IV), un agoniste partiel du récepteur 5-HT₄, en association avec l'aprépitant. La sécrétion d'aldostérone induite par le métoclopramide, n'était pas bloquée par l'aprépitant mais était même potentialisée par l'antagoniste NK1. Ces données permettent donc d'exclure une action indirecte de l'agoniste du récepteur 5-HT₄ à travers les fibres nerveuses à SP. Inversement, la potentialisation de la réponse de l'aldostérone au métoclopramide par l'antagoniste du récepteur NK1 semble être la conséquence d'une augmentation de la production de rénine qui n'a pas été observée sous stimulation par le métoclopramide seul, comme cela a déjà été démontré dans des études antérieures (289), (290). A cet égard, il est concevable que l'élévation des concentrations plasmatiques de rénine puisse résulter de l'action combinée du métoclopramide et de l'aprépitant sur le flux sanguin intrarénal.

Notre protocole de recherche clinique n'a donc pas permis de tester l'hypothèse d'un contrôle indirect de la synthèse d'aldostérone via la stimulation des sécrétions mastocytaires par les fibres à SP dans la glande surrénale. Cette hypothèse pourrait être abordée par une approche in vitro sur des fragments de surrénale en quantifiant d'une part, la 5-HT libérée par les mastocytes en réponse à l'application de SP et d'autre part, la sécrétion d'aldostérone induite par la SP en absence et en présence d'un antagoniste du récepteur 5-HT₄.

D'une façon intéressante, il a été rapporté que les mastocytes présents dans la peau produisent de la SP (291). Ces données nous ont conduit à émettre l'hypothèse que les mastocytes surrénaux pouvaient contenir à la fois de la 5-HT et de la SP capables d'agir de concert sur la synthèse d'aldostérone (292), (293). Toutefois nos expériences d'immunohistochimie n'ont pas permis de détecter la présence de SP dans les mastocytes surrénaux, ce qui permet d'exclure un mécanisme de contrôle de la production d'aldostérone par de la SP d'origine mastocytaire.

7.4. Interactions intrasurréaliennes entre la SP et l'Angiotensine II dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone

L'ANGII est produite par clivage protéolytique de l'ANGI effectué par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Cette enzyme qui est exprimée dans le cortex surrénalien, dégrade la SP en métabolites inactifs. En réduisant la durée de vie de la SP, cette enzyme peut donc interrompre la stimulation de la libération d'aldostérone induite par la SP (136), (294). Par conséquent, un équilibre peut s'établir entre les actions biologiques de l'ANGII et de la SP sur les cellules corticosurréaliennes. En outre, l'inhibition de l'enzyme de conversion par un IEC, prescrit dans le but de réduire la production d'ANGII chez les patients hypertendus, pourrait augmenter les concentrations de SP dans la glande surrénale et renforcer par ce biais la stimulation de la synthèse d'aldostérone. Ce mécanisme pourrait expliquer la diminution peu importante des niveaux d'aldostérone plasmatiques circulants observée chez les patients sous IEC (295).

7.5. Rôle de la SP dans l'hyperaldostéronisme

Sur la base de nos données montrant que des fibres à SP innervant la glande surrénale, contrôlent la sécrétion d'aldostérone, on peut envisager qu'une hyperactivité du système nerveux autonome pourrait être responsable d'un hyperaldostéronisme.

➤SP, hyperaldostéronisme, hyperactivité du SNA et syndrome métabolique

L'hypertension artérielle à rénine basse, qui représente 30% des cas d'hypertension artérielle, comprend l'hyperaldostéronisme primaire et l'HTA essentielle à rénine basse (296). Parmi ces patients hypertendus avec une rénine basse, il existe un sous-groupe de patients avec une aldostéronémie élevée de manière inadaptée en regard des concentrations basses de rénine plasmatique (297). Plusieurs études, dont une étude ancillaire réalisée à partir d'une cohorte de plus de 6000 patients, MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis), suggèrent l'existence d'un continuum entre les patients normotendus présentant une rénine basse (hyperaldostéronisme infraclinique), les patients présentant une HTA à rénine basse et les patients avec un hyperaldostéronisme primaire (298), (299), (300). Les patients avec un syndrome métabolique peuvent présenter une HTA à rénine basse et un hyperaldostéronisme, en grande partie, indépendant du système rénine-angiotensine, comme l'atteste l'élévation significative du rapport aldostérone/rénine plasmatique (301),(302).

Les mécanismes à l'origine de l'hyperaldostéronisme chez les patients avec syndrome métabolique ne sont pas encore clairement identifiés. L'équipe de Bornstein a démontré que les

adipocytes en culture produisent des facteurs capables de stimuler la production d'aldostérone par la lignée de cellules corticosurréaliennes humaines H295R et des cellules corticosurréaliennes bovines (80), (82). Cette équipe n'a pas identifié les facteurs adipocytaires à l'origine de la réponse de l'aldostérone mais elle a écarté l'implication d'une adipokine, la leptine(303). D'autres études, à l'inverse, indiquent que la leptine produite par les adipocytes serait responsable de l'augmentation de la production d'aldostérone chez les sujets obèses (305), (306). Certains auteurs ont mis en cause les acides gras massivement oxydés au cours de leur métabolisme par le foie chez la personne obèse, pour expliquer l'hyperaldostéronisme des patients avec un syndrome métabolique (83). Il est tout à fait envisageable que l'hyperaldostéronisme associé au syndrome métabolique soit d'origine multifactorielle et mette en jeu différents mécanismes. Au cours de la prise pondérale responsable du diabète de type 2 se développe une insulino-résistance qui est corrélée aux concentrations plasmatiques d'aldostérone (307). L'insulino-résistance entraîne un hyperinsulinisme qui stimule le système nerveux sympathique central. Dans la mesure où il a été observé que l'activation du système nerveux sympathique coïncide avec l'activation du système nerveux eNANC au niveau bronchique (125), (121), nous pouvons envisager que l'hypertonie sympathique induite par l'hyperinsulinisme s'accompagne d'une augmentation de l'excitabilité du système eNANC chez les patients diabétiques de type 2. Dans cette hypothèse, le renforcement du tonus nerveux eNANC dans le cortex surrénalien conduirait à une augmentation de la transmission SP-ergique entraînant une hypersécrétion d'aldostérone. Dans le but d'évaluer le rôle de la SP dans la physiopathologie de l'hyperaldostéronisme associé au syndrome métabolique indépendant du SRA, nous avons entrepris un protocole de recherche clinique, APHOS2, visant à évaluer l'effet de l'aprépitant sur la production d'aldostérone chez des patients diabétiques de type 2.

A plus long terme, on peut envisager qu'un test à l'aprépitant avec une mesure de l'aldostéronurie des 24 heures, permettrait d'identifier l'hyperaldostéronisme SP-dépendant chez les patients en syndrome métabolique avec HTA à rénine basse. Sur la base de ce test diagnostique, un traitement par apnépitant au long cours, en complément ou en remplacement des antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes, pourrait être prescrit pour réduire de manière durable les concentrations d'aldostérone plasmatique chez ces patients et ainsi minimiser leur risque de complications cardiovasculaires. A l'inverse, la perte de fonction de la commande nerveuse eNANC dans la zone glomérulée pourrait être impliquée dans l'hypoaldostéronisme observé chez les

patients atteints de neuropathie diabétique ou de maladie du système neurovégétatif, tels que le syndrome de Shy-Drager (308).

➤ **SP et hyperaldostéronisme au cours de l'insuffisance cardiaque**

L'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une augmentation des concentrations circulantes d'aldostérone. L'hyperaldostéronisme est secondaire d'une part à l'activation du système rénine-angiotensine consécutive à l'hypovolémie relative, et d'autre part à la diminution du catabolisme hépatique de l'aldostérone lié à la dysfonction hépatique (269). Par conséquent, les concentrations d'aldostérone plasmatiques sont d'autant plus élevées que l'insuffisance cardiaque est sévère (309). Toutefois, le fait que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine n'induisent qu'une inhibition partielle et transitoire de la production d'aldostérone chez l'insuffisant cardiaque suggère que d'autres facteurs, comme la SP, pourraient contribuer au maintien de la production de minéralocorticoïdes (310).

Par ailleurs, il a été rapporté que les niveaux plasmatiques de substance P sont corrélées aux concentrations plasmatiques de BNP (Brain Natriuretic Peptide) signant la dysfonction ventriculaire (311). Ainsi, l'augmentation des concentrations circulantes de SP pourrait refléter l'hyperactivité du système nerveux végétatif observée au cours de l'insuffisance cardiaque. Une augmentation du tonus eNANC et de la transmission SP-ergique surrénalien au sein du cortex contribuerait, avec le SRA, à l'augmentation des concentrations plasmatiques d'aldostérone observées chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque. Ces données suggèrent que l'antagonisme NK1 pourrait être bénéfique pour diminuer les effets cardiovasculaires délétères de l'hypersecrétion d'aldostérone chez ces patients (237).

➤ **SP et hyperaldostéronisme dans le syndrome d'apnées du sommeil**

Le syndrome d'apnées du sommeil est caractérisé par des épisodes récurrents d'interruption partielle (hypopnée) ou complète (apnée) de la respiration pendant le sommeil en raison de l'affaissement des voies respiratoires dans la région pharyngée. Ce syndrome est associé à un hyperaldostéronisme indépendant du SRA (312). De plus, le taux d'aldostérone circulant est corrélé à la sévérité du syndrome d'apnées du sommeil (313). L'hyperaldostéronisme, ainsi que l'activation sympathique, seraient impliquées dans la pathogénie de l'HTA résistante chez les patients atteints d'un syndrome d'apnées du sommeil (314), (313), (315). L'excès d'aldostérone semble également jouer un rôle délétère dans la sévérité du syndrome d'apnées du sommeil

puisque la prise de spironolactone, antagoniste du récepteur des minéralocorticoïdes, diminue de moitié la sévérité du syndrome d'apnées du sommeil chez les patients présentant par ailleurs, une hypertension artérielle résistante (316).

Au cours des apnées du sommeil, l'augmentation de l'activité sympathique pourrait être là encore, associée à une stimulation du système eNANC. Il a en effet été rapporté une élévation du taux de SP dans le liquide cérébro-spinal chez les patients atteints de syndrome d'apnées du sommeil (317). L'hyperactivité du SNA observée au cours du SAS pourrait s'accompagner d'une augmentation de la production nerveuse de SP.

Nous pouvons donc envisager qu'une augmentation du tonus SP-ergique dans le cortex surrénalien pourrait contribuer au développement de l'hyperaldostéronisme observé chez les patients atteints de syndrome d'apnées du sommeil. Il serait par conséquent intéressant d'évaluer les concentrations d'aldostérone chez des patients atteints de SAS après traitement par aprépitant.

Notre étude a identifié un nouveau système physiologique de régulation de la sécrétion des minéralocorticoïdes chez l'homme, expliquant l'indépendance partielle de la production d'aldostérone par le SRA circulant. Ce processus de régulation, qui implique la libération intra-surrénalienne de SP par les fibres nerveuses NANC, l'activation de NK1R et la stimulation de la voie ERK / pERK dans les cellules corticosurrénaliennes, semble contrôler la sécrétion en position couchée d'aldostérone. Il montre également que le système nerveux exerce un contrôle direct sur la production de minéralocorticoïdes et participe donc à la régulation de l'homéostasie hydro électrolytique.

REFERENCES

1. Levine JE. An Introduction to Neuroendocrine Systems. In: Handbook of Neuroendocrinology. Elsevier; 2012 p. 3–19.
2. Haase M, Willenberg HS, Bornstein SR. Update on the corticomedullary interaction in the adrenal gland. *Endocr Dev.* 2011;20:28–37.
3. Pihlajoki M, Dörner J, Cochran RS, Heikinheimo M, Wilson DB. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. *Front Endocrinol.* 2015;6:27.
4. Vinson GP. Functional Zonation of the Adult Mammalian Adrenal Cortex. *Front Neurosci.* 2016;10:238.
5. Funder JW. Aldosterone in Advancing Age: Don't Shoot the Messenger. *Circulation.* 2017 Jul 25;136(4):356–8.
6. Nanba K, Vaidya A, Williams GH, Zheng I, Else T, Rainey WE. Age-Related Autonomous Aldosteronism. *Circulation.* 2017 Jul 25;136(4):347–55.
7. Capponi AM. Regulation of cholesterol supply for mineralocorticoid biosynthesis. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 2002 Apr;13(3):118–21.
8. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 1996 Jan 26;271(5248):518–20.
9. Tsai Y-Y, Rainey WE, Bollag WB. Very low-density lipoprotein (VLDL)-induced signals mediating aldosterone production. *J Endocrinol.* 2017 Feb;232(2):R115–29.
10. Bollag WB. Regulation of aldosterone synthesis and secretion. *Compr Physiol.* 2014 Jul;4(3):1017–55.
11. Kraemer FB. Adrenal cholesterol utilization. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Feb;265–266:42–5.
12. Shen W-J, Azhar S, Kraemer FB. Lipid droplets and steroidogenic cells. *Exp Cell Res.* 2016 Jan 15;340(2):209–14.
13. Krozowski ZS, Rundle SE, Wallace C, Castell MJ, Shen JH, Dowling J, et al. Immunolocalization of renal mineralocorticoid receptors with an antiserum against a peptide deduced from the complementary deoxyribonucleic acid sequence. *Endocrinology.* 1989 Jul;125(1):192–8.
14. Rossier BC, Staub O, Hummler E. Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: Importance in the control of blood pressure and hypertension. *FEBS Lett.* 2013 Jun 27;587(13):1929–41.
15. Mirabito Colafella KM, Danser AHJ. Recent Advances in Angiotensin Research. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2017 Jun;69(6):994-999.
16. Arroyo JP, Ronzaud C, Lagnaz D, Staub O, Gamba G. Aldosterone Paradox: Differential Regulation of Ion Transport in Distal Nephron. *Physiology.* 2011 Apr 1;26(2):115–23.
17. Studer RA, Person E, Robinson-Rechavi M, Rossier BC. Evolution of the epithelial sodium channel and the sodium pump as limiting factors of aldosterone action on sodium transport. *Physiol Genomics.*

2011 Jul 14;43(13):844–54.

18. Viengchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal*. 2007 Nov 30;5:e012.
19. Hellal-Levy C, Fagart J, Souque A, Rafestin-Oblin ME. Mechanistic aspects of mineralocorticoid receptor activation. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1250–5.
20. Ferrari P, Krozowski Z. Role of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. *Kidney Int*. 2000 Apr;57(4):1374–81.
21. Rossier BC, Bochud M, Devuyst O. The Hypertension Pandemic: An Evolutionary Perspective. *Physiol Bethesda Md*. 2017 Mar;32(2):112–25.
22. Pearce P, Funder JW. High affinity aldosterone binding sites (type I receptors) in rat heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1987 Dec;14(11–12):859–66.
23. Gueret A, Harouki N, Favre J, Galmiche G, Nicol L, Henry J-P, et al. Vascular Smooth Muscle Mineralocorticoid Receptor Contributes to Coronary and Left Ventricular Dysfunction After Myocardial Infarction. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2016 Apr;67(4):717–23.
24. Davel AP, Anwar IJ, Jaffe IZ. The endothelial mineralocorticoid receptor: mediator of the switch from vascular health to disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017 Mar;26(2):97–104.
25. Yang J, Young MJ. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J Mol Endocrinol*. 2009 Aug 1;43(2):53–64.
26. Funder JW. Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev*. 2005 Jan;10(1):15–22.
27. Gomez-Sanchez EP. Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2011 May;22(5):179–87.
28. Lienhard D, Lauterburg M, Escher G, Frey FJ, Frey BM. High salt intake down-regulates colonic mineralocorticoid receptors, epithelial sodium channels and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *PloS One*. 2012;7(5):e37898.
29. Richardson RV, Batchen EJ, Denvir MA, Gray GA, Chapman KE. Cardiac GR and MR: From Development to Pathology. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2016 Jan;27(1):35–43.
30. Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, Bénitah J-P, Perrier R, Soukaseum C, Nguyen Dinh Cat A, et al. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2005 Jun 14;111(23):3025–33.
31. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2;341(10):709–17.
32. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective

- aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2003 Apr 3;348(14):1309–21.
33. Zannad F, McMurray JJV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med*. 2011 Jan 6;364(1):11–21.
 34. McCurley A, Pires PW, Bender SB, Aronovitz M, Zhao MJ, Metzger D, et al. Direct regulation of blood pressure by smooth muscle cell mineralocorticoid receptors. *Nat Med*. 2012 Sep;18(9):1429–33.
 35. Rombouts K, Wielant A, Hellemans K, Schuppan D, Geerts A. Influence of aldosterone on collagen synthesis and proliferation of rat cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol*. 2001 Sep;134(1):224–32.
 36. Bunda S, Liu P, Wang Y, Liu K, Hinek A. Aldosterone induces elastin production in cardiac fibroblasts through activation of insulin-like growth factor-I receptors in a mineralocorticoid receptor-independent manner. *Am J Pathol*. 2007 Sep;171(3):809–19.
 37. McCurley A, Jaffe IZ. Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar 24;350(2):256–65.
 38. Bernini G, Galetta F, Franzoni F, Bardini M, Taurino C, Bernardini M, et al. Arterial stiffness, intima-media thickness and carotid artery fibrosis in patients with primary aldosteronism. *J Hypertens*. 2008 Dec;26(12):2399–405.
 39. Caprio M, Newell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, et al. Functional mineralocorticoid receptors in human vascular endothelial cells regulate intercellular adhesion molecule-1 expression and promote leukocyte adhesion. *Circ Res*. 2008 Jun 6;102(11):1359–67.
 40. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Mar 24;350(2):151–62.
 41. Nishimura H. Renin-angiotensin system in vertebrates: phylogenetic view of structure and function. *Anat Sci Int*. 2017 Mar;92(2):215–47.
 42. Gomez RA. Fate of Renin Cells During Development and Disease. *Hypertension*. 2017 Mar 1;69(3):387–95.
 43. Young CN, Davisson RL. Angiotensin-II, the Brain, and Hypertension: An Update. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2015 Nov;66(5):920–6.
 44. Feuilloley M, Vaudry H. Role of the cytoskeleton in adrenocortical cells. *Endocr Rev*. 1996 Jun;17(3):269–88.
 45. Cherradi N, Pardo B, Greenberg AS, Kraemer FB, Capponi AM. Angiotensin II Activates Cholesterol Ester Hydrolase in Bovine Adrenal Glomerulosa Cells through Phosphorylation Mediated by p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Endocrinology*. 2003 Nov;144(11):4905–15.
 46. Fleury A, Mathieu AP, Ducharme L, Hales DB, LeHoux J-G. Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 Aug;91(4–5):259–71.

47. Bollag WB. Regulation of Aldosterone Synthesis and Secretion. In: Terjung R, editor. *Comprehensive Physiology* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014 [cited 2016 Dec 19]. p. 1017–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130037>
48. Brizuela L, Rábano M, Gangoiti P, Narbona N, Macarulla JM, Trueba M, et al. Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways. *J Lipid Res*. 2007 Oct;48(10):2264–74.
49. Rossier MF. T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria. *Cell Calcium*. 2006 Aug;40(2):155–64.
50. Spät A, Fülöp L, Szanda G. The role of mitochondrial Ca(2+) and NAD(P)H in the control of aldosterone secretion. *Cell Calcium*. 2012 Jul;52(1):64–72.
51. Cherradi N, Brandenburger Y, Capponi AM. Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur J Endocrinol*. 1998;139(3):249–256.
52. Ota T, Doi M, Yamazaki F, Yarimizu D, Okada K, Murai I, et al. Angiotensin II Triggers Expression of the Adrenal Gland Zona Glomerulosa-Specific 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Isoenzyme through De Novo Protein Synthesis of the Orphan Nuclear Receptors NGFIB and NURR1. *Mol Cell Biol*. 2014 Oct 15;34(20):3880–94.
53. Davis JO, Urquhart J, Higgins JT. The effects of alteration of plasma sodium and potassium concentration on aldosterone secretion. *J Clin Invest*. 1963 May;42:597–609.
54. Mulkerrin E, Epstein FH, Clark BA. Aldosterone responses to hyperkalemia in healthy elderly humans. *J Am Soc Nephrol JASN*. 1995 Nov;6(5):1459–62.
55. Uebele VN, Nuss CE, Renger JJ, Connolly TM. Role of voltage-gated calcium channels in potassium-stimulated aldosterone secretion from rat adrenal zona glomerulosa cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 Oct;92(3):209–18.
56. Spät A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev*. 2004 Apr;84(2):489–539.
57. Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, et al. K⁺ channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science*. 2011 Feb 11;331(6018):768–72.
58. Jefcoate CR, Lee J, Cherradi N, Takemori H H, Duan H. cAMP stimulation of STAR expression and cholesterol metabolism is modulated by co-expression of labile suppressors of transcription and mRNA turnover. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Apr 10;336(1–2):53–62.
59. Manna PR, Eubank DW, Lalli E, Sassone-Corsi P, Stocco DM. Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol*. 2003;30(3):381–397.
60. Betancourt-Calle S, Calle RA, Isales CM, White S, Rasmussen H, Bollag WB. Differential effects of

- agonists of aldosterone secretion on steroidogenic acute regulatory phosphorylation. *Mol Cell Endocrinol*. 2001 Feb 28;173(1–2):87–94.
61. Nehme A, Cerutti C, Dhaouadi N, Gustin MP, Courand P-Y, Zibara K, et al. Atlas of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in human: A transcriptomic meta-analysis. *Sci Rep*. 2015 May 20;5:10035.
 62. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998 Apr;19(2):101–43.
 63. Lalli E, Barhanin J, Zennaro M-C, Warth R. Local Control of Aldosterone Production and Primary Aldosteronism. *Trends Endocrinol Metab*. 2016 Mar;27(3):123–31.
 64. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998 Apr;19(2):101–43.
 65. Bader M-F, Holz RW, Kumakura K, Vitale N. Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann N Y Acad Sci*. 2002 Oct;971:178–83.
 66. Khan MB, Lee BR, Kamitani T. A simple and sensitive method for the demonstration of norepinephrine-storing adrenomedullary chromaffin cells. *Histochem Cell Biol*. 2012 Jul;138(1):155–65.
 67. Burtis CA, editor. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 6. ed., 2. [print]. St. Louis, Miss: Saunders Elsevier; 2008. 952 p.
 68. Nussey S, Whitehead S. The adrenal gland [Internet]. BIOS Scientific Publishers; 2001 [cited 2017 May 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26/>
 69. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Böckmann M, Scherbaum WA. Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res*. 1991 Jul;265(1):1–9.
 70. Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology*. 1990 Aug;127(2):900–6.
 71. Lefebvre H, Thomas M, Duparc C, Bertherat J, Louiset E. Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions. *Front Endocrinol*. 2016;7:98.
 72. Schinner S, Bornstein SR. Cortical-chromaffin cell interactions in the adrenal gland. *Endocr Pathol*. 2005;16(2):91–8.
 73. Nussdorfer GG. Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol Rev*. 1996 Dec;48(4):495–530.
 74. Lefebvre H, Prévost G, Louiset E. Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur J Endocrinol*. 2013 Nov;169(5):R115–

75. Evrard A, Hober C, Racadot A, Lefebvre J, Vantyghem MC. [Atrial natriuretic hormone and endocrine functions]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1999 Apr;57(2):149–55.
76. Ganguly A. Atrial natriuretic peptide-induced inhibition of aldosterone secretion: a quest for mediator(s). *Am J Physiol*. 1992 Aug;263(2 Pt 1):E181-194.
77. Kvetnanský R, Pacák K, Fukuhara K, Viskupic E, Hiremagalur B, Nankova B, et al. Sympathoadrenal system in stress. Interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Ann N Y Acad Sci*. 1995 Dec 29;771:131–58.
78. Dinh Cat AN, Friederich-Persson M, White A, Touyz RM. Adipocytes, aldosterone and obesity-related hypertension. *J Mol Endocrinol*. 2016 Jul;57(1):F7–21.
79. Schinner S, Willenberg HS, Krause D, Schott M, Lamounier-Zepter V, Krug AW, et al. Adipocyte-derived products induce the transcription of the StAR promoter and stimulate aldosterone and cortisol secretion from adrenocortical cells through the Wnt-signaling pathway. *Int J Obes* 2005. 2007 May;31(5):864–70.
80. Ehrhart-Bornstein M, Arakelyan K, Krug AW, Scherbaum WA, Bornstein SR. Fat cells may be the obesity-hypertension link: human adipogenic factors stimulate aldosterone secretion from adrenocortical cells. *Endocr Res*. 2004 Nov;30(4):865–70.
81. Lamounier-Zepter V, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR. Mineralocorticoid-stimulating activity of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):567–75.
82. Ehrhart-Bornstein M, Lamounier-Zepter V, Schraven A, Langenbach J, Willenberg HS, Barthel A, et al. Human adipocytes secrete mineralocorticoid-releasing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14211–6.
83. Vogt B, Bochud M, Burnier M. The association of aldosterone with obesity-related hypertension and the metabolic syndrome. *Semin Nephrol*. 2007 Sep;27(5):529–37.
84. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Feb 27;215(1–2):135–41.
85. Marx C, Bornstein SR, Wolkersdörfer GW, Peter M, Sippell WG, Scherbaum WA. Relevance of major histocompatibility complex class II expression as a hallmark for the cellular differentiation in the human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Sep;82(9):3136–40.
86. Hayashi Y, Hiyoshi T, Takemura T, Kurashima C, Hirokawa K. Focal lymphocytic infiltration in the adrenal cortex of the elderly: immunohistological analysis of infiltrating lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 1989 Jul;77(1):101–5.
87. González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Gschwend JE, Gwosdow A, Jirikowski G, et al. IL-1 is expressed in human adrenal gland in vivo. Possible role in a local immune-adrenal axis. *Clin Exp Immunol*. 1995 Jan;99(1):137–41.

88. Gonzalez-Hernandez JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Jirikowski G, Scherbaum WA. Interleukin-6 messenger ribonucleic acid expression in human adrenal gland in vivo: new clue to a paracrine or autocrine regulation of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Nov;79(5):1492–7.
89. González-Hernández JA, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Scherbaum WA, Bornstein SR. Human adrenal cells express tumor necrosis factor-alpha messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Feb;81(2):807–13.
90. Päth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jul;82(7):2343–9.
91. Natarajan R, Ploszaj S, Horton R, Nadler J. Tumor necrosis factor and interleukin-1 are potent inhibitors of angiotensin-II-induced aldosterone synthesis. *Endocrinology.* 1989 Dec;125(6):3084–9.
92. Gilfillan AM, Tkaczyk C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2006 Mar;6(3):218–30.
93. Theoharides TC, Valent P, Akin C. Mast Cells, Mastocytosis, and Related Disorders. *N Engl J Med.* 2015 Jul 9;373(2):163–72.
94. Hinson JP, Vinson GP, Pudney J, Whitehouse BJ. Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat. *J Endocrinol.* 1989 May;121(2):253–60.
95. Wernersson S, Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul;14(7):478–94.
96. Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. *Immunol Rev.* 2007 Jun;217:65–78.
97. Tang L, Jennings TA, Eaton JW. Mast cells mediate acute inflammatory responses to implanted biomaterials. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jul 21;95(15):8841–6.
98. Lippert U, Artuc M, Grützkau A, Babina M, Guhl S, Haase I, et al. Human skin mast cells express H2 and H4, but not H3 receptors. *J Invest Dermatol.* 2004 Jul;123(1):116–23.
99. Johnson AR, Erdös EG. Release of histamine from mast cells by vasoactive peptides. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1973 Apr;142(4):1252–6.
100. Li W-W, Guo T-Z, Liang D, Sun Y, Kingery WS, Clark JD. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology.* 2012 Apr;116(4):882–95.
101. Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept.* 1997 Jun 18;70(2–3):75–90.
102. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol.* 2017 Jan 17;

103. Ribatti D. The development of human mast cells. An historical reappraisal. *Exp Cell Res*. 2016 Mar 15;342(2):210–5.
104. Linenberger ML, Jacobson FW, Bennett LG, Broudy VC, Martin FH, Abkowitz JL. Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts. *Exp Hematol*. 1995 Sep;23(10):1104–14.
105. Broudy VC, Kovach NL, Bennett LG, Lin N, Jacobsen FW, Kidd PG. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor. *Blood*. 1994 Apr 15;83(8):2145–52.
106. Kim JS, Kubota H, Nam SY, Doi K, Saegusa J. Expression of cytokines and proteases in mast cells in the lesion of subcapsular cell hyperplasia in mouse adrenal glands. *Toxicol Pathol*. 2000 Apr;28(2):297–303.
107. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*. 1997 Mar;61(3):233–45.
108. Caughey GH, Raymond WW, Wolters PJ. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Jul 14;1480(1–2):245–57.
109. Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, Schäfer U, Reid AC, Machida T, et al. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest*. 2006 Apr;116(4):1063–70.
110. Duparc C, Moreau L, Dzib JFG, Boyer H-G, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 Apr;100(4):E550-560.
111. Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, et al. Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Oct;86(10):5001–7.
112. Lefebvre H, Cartier D, Duparc C, Contesse V, Lihrmann I, Delarue C, et al. Effect of serotonin4 (5-HT4) receptor agonists on aldosterone secretion in idiopathic hyperaldosteronism. *Endocr Res*. 2000 Nov;26(4):583–7.
113. Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology - Oxford Reference [Internet]. [cited 2017 May 15]. Available from: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780198529170.001.0001/acref-9780198529170>
114. Rossi GP, Sacchetto A, Cesari M, Pessina AC. Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovasc Res*. 1999 Aug 1;43(2):300–7.
115. Mazzocchi G, Malendowicz LK, Musajo FG, Gottardo G, Markowska A, Nussdorfer GG. Role of endothelins in regulation of vascular tone in the in situ perfused rat adrenals. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1 Pt 1):E1-5.

116. Rossi GP, Cavallin M, Nussdorfer GG, Pessina AC. The endothelin-aldosterone axis and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001 Nov;38 Suppl 2:S49-52.
117. Kopf PG, Gauthier KM, Zhang DX, Falck JR, Campbell WB. Angiotensin II regulates adrenal vascular tone through zona glomerulosa cell-derived EETs and DHETs. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2011 Feb;57(2):323–9.
118. Zhang DX, Gauthier KM, Falck JR, Siddam A, Campbell WB. Steroid-producing cells regulate arterial tone of adrenal cortical arteries. *Endocrinology*. 2007 Aug;148(8):3569–76.
119. Curro D, Ipavec V, Preziosi P. Neurotransmitters of the non-adrenergic non-cholinergic relaxation of proximal stomach. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2008;12(Suppl 1):53–62.
120. Mackay TW, Hulks G, Douglas NJ. Non-adrenergic, non-cholinergic function in the human airway. *Respir Med*. 1998 Mar;92(3):461–6.
121. Burnstock G. Autonomic Neurotransmission: 60 Years Since Sir Henry Dale. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009 Feb;49(1):1–30.
122. Barnes PJ. The third nervous system in the lung : physiology and clinical perspectives [Internet]. [cited 2017 Jan 25]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1020504/pdf/thorax00224-0001.pdf>
123. Katzung BG. Basic & clinical pharmacology. New York [u.a.: McGraw-Hill Medical; 2012.
124. Joos GF, Germonpré PR, Pauwels RA. Neural mechanisms in asthma. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2000 Jun;30 Suppl 1:60–5.
125. Widdicombe JG. Autonomic Regulation. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Nov 1;158(supplement_2):S171–5.
126. Offermanns S, Rosenthal W, editors. Encyclopedia of molecular pharmacology. 2nd ed. Berlin ; New York: Springer; 2008. 2 p. (Springer reference).
127. Tomita R, Kurosu Y, Munakata K. Relationship between nitric oxide and non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves in human lower esophageal sphincter. *J Gastroenterol*. 1997 Feb;32(1):1–5.
128. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev*. 2007 Apr;87(2):659–797.
129. Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev*. 1996 Mar;48(1):113–78.
130. Pablo Huidobro-Toro J, Verónica Donoso M. Sympathetic co-transmission: the coordinated action of ATP and noradrenaline and their modulation by neuropeptide Y in human vascular neuroeffector junctions. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1–3):27–35.
131. Lundberg JM, Änggård A, Fahrenkrug J, Hökfelt T, Mutt V. Vasoactive intestinal polypeptide in

- cholinergic neurons of exocrine glands: Functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Mar;77(3):1651–5.
132. Parker TL, Kesse WK, Mohamed AA, Afework M. The innervation of the mammalian adrenal gland. *J Anat*. 1993 Oct;183 (Pt 2):265–76.
 133. Unsicker K. On the innervation of the rat and pig adrenal cortex. *Z Für Zellforsch Mikrosk Anat*. 1971 Mar 1;116(1):151–6.
 134. Robinson PM, Perry RA, Hardy KJ, Coghlan JP, Scoggins BA. The innervation of the adrenal cortex in the sheep, *Ovis ovis*. *J Anat*. 1977 Sep;124(Pt 1):117–29.
 135. Parker TL, Mohamed AA, Coupland RE. The innervation of the adrenal gland. IV. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. *J Anat*. 1990 Oct;172:17–24.
 136. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev*. 1998;19(2):101–143.
 137. McNicol AM, Richmond J, Charlton BG. A study of general innervation of the human adrenal cortex using PGP 9.5 immunohistochemistry. *Acta Anat (Basel)*. 1994;151(2):120–3.
 138. Charlton BG, McGadey J, Russell D, Neal DE. Noradrenergic innervation of the human adrenal cortex as revealed by dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *J Anat*. 1992 Jun;180 (Pt 3):501–6.
 139. Charlton BG, Nkomazana OF, McGadey J, Neal DE. A preliminary study of acetylcholinesterase-positive innervation in the human adrenal cortex. *J Anat*. 1991 Jun;176:99–104.
 140. Gilchrist AB, Leake A, Charlton BG. Innervation of the human adrenal cortex: simultaneous visualisation using acetylcholinesterase histochemistry and dopamine beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Acta Anat (Basel)*. 1993;146(1):31–5.
 141. Kondo H. Immunohistochemical analysis of the localization of neuropeptides in the adrenal gland. *Arch Histol Jpn Nihon Soshikigaku Kiroku*. 1985 Dec;48(5):453–81.
 142. Gilchrist AB, Leake A, Charlton BG. Innervation of the human adrenal cortex: simultaneous visualisation using acetylcholinesterase histochemistry and dopamine beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Acta Anat (Basel)*. 1993;146(1):31–5.
 143. Souvatzoglou A. The Sympathoadrenal System: Integrative Regulation of the Cortical and the Medullary Adrenal Functions. In: *Adrenal Glands: Diagnostic Aspects and Surgical Therapy* [Internet]. Springer; 2005 [cited 2017 Jan 30]. p. 33–39. Available from: http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/3-540-26861-8_4.pdf
 144. Engeland WC. Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res*. 1998;30(06/07):311–314.
 145. Charlton BG, McGadey J, Russell D, Neal DE. Noradrenergic innervation of the human adrenal cortex as revealed by dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *J Anat*. 1992 Jun;180 (Pt 3):501–

6.

146. Tóth IE, Vizi ES, Hinson JP, Vinson GP. Innervation of the adrenal cortex, its physiological relevance, with primary focus on the noradrenergic transmission. *Microsc Res Tech*. 1997 Mar 15;36(6):534–45.
147. Kesse WK, Parker TL, Coupland RE. The innervation of the adrenal gland. I. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the rat adrenal gland. *J Anat*. 1988 Apr;157:33–41.
148. Charlton BG, Nkomazana OF, McGadey J, Neal DE. A preliminary study of acetylcholinesterase-positive innervation in the human adrenal cortex. *J Anat*. 1991 Jun;176:99–104.
149. Engeland WC. Functional innervation of the adrenal cortex by the splanchnic nerve. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. 1998 Jul;30(6–7):311–4.
150. Ulrich-Lai YM, Engeland WC. Hyperinnervation during adrenal regeneration influences the rate of functional recovery. *Neuroendocrinology*. 2000 Feb;71(2):107–23.
151. Bornstein SR, Engeland WC, Ehrhart-Bornstein M, Herman JP. Dissociation of ACTH and glucocorticoids. *Trends Endocrinol Metab TEM*. 2008 Jul;19(5):175–80.
152. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ, et al. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci*. 1999 May;11(5):1535–44.
153. Saria A, Wilson SP, Molnar A, Viveros OH, Lembeck F. Substance P and opiate-like peptides in human adrenal medulla. *Neurosci Lett*. 1980 Nov;20(2):195–200.
154. Linnoila RI, Diaugustine RP, Hervonen A, Miller RJ. Distribution of [Met5]- and [Leu5]-enkephalin-, vasoactive intestinal polypeptide- and substance P-like immunoreactivities in human adrenal glands. *Neuroscience*. 1980;5(12):2247–59.
155. Heym C, Braun B, Shuyi Y, Klimaschewski L, Colombo-Benkmann M. Immunohistochemical correlation of human adrenal nerve fibres and thoracic dorsal root neurons with special reference to substance P. *Histochem Cell Biol*. 1995 Sep;104(3):233–43.
156. Colombo-Benkmann M, Klimaschewski L, Heym C. Immunohistochemical heterogeneity of nerve cells in the human adrenal gland with special reference to substance P. *J Histochem Cytochem*. 1996 Apr 1;44(4):369–75.
157. Basic Neurochemistry - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2017 May 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20385/>
158. Burbach JPH. What are neuropeptides? *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;789:1–36.
159. Satake H, Ogasawara M, Kawada T, Masuda K, Aoyama M, Minakata H, et al. Tachykinin and tachykinin receptor of an ascidian, *Ciona intestinalis*: evolutionary origin of the vertebrate tachykinin family. *J Biol Chem*. 2004 Dec 17;279(51):53798–805.
160. Satake H, Kawada T, Nomoto K, Minakata H. Insight into tachykinin-related peptides, their receptors, and invertebrate tachykinins: a review. *Zoolog Sci*. 2003 May;20(5):533–49.

161. Van Loy T, Vandersmissen HP, Poels J, Van Hiel MB, Verlinden H, Vanden Broeck J. Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: a current view. *Peptides*. 2010 Mar;31(3):520–4.
162. Satake H, Aoyama M, Sekiguchi T, Kawada T. Insight into molecular and functional diversity of tachykinins and their receptors. *Protein Pept Lett*. 2013 Jun;20(6):615–27.
163. Zhou W, Li S, Liu Y, Qi X, Chen H, Cheng CHK, et al. The evolution of tachykinin/tachykinin receptor (TAC/TACR) in vertebrates and molecular identification of the TAC3/TACR3 system in zebrafish (*Danio rerio*). *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Sep 25;361(1–2):202–12.
164. Nawa H, Kotani H, Nakanishi S. Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature*. 1984 Jan 20;312(5996):729–34.
165. Harmar AJ, Armstrong A, Pascall JC, Chapman K, Rosie R, Curtis A, et al. cDNA sequence of human beta-preprotachykinin, the common precursor to substance P and neurokinin A. *FEBS Lett*. 1986 Nov 10;208(1):67–72.
166. Krause JE, Chirgwin JM, Carter MS, Xu ZS, Hershey AD. Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Feb;84(3):881–5.
167. Butler MG, Nelson TA, Driscoll DJ, Manzardo AM. EVALUATION OF PLASMA SUBSTANCE P AND BETA-ENDORPHIN LEVELS IN CHILDREN WITH PRADER-WILLI SYNDROME. *J Rare Disord*. 2015 Sep;3(2).
168. Amin AH, Crawford TBB, Gaddum JH. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system of the dog. *J Physiol*. 1954 Dec 30;126(3):596–618.
169. Chang MM, Leeman SE, Niall HD. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol*. 1971 Jul 21;232(29):86–7.
170. Fong TM, Anderson SA, Yu H, Huang RR, Strader CD. Differential activation of intracellular effector by two isoforms of human neurokinin-1 receptor. *Mol Pharmacol*. 1992 Jan;41(1):24–30.
171. Snider RM, Constantine JW, Lowe JA, Longo KP, Lebel WS, Woody HA, et al. A potent nonpeptide antagonist of the substance P (NK1) receptor. *Science*. 1991 Jan 25;251(4992):435–7.
172. Otsuka M, Yoshioka K. Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*. 1993 Apr;73(2):229–308.
173. Okumura M, Arakawa R, Ito H, Seki C, Takahashi H, Takano H, et al. Quantitative analysis of NK1 receptor in the human brain using PET with 18F-FE-SPA-RQ. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. 2008 Nov;49(11):1749–55.
174. Helme RD, Thomas K. Substance P in human hypothalamus. *Clin Exp Neurol*. 1986;22:97–101.
175. Fergani C, Mazzella L, Coolen LM, McCosh RB, Hardy SL, Newcomb N, et al. Do Substance P and Neurokinin A Play Important Roles in the Control of LH Secretion in Ewes? *Endocrinology*. 2016 Dec;157(12):4829–41.
176. Coiro V, Capretti L, Volpi R, Davoli C, Marcato A, Cavazzini U, et al. Stimulation of ACTH/cortisol by intravenously infused substance P in normal men: inhibition by sodium valproate.

- Neuroendocrinology. 1992 Oct;56(4):459–63.
177. Mistrova E, Kruzliak P, Chottova Dvorakova M. Role of substance P in the cardiovascular system. *Neuropeptides*. 2016 Aug;58:41–51.
178. Reinecke M, Weihe E, Forssmann WG. Substance P-immunoreactive nerve fibers in the heart. *Neurosci Lett*. 1980 Dec;20(3):265–9.
179. Newby DE, Sciberras DG, Ferro CJ, Gertz BJ, Sommerville D, Majumdar A, et al. Substance P-induced vasodilatation is mediated by the neurokinin type 1 receptor but does not contribute to basal vascular tone in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1999 Sep;48(3):336–44.
180. Newby DE, Sciberras DG, Mendel CM, Gertz BJ, Boon NA, Webb DJ. Intra-arterial substance P mediated vasodilatation in the human forearm: pharmacology, reproducibility and tolerability. *Br J Clin Pharmacol*. 1997 May;43(5):493–9.
181. Crossman DC, Larkin SW, Fuller RW, Davies GJ, Maseri A. Substance P dilates epicardial coronary arteries and increases coronary blood flow in humans. *Circulation*. 1989 Sep;80(3):475–84.
182. Okumura M, Arakawa R, Ito H, Seki C, Takahashi H, Takano H, et al. Quantitative Analysis of NK1 Receptor in the Human Brain Using PET with 18F-FE-SPA-RQ. *J Nucl Med*. 2008 Oct 16;49(11):1749–55.
183. Ducrotté P. Constipation sous opioïdes : physiopathologie et prise en charge actuelle. *Hépatogastro Oncol Dig*. 2010 Mar 1;17(1):48–56.
184. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and their receptors: contributions to physiological control and the mechanisms of disease. *Physiol Rev*. 2014 Jan;94(1):265–301.
185. Holzer P, Holzer-Petsche U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. *Pharmacol Ther*. 1997;73(3):219–63.
186. Groneberg DA, Harrison S, Dinh QT, Geppetti P, Fischer A. Tachykinins in the respiratory tract. *Curr Drug Targets*. 2006 Aug;7(8):1005–10.
187. Amadesi S, Moreau J, Tognetto M, Springer J, Trevisani M, Naline E, et al. NK1 receptor stimulation causes contraction and inositol phosphate increase in medium-size human isolated bronchi. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Apr;163(5):1206–11.
188. Lesouhaitier O, Esneu M, Kodjo MK, Hamel C, Contesse V, Yon L, et al. Neuroendocrine communication in the frog adrenal gland. *Zoolog Sci*. 1995 Jun;12(3):255–64.
189. Leboulenger F, Vaglini L, Conlon JM, Homo-Delarche F, Wang Y, Kerdelhue B, et al. Immunohistochemical distribution, biochemical characterization, and biological action of tachykinins in the frog adrenal gland. *Endocrinology*. 1993 Nov;133(5):1999–2008.
190. Murabayashi H, Kuramoto H, Kawano H, Sasaki M, Kitamura N, Miyakawa K, et al. Immunohistochemical features of substance P-immunoreactive chromaffin cells and nerve fibers in

- the rat adrenal gland. *Arch Histol Cytol.* 2007 Oct;70(3):183–96.
191. Whitworth EJ, Kosti O, Renshaw D, Hinson JP. Adrenal neuropeptides: regulation and interaction with ACTH and other adrenal regulators. *Microsc Res Tech.* 2003 Jun 15;61(3):259–67.
 192. Leboulenger F, Vaglini L, Conlon JM, Homo-Delarche F, Wang Y, Kerdelhue B, et al. Immunohistochemical distribution, biochemical characterization, and biological action of tachykinins in the frog adrenal gland. *Endocrinology.* 1993 Nov;133(5):1999–2008.
 193. Nussdorfer GG, Malendowicz LK, Belloni AS, Mazzocchi G, Rebuffat P. Effects of substance P on the rat adrenal zona glomerulosa in vivo. *Peptides.* 1988 Oct;9(5):1145–9.
 194. Mitchell AJ, Lone AM, Tinoco AD, Saghatelian A. Proteolysis controls endogenous substance P levels. *PLoS One.* 2013;8(7):e68638.
 195. Cascieri MA, Bull HG, Mumford RA, Patchett AA, Thornberry NA, Liang T. Carboxyl-terminal tripeptidyl hydrolysis of substance P by purified rabbit lung angiotensin-converting enzyme and the potentiation of substance P activity in vivo by captopril and MK-422. *Mol Pharmacol.* 1984 Mar;25(2):287–93.
 196. Skidgel RA, Erdös EG. Angiotensin converting enzyme (ACE) and neprilysin hydrolyze neuropeptides: a brief history, the beginning and follow-ups to early studies. *Peptides.* 2004 Mar;25(3):521–5.
 197. Pailleux F, Lemoine J, Beaudry F. Investigation of the metabolic biotransformation of substance P in liver microsomes by liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry. *Biomed Chromatogr BMC.* 2013 Jan;27(1):39–47.
 198. Hallberg M. Neuropeptides: metabolism to bioactive fragments and the pharmacology of their receptors. *Med Res Rev.* 2015 May;35(3):464–519.
 199. The role of neurokinin B signalling in reproductive neuroendocrinology. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 May 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=24356581>
 200. Page NM, Woods RJ, Lowry PJ. A regulatory role for neurokinin B in placental physiology and pre-eclampsia. *Regul Pept.* 2001 Apr 20;98(3):97–104.
 201. Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jun 28;494(2–3):233–9.
 202. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2017 May 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=12716968>
 203. Zhang Y, Lu L, Furlonger C, Wu GE, Paige CJ. Hemokinin is a hematopoietic-specific tachykinin that regulates B lymphopoiesis. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):392–7.
 204. Page NM. Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides. *Vascul Pharmacol.* 2006 Oct;45(4):200–8.

205. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2004 Jul;61(13):1652–63.
206. Alexander SP, Davenport AP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, et al. The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol*. 2015 Dec;172(24):5744–869.
207. Garcia-Recio S, Gascón P. Biological and Pharmacological Aspects of the NK1-Receptor. *BioMed Res Int*. 2015;2015:495704.
208. Kage R, Leeman SE, Boyd ND. Biochemical characterization of two different forms of the substance P receptor in rat submaxillary gland. *J Neurochem*. 1993 Jan;60(1):347–51.
209. Caberlotto L, Hurd YL, Murdock P, Wahlin JP, Melotto S, Corsi M, et al. Neurokinin 1 receptor and relative abundance of the short and long isoforms in the human brain. *Eur J Neurosci*. 2003 May;17(9):1736–46.
210. Bensaid M, Faucheux BA, Hirsch E, Agid Y, Soubrié P, Oury-Donat F. Expression of tachykinin NK2 receptor mRNA in human brain. *Neurosci Lett*. 2001 Apr 27;303(1):25–8.
211. Gerard NP, Eddy RL, Shows TB, Gerard C. The human neurokinin A (substance K) receptor. Molecular cloning of the gene, chromosome localization, and isolation of cDNA from tracheal and gastric tissues. *J Biol Chem*. 1990 Nov 25;265(33):20455–62.
212. Hoover DB, Chang Y, Hancock JC, Zhang L. Actions of tachykinins within the heart and their relevance to cardiovascular disease. *Jpn J Pharmacol*. 2000 Dec;84(4):367–73.
213. Mechiche H, Grassin-Delyle S, Pinto FM, Buenestado A, Candenas L, Devillier P. Smooth muscle neurokinin-2 receptors mediate contraction in human saphenous veins. *Pharmacol Res*. 2011 May;63(5):414–22.
214. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology*. 2010 Aug;151(8):3479–89.
215. Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the Hypothalamic Regulation of Reproduction. *Brain Res*. 2010 Dec 10;1364:116–28.
216. Hrabovszky E, Borsay B, Rácz K, Herczeg L, Ciofi P, Bloom SR, et al. Substance P immunoreactivity exhibits frequent colocalization with kisspeptin and neurokinin B in the human infundibular region. *PLoS One*. 2013;8(8):e72369.
217. Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):6245–50.
218. Valentin-Hansen L, Frimurer TM, Mokrosinski J, Holliday ND, Schwartz TW. Biased Gs versus Gq proteins and β -arrestin signaling in the NK1 receptor determined by interactions in the water hydrogen bond network. *J Biol Chem*. 2015 Oct 2;290(40):24495–508.

219. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. *Neuropeptides*. 1997 Dec;31(6):537–63.
220. Quartara L, Maggi CA. The tachykinin NK1 receptor. Part II: Distribution and pathophysiological roles. *Neuropeptides*. 1998 Feb;32(1):1–49.
221. McConlogue K, Corvera CU, Gamp PD, Grady EF, Bunnett NW. Desensitization of the neurokinin-1 receptor (NK1-R) in neurons: effects of substance P on the distribution of NK1-R, Galphq/11, G-protein receptor kinase-2/3, and beta-arrestin-1/2. *Mol Biol Cell*. 1998 Aug;9(8):2305–24.
222. Steinhoff MS, von Mentzer B, Geppetti P, Pothoulakis C, Bunnett NW. Tachykinins and Their Receptors: Contributions to Physiological Control and the Mechanisms of Disease. *Physiol Rev*. 2014 Jan 1;94(1):265–301.
223. Skerrett PJ. Substance P causes pain--but also heals. *Science*. 1990 Aug 10;249(4969):625.
224. Brain SD, Cox HM. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147(Suppl 1):S202–11.
225. Coveñas R, Muñoz M. Cancer progression and substance P. *Histol Histopathol*. 2014 Jul;29(7):881–90.
226. Hennig IM, Laissue JA, Horisberger U, Reubi JC. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*. 1995 Jun 9;61(6):786–92.
227. Esteban F, Muñoz M, González-Moles MA, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Mar;25(1):137–45.
228. Vinik AI, Gonin J, England BG, Jackson T, McLeod MK, Cho K. Plasma substance-P in neuroendocrine tumors and idiopathic flushing: the value of pentagastrin stimulation tests and the effects of somatostatin analog. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Jun;70(6):1702–9.
229. Modlin IM, Oberg K, Taylor A, Drozdov I, Bodei L, Kidd M. Neuroendocrine tumor biomarkers: current status and perspectives. *Neuroendocrinology*. 2014;100(4):265–77.
230. Feldman JM, O'Dorisio TM. Role of neuropeptides and serotonin in the diagnosis of carcinoid tumors. *Am J Med*. 1986 Dec 22;81(6B):41–8.
231. Wang Y, Wang DH. Role of substance P in renal injury during DOCA-salt hypertension. *Endocrinology*. 2012 Dec;153(12):5972–9.
232. Dehlin HM, Manteufel EJ, Monroe AL, Reimer MH, Levick SP. Substance P acting via the neurokinin-1 receptor regulates adverse myocardial remodeling in a rat model of hypertension. *Int J Cardiol*. 2013 Oct 12;168(5):4643–51.
233. Brattström A, Seidenbecher T. Central substance P increased blood pressure, heart rate and splanchnic nerve activity in anaesthetized rats without impairment of the baroreflex regulation. *Neuropeptides*. 1992 Oct;23(2):81–6.

234. Moyes AJ, Stanford SC, Hosford PS, Hobbs AJ, Ramage AG. Raised arterial blood pressure in neurokinin-1 receptor-deficient mice (NK1R(-/-)): evidence for a neural rather than a vascular mechanism. *Exp Physiol*. 2016 May 1;101(5):588–98.
235. Faulhaber HD, Rathsack R, Rostock G, Homuth V, Pfeiffer D, Naumann E, et al. Evidence of decreased plasma substance P levels in human essential hypertension and influence of prazosin treatment. *Biomed Biochim Acta*. 1983;42(7–8):1019–25.
236. Kohlmann O, Cesaretti ML, Ginoza M, Tavares A, Zanella MT, Ribeiro AB, et al. Role of substance P in blood pressure regulation in salt-dependent experimental hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1997 Jan;29(1 Pt 2):506–9.
237. Dehlin HM, Levick SP. Substance P in heart failure: the good and the bad. *Int J Cardiol*. 2014 Jan 1;170(3):270–7.
238. Quartara L, Altamura M. Tachykinin receptors antagonists: from research to clinic. *Curr Drug Targets*. 2006 Aug;7(8):975–92.
239. Ramalho R, Soares R, Couto N, Moreira A. Tachykinin receptors antagonism for asthma: a systematic review. *BMC Pulm Med*. 2011 Aug 2;11:41.
240. Prague JK, Roberts RE, Comninou AN, Clarke S, Jayasena CN, Nash Z, et al. Neurokinin 3 receptor antagonism as a novel treatment for menopausal hot flashes: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2017 Apr 3;
241. Huang S-C, Korlipara VL. Neurokinin-1 receptor antagonists: a comprehensive patent survey. *Expert Opin Ther Pat*. 2010 Aug;20(8):1019–45.
242. Patel L, Lindley C. Aprepitant – a novel NK1-receptor antagonist. *Expert Opin Pharmacother*. 2003 Dec;4(12):2279–96.
243. Hargreaves R, Ferreira JCA, Hughes D, Brands J, Hale J, Mattson B, et al. Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Mar 1;1222(1):40–8.
244. Hargreaves R, Ferreira JCA, Hughes D, Brands J, Hale J, Mattson B, et al. Development of aprepitant, the first neurokinin-1 receptor antagonist for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Mar 1;1222(1):40–8.
245. Miller AD, Leslie RA. The area postrema and vomiting. *Front Neuroendocrinol*. 1994 Dec;15(4):301–20.
246. The oral NK1 antagonist, aprepitant, given with standard antiemetics provides protection against nausea and vomiting over multiple cycles of cisplatin-based chemotherapy: a combined analysis of two randomised, placebo-controlled phase III clinical trials [Internet]. [cited 2017 May 24]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804903009316>
247. Majumdar AK, Howard L, Goldberg MR, Hickey L, Constanzer M, Rothenberg PL, et al.

- Pharmacokinetics of Aprepitant After Single and Multiple Oral Doses in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2006 Mar;46(3):291–300.
248. Huskey S-EW, Dean BJ, Doss GA, Wang Z, Hop CECA, Anari R, et al. The metabolic disposition of aprepitant, a substance P receptor antagonist, in rats and dogs. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem*. 2004 Feb;32(2):246–58.
 249. House L, Ramirez J, Seminerio M, Mirkov S, Ratain MJ. In vitro glucuronidation of aprepitant: a moderate inhibitor of UGT2B7. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst*. 2015;45(11):990–8.
 250. Patel L, Lindley C. Aprepitant--a novel NK1-receptor antagonist. *Expert Opin Pharmacother*. 2003 Dec;4(12):2279–96.
 251. Patel P, Leeder JS, Piquette-Miller M, Dupuis LL. Aprepitant and fosaprepitant drug interactions: a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*. 2017 May 4;
 252. Ball WA, Snavelly DB, Hargreaves RJ, Szegedi A, Lines C, Reines SA. Addition of an NK1 receptor antagonist to an SSRI did not enhance the antidepressant effects of SSRI monotherapy: results from a randomized clinical trial in patients with major depressive disorder. *Hum Psychopharmacol*. 2014 Nov;29(6):568–77.
 253. Vinson GP, Pudney JA, Whitehouse BJ. The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *J Endocrinol*. 1985 May;105(2):285–94.
 254. Bacon SJ, Smith AD. Preganglionic sympathetic neurones innervating the rat adrenal medulla: immunocytochemical evidence of synaptic input from nerve terminals containing substance P, GABA or 5-hydroxytryptamine. *J Auton Nerv Syst*. 1988 Sep;24(1–2):97–122.
 255. Gomez-Sanchez CE, Qi X, Velarde-Miranda C, Plonczynski MW, Parker CR, Rainey W, et al. Development of monoclonal antibodies against human CYP11B1 and CYP11B2. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Mar 5;383(1–2):111–7.
 256. Campbell DE, Raftery N, Tustin R, Tustin NB, Desilvio ML, Cnaan A, et al. Measurement of plasma-derived substance P: biological, methodological, and statistical considerations. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2006 Nov;13(11):1197–203.
 257. Hinson JP, Cameron LA, Purbrick A, Kapas S. The role of neuropeptides in the regulation of adrenal zona glomerulosa function: effects of substance P, neuropeptide Y, neurotensin, Met-enkephalin, Leu-enkephalin and corticotrophin-releasing hormone on aldosterone secretion in the intact perfused rat adrenal. *J Endocrinol*. 1994 Jan;140(1):91–6.
 258. Kodjo MK, Desrues L, Lavagno L, Fasolo A, Conlon JM, Tonon MC, et al. Ranakinin, a naturally occurring tachykinin, stimulates phospholipase C activity in the frog adrenal gland. *Endocrinology*. 1998 Feb;139(2):505–12.
 259. Lai J-P, Lai S, Tuluc F, Tansky MF, Kilpatrick LE, Leeman SE, et al. Differences in the length of the carboxyl terminus mediate functional properties of neurokinin-1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

2008 Aug 26;105(34):12605–10.

260. Vleugels K, Schinner S, Krause D, Morawietz H, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, et al. ERK1/2 MAPKs and Wnt signaling pathways are independently involved in adipocytokine-mediated aldosterone secretion. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* 2011 Nov;119(10):644–8.
261. Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med.* 2010 Jan;16(1):67–74.
262. Nussdorfer GG. Paracrine control of adrenal cortical function by medullary chromaffin cells. *Pharmacol Rev.* 1996 Dec;48(4):495–530.
263. Dzurik MV, Diedrich A, Black B, Paranjape SY, Raj SR, Byrne DW, et al. Endogenous substance P modulates human cardiovascular regulation at rest and during orthostatic load. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 2007 Jun;102(6):2092–7.
264. Jacob D, Busciglio I, Burton D, Halawi H, Oduyebo I, Rhoten D, et al. Effects of NK1 receptors on gastric motor functions and satiation in healthy humans: results from a controlled trial with the NK1 antagonist aprepitant. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2017 Nov 1;313(5):G505–10.
265. Gullner HG, Campbell WB, Pettinger WA. Effects of substance P on renin release and renal function in anesthetized dogs. *Life Sci.* 1979 Jan 15;24(3):237–45.
266. Pinet F, Mizrahi J, Labouladine I, Menard J, Corvol P. Regulation of prorenin secretion in cultured human transfected juxtaglomerular cells. *J Clin Invest.* 1987 Sep;80(3):724–31.
267. Shah AJ, Kriska T, Gauthier KM, Falck JR, Campbell WB. Effect of Angiotensin II and ACTH on Adrenal Blood Flow in the Male Rat Adrenal Gland In Vivo. *Endocrinology.* 2018 01;159(1):217–26.
268. Bayard F, Cooke CR, Tiller DJ, Beitins IZ, Kowarski A, Walker WG, et al. The regulation of aldosterone secretion in anephric man. *J Clin Invest.* 1971 Aug;50(8):1585–95.
269. Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med.* 2001 Dec 6;345(23):1689–97.
270. Castagliuolo I, Valenick L, Liu J, Pothoulakis C. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates substance P-induced mitogenic responses in U-373 MG cells. *J Biol Chem.* 2000 Aug 25;275(34):26545–50.
271. Koon H-W, Zhao D, Na X, Moyer MP, Pothoulakis C. Metalloproteinases and transforming growth factor- α mediate substance P-induced mitogen-activated protein kinase activation and proliferation in human colonocytes. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45519–27.
272. Castagliuolo I, Morteau O, Keates AC, Valenick L, Wang C-C, Zacks J, et al. Protective effects of neurokinin-1 receptor during colitis in mice: role of the epidermal growth factor receptor. *Br J Pharmacol.* 2002 May;136(2):271–9.
273. Dubon MJ, Park K-S. The mechanisms of substance P-mediated migration of bone marrow-derived

- mesenchymal stem cell-like ST2 cells. *Int J Mol Med*. 2016 Apr;37(4):1105–11.
274. Amadesi S, Reni C, Katare R, Meloni M, Oikawa A, Beltrami AP, et al. Role for substance p-based nociceptive signaling in progenitor cell activation and angiogenesis during ischemia in mice and in human subjects. *Circulation*. 2012 Apr 10;125(14):1774–86, S1-19.
 275. Lerario AM, Finco I, LaPensee C, Hammer GD. Molecular Mechanisms of Stem/Progenitor Cell Maintenance in the Adrenal Cortex. *Front Endocrinol*. 2017;8:52.
 276. Suvas S. Role of Substance P Neuropeptide in Inflammation, Wound Healing, and Tissue Homeostasis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 01;199(5):1543–52.
 277. Skrabanek P, Cannon D, Kirrane J, Legge D, Powell D. Circulating immunoreactive substance P in man. *Ir J Med Sci*. 1976 Dec;145(12):399–408.
 278. Charloux A, Gronfier C, Lonsdorfer-Wolf E, Piquard F, Brandenberger G. Aldosterone release during the sleep-wake cycle in humans. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 1):E43-49.
 279. Lovell TM, Woods RJ, Butlin DJ, Brayley KJ, Manyonda IT, Jarvis J, et al. Identification of a novel mammalian post-translational modification, phosphocholine, on placental secretory polypeptides. *J Mol Endocrinol*. 2007 Sep;39(3):189–98.
 280. Marzioni D, Fiore G, Giordano A, Nabissi M, Florio P, Verdenelli F, et al. Placental expression of substance P and vasoactive intestinal peptide: evidence for a local effect on hormone release. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Apr;90(4):2378–83.
 281. Lowry P. Morning sickness is just the side effect of a new tachykinin that the placenta secretes to improve local blood flow. *J Mol Endocrinol*. 2018 Jan;60(1):C1–2.
 282. Elsheikh A, Creatsas G, Mastorakos G, Milingos S, Loutradis D, Michalas S. The renin-aldosterone system during normal and hypertensive pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2001 Jan;264(4):182–5.
 283. Delarue C, Contesse V, Lefebvre H, Lenglet S, Grumolato L, Kuhn JM, et al. Pharmacological profile of serotonergic receptors in the adrenal gland. *Endocr Res*. 1998 Nov;24(3–4):687–94.
 284. Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, et al. Production and Metabolism of Serotonin (5-HT) by the Human Adrenal Cortex: Paracrine Stimulation of Aldosterone Secretion by 5-HT. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Oct 1;86(10):5001–7.
 285. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Soubrane C, Legrand A, Kuhn JM, et al. 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*. 1993 Dec;77(6):1662–6.
 286. Lefebvre H, Gonzalez KN, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM. Effect of prolonged administration of the serotonin₄ (5-HT₄) receptor agonist cisapride on aldosterone secretion in healthy volunteers. *Endocr Res*. 1998 Nov;24(3–4):749–52.
 287. Dimitriadou V, Rouleau A, Dam Trung Tuong M, Newlands GJ, Miller HR, Luffau G, et al. Functional relationship between mast cells and C-sensitive nerve fibres evidenced by histamine H₃-receptor

- modulation in rat lung and spleen. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 1994 Aug;87(2):151–63.
288. Giancola F, Rambaldi AM, Bianco F, Iusco S, Romagnoli N, Tagliavia C, et al. Localization of the 5-hydroxytryptamine 4 receptor in equine enteric neurons and extrinsic sensory fibers. *Neurogastroenterol Motil Off J Eur Gastrointest Motil Soc*. 2017 Jul;29(7).
 289. Kawabe H, Kondo K, Hayashi M, Fujimaki M, Nagahama S, Saruta T. Mechanism of the central effects of dopamine and metoclopramide on aldosterone regulation in the rat. *Endocrinol Jpn*. 1983 Aug;30(4):543–9.
 290. Gordon MB, Moore TJ, Dluhy RG, Williams GH. Dopaminergic blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: effect of high and low sodium intakes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1983 Oct;19(4):415–25.
 291. Toyoda M, Makino T, Kagoura M, Morohashi M. Immunolocalization of substance P in human skin mast cells. *Arch Dermatol Res*. 2000 Aug;292(8):418–21.
 292. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM. Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab*. 1998 Jul;30(6–7):398–403.
 293. Tore F, Tuncel N. Mast cells: target and source of neuropeptides. *Curr Pharm Des*. 2009;15(29):3433–45.
 294. Melby JC. Angiotensin-converting enzyme in cardiovascular and adrenal tissues and implications for successful blood pressure management. *Am J Cardiol*. 1992 Apr 2;69(10):2C–7C.
 295. Seifarth C, Trenkel S, Schobel H, Hahn EG, Hensen J. Influence of antihypertensive medication on aldosterone and renin concentration in the differential diagnosis of essential hypertension and primary aldosteronism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002 Oct;57(4):457–65.
 296. Mulatero P, Verhovez A, Morello F, Veglio F. Diagnosis and treatment of low-renin hypertension. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Sep;67(3):324–34.
 297. Adlin EV, Braitman LE, Vasan RS. Bimodal aldosterone distribution in low-renin hypertension. *Am J Hypertens*. 2013 Sep;26(9):1076–85.
 298. Funder JW. Primary aldosteronism and low-renin hypertension: a continuum? *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2013 Jul;28(7):1625–7.
 299. Baudrand R, Guarda FJ, Fardella C, Hundemer G, Brown J, Williams G, et al. Continuum of Renin-Independent Aldosteronism in Normotension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2017;69(5):950–6.
 300. Brown JM, Robinson-Cohen C, Luque-Fernandez MA, Allison MA, Baudrand R, Ix JH, et al. The Spectrum of Subclinical Primary Aldosteronism and Incident Hypertension: A Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2017 Nov 7;167(9):630–41.
 301. Goodfriend TL, Calhoun DA. Resistant hypertension, obesity, sleep apnea, and aldosterone: theory and therapy. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2004 Mar;43(3):518–24.
 302. Jin Z-N, Wei Y-X. Meta-analysis of effects of obstructive sleep apnea on the renin-angiotensin-

- aldosterone system. *J Geriatr Cardiol JGC*. 2016 May;13(4):333–43.
303. Glasow A, Bornstein SR. Leptin and the adrenal gland. *Eur J Clin Invest*. 2000 Dec;30 Suppl 3:39–45.
304. Krug AW, Vleugels K, Schinner S, Lamounier-Zepter V, Ziegler CG, Bornstein SR, et al. Human adipocytes induce an ERK1/2 MAP kinases-mediated upregulation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and an angiotensin II-sensitization in human adrenocortical cells. *Int J Obes* 2005. 2007 Oct;31(10):1605–16.
305. Huby A-C, Antonova G, Groenendyk J, Gomez-Sanchez CE, Bollag WB, Filosa JA, et al. Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation*. 2015 Dec 1;132(22):2134–45.
306. Faulkner JL, Bruder-Nascimento T, Belin de Chantemèle EJ. The regulation of aldosterone secretion by leptin: implications in obesity-related cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2018;27(2):63–9.
307. Colussi G, Catena C, Lapenna R, Nadalini E, Chiuch A, Sechi LA. Insulin resistance and hyperinsulinemia are related to plasma aldosterone levels in hypertensive patients. *Diabetes Care*. 2007 Sep;30(9):2349–54.
308. Biaggioni I, Garcia F, Inagami T, Haile V. Hyporeninemic normoaldosteronism in severe autonomic failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Mar;76(3):580–6.
309. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, Wilhelmsen L. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation*. 1990 Nov;82(5):1730–6.
310. Ubaid-Girioli S, Ferreira-Melo SE, Souza LA, Nogueira EA, Yugar-Toledo JC, Coca A, et al. Aldosterone escape with diuretic or angiotensin-converting enzyme inhibitor/angiotensin II receptor blocker combination therapy in patients with mild to moderate hypertension. *J Clin Hypertens Greenwich Conn*. 2007 Oct;9(10):770–4.
311. Vodovar N, Séronde M-F, Laribi S, Gayat E, Lassus J, Januzzi JL, et al. Elevated Plasma B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Directly Inhibit Circulating Neprilysin Activity in Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2015 Aug;3(8):629–36.
312. Dudenbostel T, Calhoun DA. Resistant hypertension, obstructive sleep apnoea and aldosterone. *J Hum Hypertens*. 2012 May;26(5):281–7.
313. Pratt-Ubunama MN, Nishizaka MK, Boedefeld RL, Cofield SS, Harding SM, Calhoun DA. Plasma aldosterone is related to severity of obstructive sleep apnea in subjects with resistant hypertension. *Chest*. 2007 Feb;131(2):453–9.
314. Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, et al. Sleep apnea and cardiovascular disease: an American Heart Association/American College Of Cardiology Foundation Scientific Statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research

- Professional Education Committee, Council on Clinical Cardiology, Stroke Council, and Council On Cardiovascular Nursing. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *Circulation*. 2008 Sep 2;118(10):1080–111.
315. Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Harding SM. Aldosterone excretion among subjects with resistant hypertension and symptoms of sleep apnea. *Chest*. 2004 Jan;125(1):112–7.
316. Gaddam K, Pimenta E, Thomas SJ, Cofield SS, Oparil S, Harding SM, et al. Spironolactone reduces severity of obstructive sleep apnoea in patients with resistant hypertension: a preliminary report. *J Hum Hypertens*. 2010 Aug;24(8):532–7.
317. Ursavas A. Upregulating substance P levels to treat obstructive sleep apnea. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 May;12(5):583–8.

**ARTICLES PUBLIES DANS LE CADRE DE MA
FORMATION DOCTORALE**

Article 1

Titre : Dysrégulation de la sécrétion d'aldostérone chez des souris déficientes en mastocytes

Auteurs : Boyer HG, **Wils J**, Renouf S, Arabo A, Duparc C, Boutelet I, Lefebvre H, Louiset E

Résumé : Il a été démontré que les mastocytes surrénaliens activent la sécrétion d'aldostérone chez le rat et l'homme. En particulier, une prolifération mastocytaire a été observée dans les tissus surrénaliens de patients atteints d'adénome surrénalien produisant de l'aldostérone. Dans la présente étude, nous montrons que l'activité des mastocytes surrénaliens est stimulée par un régime pauvre en sodium et est corrélée avec la synthèse de l'aldostérone chez les souris C57BL/6 et BALB/c. Nous avons également étudié la régulation de la sécrétion d'aldostérone chez des souris C57BL/6 KitW-sh/W-sh déficientes en mastocytes par comparaison avec les souris C57BL/6 de type sauvage. Les souris KitW-sh/W-sh soumises à un régime alimentaire normosodé présentaient des concentrations plasmatiques d'aldostérone basales similaires à celles observées chez les animaux de type sauvage. En revanche, un régime pauvre en sodium induit de façon inattendue une réponse exagérée de l'aldostérone, qui semble résulter d'une augmentation de l'expression de la rénine surrénalienne et du récepteur de l'angiotensine de type 1. Cet hyperaldostéronisme sévère était associé à une augmentation de la pression artérielle systolique et à une hypokaliémie marquée, ce qui favorisait une polyurie. La surexpression surrénalienne de la rénine et du récepteur de l'angiotensine de type 1 représente probablement un mécanisme compensateur visant à activer la production d'aldostérone en l'absence de mastocytes. Enfin, les souris C57BL/6 KitW-sh/W-sh représentent un modèle animal inattendu d'hyperaldostéronisme primaire, qui a la particularité d'être induit par la restriction sodée.

Identifiant Pubmed : 29084882

Article 2

Titre : La L-lysine agit comme un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques de type 4 pour inhiber in vitro et in vivo l'effet stimulant des agents sérotoninergiques sur la sécrétion d'aldostérone chez l'homme.

Auteurs : Duparc C, André C, Ménard J, Godouet-Getti B, Wils J, Cailleux AF, Moreau-Grangé L, Louiset E, Lefebvre H.

Résumé : Dans la glande surrénale humaine normale, la sérotonine (5-HT) stimule la sécrétion d'aldostérone via le récepteur 5-HT₄ (5-HT_{4R}). Cependant, le rôle physiologique du contrôle sérotoninergique de la fonction corticosurrénalienne n'est pas connu. Dans la présente étude, nous avons étudié la capacité de la L-lysine, agissant comme antagoniste des récepteurs 5-HT₄, à contrecarrer in vitro et in vivo l'effet stimulant des agonistes 5-HT_{4R}, sur la production d'aldostérone. La L-lysine inhibe la production d'aldostérone induite par la 5-HT et les agonistes 5-HT_{4R} comme le BIMU8 à partir de cellules corticosurréniennes humaines en culture. L'action de la L-lysine (4,95 g / jour par voie orale) sur le cortex surrénalien a également été évaluée chez 20 volontaires sains dans le cadre d'une étude en double aveugle, croisée et contrôlée contre placebo. La L-lysine n'a eu aucune influence significative sur les concentrations plasmatiques de d'aldostérone basale et sur les réponses de l'aldostérone à l'orthostatisme, au tétracosactide et à un régime pauvre en sodium (10 mmol/jour pendant 3 jours). Par contre, la L-lysine réduit significativement la stimulation de la production d'aldostérone plasmatique induite par le métoclopramide, indiquant que la L-lysine est capable d'antagoniser efficacement les récepteurs 5-HT₄ surréniens in vivo. Ces résultats suggèrent que la supplémentation orale en L-lysine pourrait représenter un nouveau traitement des hypercorticismes d'origine primitivement surrénalienne dans lesquels l'hypersécrétion de corticostéroïdes est contrôlée par des récepteurs 5-HT₄ surexprimés.

Identifiant Pubmed : PMID 27699247

Article 3

Titre : Une mutation inactivatrice de la sous-unité régulatrice 1A de la PKA induit la formation d'une boucle régulatrice sérotoninergique paracrine dans la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales.

Auteurs : Bram Z, Louiset E, Ragazzon B, Renouf S, **Wils J**, Duparc C, Boutelet I, Rizk-Rabin M, Libé R, Young J, Carson D, Vantyghem MC, Szarek E, Martinez A, Stratakis CA, Bertherat J, Lefebvre H

Résumé : La dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (DMPS ou PPNAD en anglais) est une cause rare d'hypercortisolisme indépendant de l'ACTH. La maladie est principalement causée par des mutations germinales du gène de la sous-unité régulatrice 1A de la protéine kinase A (*PRKAR1A*), qui induit une activation constitutive de la PKA dans les cellules corticosurrénaliennes. Il est admis que l'hypercortisolisme résulte de l'hyperactivité de la PKA. Néanmoins, les tissus de DMPS présentent une différenciation neuroendocrinienne susceptible de favoriser l'émergence de systèmes paracrine de stimulation de la stéroïdogenèse impliquant des neurotransmetteurs. Nous avons émis l'hypothèse que la sérotonine (5-HT) et ses récepteurs pourraient participer à la physiopathologie de l'hypercortisolisme associé à la DMPS comme précédemment montré dans les hyperplasies macronodulaires bilatérales de la surrénale. Nous montrons que les tissus de PMDS surexpriment l'enzyme synthétisant la 5-HT, la tryptophane hydroxylase de type 2 (Tph2) et les récepteurs sérotoninergiques de types 4, 6 et 7, conduisant à la formation d'une boucle sérotoninergique stimulatrice illicite dont l'inhibition pharmacologique in vitro diminue la production de cortisol. Dans la lignée cellulaire CAR47 issue d'une DMPS humaine, l'inhibiteur de la PKA H-89 diminue l'expression des récepteurs 5-HT4 et 5-HT7. De plus, dans la lignée cellulaire corticosurrénalienne humaine H295R, l'inhibition de l'expression de *PRKAR1A* augmente l'expression de Tph2 et des récepteurs 5-HT4/6/7, un effet qui est bloqué par le H-89. Ces résultats montrent que l'apparition du système de contrôle sérotoninergique paracrine illicite observé dans les tissus de DMPS résulte de l'activation de la PKA par les mutations de *PRKAR1A* à l'origine de la maladie surrénalienne. Ils suggèrent également que les inhibiteurs de Tph pourraient constituer des traitements efficaces de l'hypercortisolisme chez les patients atteints de DMPS.

Identifiant Pubmed : PMID 27699247

Résumé de Thèse

La sécrétion surrénalienne d'aldostérone est sous la dépendance du système rénine-angiotensine (SRA) circulant. Elle est également soumise à l'influence de nombreux facteurs paracrines intra-surréaliens, en particulier des neuropeptides. En outre, le cortex surrénalien est innervé par différents types de fibres nerveuses provenant du système nerveux autonome, de types catécholaminergique, cholinergique et peptidergique. Des facteurs neuronaux peuvent être sécrétés par des terminaisons nerveuses situées au contact des cellules de la zone glomérulée dans le cortex surrénalien. C'est en particulier le cas de la SP, un neuropeptide de la famille des tachykinines, dont le rôle en physiologie surrénalienne a été évalué chez l'animal mais très peu chez l'homme. Notre étude a consisté à explorer le rôle de la SP dans la régulation de la production de minéralocorticoïdes dans l'espèce humaine. *In vitro*, l'étude est basée sur la collecte des prélèvements surréaliens provenant de patients en état de mort encéphalique ou à l'occasion de néphrectomies réalisées à visée thérapeutique. Une approche clinique a complété l'approche *in vitro* et permis d'évaluer le rôle physiologique de la SP dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone. Pour cela, un essai clinique a évalué chez des volontaires sains, les effets de l'aprépitant, un antagoniste du récepteur NK1, récepteur préférentiel de la SP, sur la sécrétion d'aldostérone.

Nous avons utilisé plusieurs approches moléculaires, histologiques, fonctionnelles et pharmacologiques visant à caractériser les effets de la SP sur la sécrétion d'aldostérone par les cellules corticosurréaliennes humaines en culture ainsi que les voies de transduction impliquées.

Nos données indiquent que les gènes codant la SP (*TAC1*) et le récepteur NK1 (*TACR1*) sont exprimés en grande quantité dans la surrénale. De plus, nous montrons que des fibres nerveuses à SP sont disposées à proximité des cellules productrices d'aldostérone possédant le récepteur NK1 (NK1R). La SP stimule de manière dose-dépendante la production d'aldostérone via le NK1R, cette production étant inhibée par l'aprépitant. En outre, nos données fonctionnelles indiquent que l'isoforme courte du NK1R active la voie ERK, une des voies mises en jeu dans la réponse de l'aldostérone à l'angiotensine II. Nous mettons en évidence une augmentation de la transcription de certains gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse d'aldostérone. Ces données *in vitro* sont confirmées sur le plan clinique, avec la mise en évidence d'une diminution significative de la production globale d'aldostérone (aldostéronurie des 24 heures) et de la sécrétion du minéralocorticoïde en position couchée sous aprépitant.

Nous avons ainsi montré qu'il existe dans la glande surrénale chez l'homme, un système de contrôle de la synthèse d'aldostérone d'origine neurogène, relayé par des fibres nerveuses à SP, appartenant au système non-adrénergique non-cholinergique (NANC). Nous avons également mis en évidence les éléments du système tachyninergique présents au niveau surrénalien et l'existence d'une colocalisation fonctionnelle cohérente, en accord avec un contrôle paracrine de la production d'aldostérone par la SP. Il existe donc un contrôle substance P-ergique surrénalien de la production d'aldostérone complémentaire du SRA circulant chez l'homme.

Mots clés : aldostérone, cortex surrénalien, substance P, paracrinie, récepteur NK1, aprépitant.