Université Paris Cité

École Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité, ED 562

INSERM U970, Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire

Interactions vasculaires et hormonales dans l'hyperaldostéronisme primaire

Par Alaa Abdellatif

Thèse de doctorat de Physiologie et physiopathologie

Dirigée par Dr. Sheerazed Boulkroun

Présentée et soutenue publiquement le 27 Septembre 2022

Devant un jury composé de :

Dr. Nadia Cherradi, DR, Université Grenoble Alpes	Rapporteur
Pr. Hervé Lefebvre, PU-PH, Université de Rouen Normandie	Rapporteur
Dr. Bruno Ragazzon, DR, Université Paris Cité	Examinateur
Dr. Mabrouka Doghman, CR, Université Côte d'Azur	Examinatrice
Dr. Thomas Mathivet, CR, Université de Poitiers	Examinateur
Pr. Anne-Paule Gimenez-Roqueplo, PU-PH, Université Paris Cité	Examinatrice
Dr. Maria-Christina Zennaro, DR, Université Paris Cité	Membre invité
Dr. Sheerazed Boulkroun, CR, Université Paris Cité	Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier vivement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

- Les Pr. Hervé Lefebvre et Dr. Nadia Cherradi, qui ont pris le temps d'examiner avec attention mon travail en tant que rapporteurs.

- Les Dr. Bruno Ragazzon, Dr. Mabrouka Doghman et le Dr. Thomas Mathivet qui ont pris le temps d'évaluer mon travail en tant qu'examinateurs.

- Le Dr. Sheerazed Boulkroun, ma directrice de thèse, et le Dr. Maria-Christina Zennaro ma co-encadrante de thèse.

Je suis très honorée par votre présence dans ce jury.

Ensuite je tiens à exprimer toute ma gratitude à tous ceux qui m'ont accompagné durant ces années.

Au Dr. Maria-Christina Zennaro, merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et de co-diriger ma thèse. Merci pour la confiance que tu m'as donnée pour présenter ton laboratoire à l'école doctorale. Je te remercie pour être présente et disponible au niveau scientifique mais aussi au niveau personnel. Je te remercie pour ton professionnalisme, ton niveau scientifique et pour être la première dans ton domaine, mais aussi je te remercie pour ta personnalité directe, ta bonne humeur et ton énergie.

Au Dr Sheerazed Boulkroun, Je te remercie de diriger ma thèse, de partager tes expériences et tes connaissances scientifiques, pour m'avoir tout appris et pour toutes les discussions. Merci pour la confiance, pour le soutien et pour l'encouragement pendant les congrès.

Au Dr Fabio-Luiz Fernandes-Rosa, merci pour ton aide tout au long de ma thèse, merci pour être la personne avec qui je soumets mes papiers. Merci pour toutes les discussions et les conseils super enrichissants, pour ta gentillesse et ton professionnalisme.

Je remercie tous les membres et les anciens membres de l'équipe 12.

A Isa, je te remercie pour ton énorme soutien. Merci pour ton efficacité au travail, merci pour toutes les discussions, tes conseils, tes corrections de français, la parfaite organisation du labo et ta gentillesse absolue.

A Rami, l'ancien doctorant de l'équipe 12, je te remercie de tout faciliter pour moi, pour ton aide et soutiens continu. Je te remercie pour ta gentillesse et ta disponibilité.

A Kelly, l'ancienne doctorante de l'équipe 12, je te remercie pour m'avoir appris la technique Opal et pour notre publication, ainsi que pour nos discussions et ton soutien.

A Teresa, Merci pour ta bonne humeur, les pauses cafés, les discussions et ta gentillesse.

A Marguerite, merci pour toutes les discussions super enrichissantes scientifiques et plus, pour ta gentillesse absolue, et de partager tes connaissances avec moi.

A Bakhta, merci pour ta bonne humeur, pour ton soutien continu, pour les petits cadeaux, pour ton énergie et pour être une vraie amie.

A May, ma voisine et mon amie, merci pour cette superbe personnalité, merci de m'écouter, pour le soutien et la bonne humeur.

A Nicolò, merci pour les discussions scientifiques, pour toutes les extractions d'ARN, pour ton aide et ta bonne humeur.

Je tiens à remercier tous nos M2, anciens et actuels, et tous les anciens Aldo, Matthis, Coralie, Angélique, Yasmine, Amgoud, Lélia.

Je remercie les membres du BDE, particulièrement Judith, Alex, Sophie, Tom, Maxence, Amandine, pour tout le soutien, les sorties, les discussions et les bons moments partagés.

Je remercie également les membres de Jury de mon CSI, Dr. Judith Favier et Pr. Anne Eichmann pour tous les conseils et la critique constructive.

Je tiens à remercier Estelle Robidel pour l'aide pour faire les mis au points sur la chirugie animale et l'installation des fenêtres.

Je tiens à remercier Corinne Lesaffre, pour l'aide sur la plateforme d'histologie.

Je tiens à remercier Yunling Xu, pour l'aide sur la microscopie bi-photon et sur les mis-au point pour acquérir des images sur l'animal vivant.

Je tiens à remercier Dr. Chantal Boulanger et Dr. Alain Tedgui pour m'avoir accueilli au PARCC et pour la parfaite direction du centre.

Je remercie également tous les membres de l'administration et de l'animalerie du PARCC.

Un remerciement chaleureux à tous mes amis en France et au Liban : Paul, Eliane, Anthony, Joe, Sylvain, Vanessa, Elie, Youssef, Rebecca, Ramzi, Elissa, Violla, Tony, Nabil, Andrew, Elissar, Fado, Chaaya, Emile, Jack, Stephanie et Waed.

Un remerciement spécial à ma petite deuxième famille préférée : Nelly, Mariane, Yara et Lara. Merci pour être un soutien continu, merci pour être toujours là avec votre bonne humeur, merci pour toutes les sorties, le temps passé, les voyages, les discussions et la pureté du cœur.

Un remerciement immense à Etienne, merci pour ton soutien, ta gentillesse, ton attention et ta disponibilité.

Enfin, un grand merci à mes parents, Bassam et Assmahan, pour être les meilleurs parents, pour tous les sacrifices pour nous, tout le soutien, merci pour la fierté que je vois dans vos yeux et pour être ma première motivation à faire la thèse.

Un remerciement super chaleureux à mes sœurs et mon frère, Emma, Aboudi et Layan, merci pour le soutien continu, pour l'amour, pour les moments de folie, pour les discussions et de m'écouter. Je vous adore. Et un merci spécial à notre nouveau membre de la famille, Mostafa, merci pour ta gentillesse absolue, pour l'ambiance que tu as ajouté à notre maison et pour toutes les sorties.

Table des matières

1. Liste des figures 5

2. Liste des abréviations 7

3. Résumé 10

4. Abstract 12

5. Introduction 14

5.1 La glande surrénale 14

5.1.1 Anatomie et structure de la glande surrénale 14

5.1.2 Vascularisation de la surrénale 16

5.1.3 Régulation de la vascularisation dans le cortex surrénalien 18

5.1.4 Vascularisation dans la surrénale fœtale 21

5.1.5 Innervation de la glande surrénale 23

5.2 Développement de la glande surrénale 25

5.3 Renouvellement et Migration centripète de la glande surrénale 29

5.4 Régulation de la stéroidogenèse 34

5.4.1 Mécanismes de régulation de la biosynthèse d'aldostérone 37

5.4.2 Mécanismes de régulation de la biosynthèse du cortisol 41

5.5 Dimorphisme sexuel dans le développement de la glande surrénale 43

5.6 Voies de signalisation dans la glande surrénale 47

5.6.1 La voie de signalisation Shh 48

5.6.2 La voie de signalisation Wnt/β-caténine 49

5.6.3 La voie de signalisation cAMP/PKA 52

5.7 L'hypertension artérielle 53

5.7.1 Régulation de la pression artérielle par le SRAA 54

5.7.2 Composante génétique de la pression artérielle 55

5.8 L'hyperaldostéronisme primaire 55

5.8.1 Les formes familiales de l'HAP 57

5.8.2 Les mutations somatiques dans l'APA 63

5.8.3 Les APCC et leur rôle dans la biosynthèse de l'aldostérone et le développement de l'HAP 68

5.9 Interaction vasculaire et hormonale dans la glande surrénale 71

5.9.1 Adaptation physiologique du cortex surrénalien 71

5.9.2 Interaction entre l'aldostérone et le système vasculaire 72

6. Objectif du travail de thèse 74

7. Partie 1 : Interaction hormonale et vasculaire dans l'hyperaldostéronisme primaire 75

7.1.1 Littérature et hypothèse ... 75
7.1.2 Matériel et méthodes ... 79
7.1.3 Résultats ... 88
7.1.3.1 Caractérisation des souris CYP11B2-Cre ... 88
7.1.3.2 Lignage cellulaire du cortex surrénalien ... 89
7.1.3.3 La signalisation Wnt/β-caténine entre 5 et 12 semaines ... 92
7.1.3.4 La vascularisation entre 5 et 12 semaines ... 93
7.1.3.5 Plasticité et dynamique du cortex surrénalien ... 94
7.1.3.5.1 Remodelage surrénalien sous traitement à la dexaméthasone ... 94
7.1.3.5.2 Stéroïdogenèse sous traitement à la dexaméthasone ... 95
7.1.3.5.3 La voie de la signalisation Wnt/β-caténine sous traitement à la dexaméthasone 96
7.1.3.5.4 L'apoptose sous traitement à la dexaméthasone ... 98
7.1.3.5.5 Vascularisation sous traitement à la dexaméthasone ... 99
7.1.3.6 Remodelage surrénalien en régime pauvre et riche en sel ... 102
7.1.3.6.1 Stéroidogenèse sous les régimes pauvre et riche en sel ... 104
7.1.3.6.2 La signalisation Wnt/β-caténine sous les régimes pauvre et riche en sel ... 105
7.1.3.6.3 La vascularisation sous les régimes pauvre et riche en sel ... 107
7.2 Discussion ... 111
8. Partie 2 : Colocalisation des voies de signalisation wnt/β-caténine et ACTH et régulation paracrine dans les adénomes produisant de l'aldostérone ... 117
8.1 Littérature et objectif de l'étude ... 117
8.2 Résultats ... 120
8.3 Discussion ... 121
9. Références ... 124
10. Annexes ... 139

1. Liste des figures

Figure 1. Anatomie et structure de la glande surrénale. 15
Figure 2. Vascularisation de la glande surrénale. D 17
Figure 3. Les effets de l'ACTH sur la vascularisation du cortex surrénalien. 21
Figure 4. Angiogenèse dans la surrénale fœtale. 23
Figure 5. Développement de la glande surrénale et des gonades. 26
Figure 6. Développement de la glande surrénale. 26
Figure 7. Développement de la glande surrénale humaine et murine. 27
Figure 8. Comparaison de l'Anatomie et physiologie du cortex surrénalien. 29
Figure 9. Renouvellement du cortex surrénalien chez la souris. 31
Figure 10. Stéroïdogenèse dans les trois zones du cortex surrénalien. 34
Figure 11. Les stéroïdes produits par le cortex surrénalien et leurs actions respectives. 36
Figure 12. Régulation de la stéroïdogenèse. 36
Figure 13. Système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). 39
Figure 14. Les principaux stimulateurs paracrines de la production de l'aldostérone. 41
Figure 15. Régulation de la production des glucocorticoïdes et ses rôles physiologiques. 42
Figure 16. Le renouvellement du cortex surrénalien chez la femelle et le rôle des androgènes dans ce renouvellement. 46
Figure 17. Les voies de signalisation dans le cortex surrénalien. 47
Figure 18. Rôle de la signalisation Wnt/β-caténine dans la prolifération des cellules de la ZG. 51
Figure 19. La signalisation cAMP/PKA dans la surrénale. 53
Figure 20. Illustrations des principales cascades de signalisation stimulées par l'ACTH, de la liaison à son récepteur à la fonction cellulaire dans les cellules corticosurrénales. 53
Figure 21 Mécanismes génétiques et pathogéniques de l'hyperaldostéronisme familial et traitement ciblé. . 59
Figure 22. Les mécanismes cellulaires de la production de l'aldostérone dans la surrénale normale et avec APA 66
Figure 23. Mutations GNAQ/GNA11 dans les APA porteurs de mutations CTNNB1. 67
Figure 24. Les 2 hypothèses pour le développement de l'APA. 69
Figure 25. Interactions vasculaires et hormonales dans la surrénale. 73
Figure 26. Les mécanismes cellulaires responsable du renouvellement de la corticosurrénale adulte. 75
Figure 27. Vascularisation de la glande surrénale chez une souris de 2 semaines. Image prise en imagerie confocale. 76
Figure 28. Nodulation dans la surrénale contrôle et dans le tissu adjacent péritumoral. 77
Figure 29. Expression continue et discontinue de CYP11B2 au cours du vieillissement. 78
Figure 30. Construction du modèle de souris.. 80
Figure 31. Caractérisation des souris CYP11B2-Cre::mTmG. 88
Figure 32. Lignage cellulaire du cortex surrénalien. 90
Figure 33. Expression des gènes de la stéroidogenèse (cyp11B1 et cyp11b2) chez les souris femelles et mâles âgées entre 5 et 12 semaines. 91
Figure 34. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles.. 92
Figure 35. Expression des gènes de la vascularisation dans la surrénale des souris mâles et femelles âgées entre 5 et 12 semaines. 93
Figure 36. Plasticité et dynamique du cortex surrénalien.. 95
Figure 37. Expression des gènes de la stéroidogenèse (CYP11B1 et cyp11b2) chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks).. 96
Figure 38. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks).. 97
Figure 39. Expression de gènes de l'apoptose par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks). 99

Figure 40. Expression de gènes de la vascularisation par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks). *101*
Figure 41. Vascularisation chez les souris mâles et femelles pendant la suppression et la régénération. *102*
Figure 42. Plasticité et dynamique du cortex surrénalien. Effets des changements de l'apport en sel dans l'alimentation pendant deux semaines sur le cortex surrénalien.. ..... *103*
Figure 43. Mesure de la surface de la ZG. *104*
Figure 44. Expression des gènes de la stéroidogenèse (CYP11B1 et cyp11b2) chez les souris mâles et femelles sous régime contrôles, pauvre et riche en sel. *105*
Figure 45. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles sous régimes contrôles, et pauvre en sel. *106*
Figure 46. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles sous régimes contrôles, et riche en sel...... *107*
Figure 47. Vascularisation chez les souris mâles et femelles sous les régimes contrôles, pauvre et riche en seL *108*
Figure 48. Expression des gènes de la vascularisation dans la surrénale des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines sous régime contrôles et pauvre en sel. *109*
Figure 49. Expression des gènes de la vascularisation dans la surrénale des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines sous régime contrôles et riche en sel...... *110*
Figure 50. Origine cellulaire de la zone X. Image prises par microscopie confocale. *112*
Figure 51. Installation de fenêtre abdominale chez la souris et dispositif permettant l'acquisition des images. *116*

2. Liste des abréviations

5-HT: 5-hydroxytryptamine

5-HTR4: 5-hydroxytryptamine receptor type 4

ACE: Angiotensin I converting Enzyme

ACTH: Adrenocorticotropic hormone

AGP: AdrenoGonadal Primordium

Ang II: Angiotensin II

APA: Aldosterone producing adenoma

APC: Adenomatous polyposis coli

APCC: Aldosterone-producing cell clusters

AR: Androgen receptor

Arg: Arginine

ARR: Aldosterone to renin ratio

AS: Aldosterone synthase

Asp: Aspartic acid

AT1R: Angiotensin II receptor type 1

AT2R: Angiotensin II receptor type 2

ATP: Adenosine triphosphate

ATP1A1: ATPase Na+/K+ Transporting Subunit Alpha 1

ATP2B3: ATPase Plasma Membrane Ca2+ Transporting 3

BAH: Bilateral adrenal hyperplasia

BSA: Bovine serum albumin

CACNA1D: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 D

CACNA1H: Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 H

CaMK: Calmodulin-dependent protein kinases

cAMP: Cyclic adenosine 3,5-monophosphate

ß-Catenin: ß-Cadherin-Associated Protein

Cav 1.3: Voltage-dependent L-type calcium channel subunit alpha-1D

Cav 3.2: Voltage-dependent T-type calcium channel subunit alpha-1H

CLCN2: Chloride Voltage-Gated Channel 2

CLC2: Chloride channel protein 2

CREB: Cyclic AMP-responsive elementbinding protein

CTNNB1: Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1

CYP11A1: Cytochrome P450 11A1

CYP11B1: Cytochrome P450 11B1

CYP11B1: Cytochrome P450 11B2

CYP17A1: Cytochrome P450 17A1

CYP21A2: Cytochrome P450 21A2

Dab-2: Disabled Homolog 2

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DHEAS: Dehydroepiandosterone sulfate

DNA: Deoxyribonucleic acid

DZ: Definitive zone

ER: Estrogen receptor

ERC: Epithelial sodium channel regulatory complex

FH: Familial hyperaldosteronism

FZ: Fetal Zone

Fz: Frizzled

GABA: Gamma-Aminobutyric acid

GIRK: G protein-activated inward rectifier potassium channel 4

Gly: Glycine

GPCR: G-protein coupled receptor

GR: Glucocorticoid receptor

GRA: Glucocorticoid-remediable aldosteronism

GRE: Glucocorticoid response element

GTP: Guanosine triphosphate 14

HES: Hematoxylin-eosin-safran

HFA: Human Foetal Adrenal

His: Histidine

HRE: Hormone response element

HT: Arterial Hypertension

IF: Immunofluorescence

IGF: Insulin-like growth factor

IHA: Idiopathic hyperaldosteronism

IHC: Immunohistochemistry

Ile: Isoleucine

IP3: Inositol 1,4,5-triphosphate

IRES: Internal ribosome entry site

KCNJ5: Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily J Member 5

Kir: Inward rectifier K(+) channel

KO: Knock-out

LBD: Ligand-binding-domain

LEF: Lymphoid enhancer factor

Leu: Leucine

LHCGR: Leuteinizing hormone-chorionic gonadotropin receptor

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MC2R: Melanocortin receptor 2

Met: Methionine

MR: Mineralocorticoid receptor

MRA: MR antagonist

MRAP: Melanocortin-2 receptor accessory protein

MRE: Mineralocorticoid response element

mRNA: Messenger ribonucleic acid

mTOR: Mammalian target of rapamycin

N: number

NGS: Next generation sequencing

NGS: Normal goat serum

NR0B1: Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1

NR1B1: Nuclear Receptor Subfamily 1 Group B Member 1

NR3C2: Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2

NR4A1: Nuclear receptor subfamily 4 group A 1

NR4A2: Nuclear receptor subfamily 4 group A 2

NR5A1: Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1

PA: Primary Aldosteronism

pAATL: Possible APCC-to-APA translational lesions

PASNA: Primary Aldosteronism, Seizures and Neurological Abnormalities

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: Polymerase chain reaction

p-CREB: phospho-CREB

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PKA: Protein kinase A

PMCA3: Plasma membrane calciumtransporting ATPase 3

PRKACA: Protein Kinase CAMPActivated Catalytic Subunit Alpha

PRKAR1A: Protein Kinase CAMPDependent Type I Regulatory Subunit Alpha

PRKAR1B: cAMP-dependent protein kinase type I β-regulatory subunit

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

qRT-PCR: Quantitative real time polymerase chain reaction

RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosterone System

RSPO: R-spondin

Ser: Serine

sER: Smooth Endoplasmic reticulum

ZR: Zona reticularis

SF1: Steroidogenic factor 1

SHH: Sonic Hedgehog

SLC35F1: Solute Carrier Family 35 Member F1

SRC: steroid receptor co-activator

StAR: Steroidogenic acute regulatory protein

SUMO: Small Ubiquitin-like Modifier

TASK: TWIK-related acid-sensitive potassium channel

TBS: Tris buffer solution

TCF: T-cell factor

TSH: Thyroid stimulating hormone

Tyr: Tyrosine

TZ: Transitional zone

Val: Valine

VDR: Vitamin D receptor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

WES: Whole exome sequencing

Wnt: Wingless

WT: Wild type

WT1: Wilm's Tumour-1

XZ: X-zone

ZF: Zona fasciculata

ZG: Zona glomerulosa

3. Résumé

Titre : Interactions vasculaires et hormonales dans l'hyperaldostéronisme primaire

L'hypertension artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire majeur. L'Hyperaldostéronisme Primaire (HAP) est la forme la plus commune d'hypertension artérielle secondaire avec une prévalence de 7 à 10% des patients hypertendus. Les adénomes produisant de l'aldostérone (APA) et les hyperplasies bilatérales des surrénales sont responsables de la quasi-totalité des cas d'HAP. Notre laboratoire a montré que les surrénales avec APA sont caractérisées par une augmentation de la nodulation et une vascularisation réduite du tissu adjacent à l'adénome. Par ailleurs, la structure et la fonction du cortex surrénalien évoluent avec l'âge, possible conséquence d'un dysfonctionnement vasculaire.

L'objectif de mon travail de thèse était de mieux comprendre les interactions entre les cellules vasculaires et endocrines, en particulier dans la zonation du cortex surrénalien et dans la formation des APA. Pour cela, j'ai généré un nouveau modèle de souris, exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur *Cyp11b2* et permettant son expression spécifiquement dans la zone glomerulée ; ces souris ont été croisées avec des souris rapportrices mTmG. Grâce à des études de lignage cellulaire, j'ai montré que la transdifférenciation des cellules du cortex surrénalien est quasiment achevée à 5 semaines chez les femelles alors qu'elle se poursuit jusqu'à 12 semaines chez les mâles. Chez des souris mâles et femelles, l'expression de *Cyp11b2* et du *Vegfa* ne varie pas entre 5 et 12 semaines d'âge. L'étude de la plasticité et de la dynamique d'adaptation du cortex surrénalien montre qu'une modification de l'apport en sel dans l'alimentation, appliqué pendant deux semaines, module la taille de la zone glomérulée et l'expression de Cyp11b2 chez les souris mâles et femelles, sans modifier le lignage corticosurrénalien. L'adaptation de la fonction hormonale est accompagnée d'une modification de la surface vasculaire du cortex surrénalien, qui augmente sous un régime pauvre en sel et diminue sous un régime riche en sel ; cependant, un dimorphisme sexuel est observé. Un traitement de trois semaines avec un glucocorticoïde exogène, la dexaméthasone, induit une régression de la zone fasciculée et une désorganisation majeure du réseau vasculaire ; cet effet est réversible, le cortex surrénalien retrouvant sa structure deux semaines après l'arrêt de traitement. Ce modèle permet donc d'étudier la plasticité du cortex surrénalien et d'aborder ainsi la question du rôle des interactions hormonales et vasculaires dans les processus d'adaptation physiopathologique.

En parallèle à ces travaux, j'ai étudié l'expression de protéines marqueurs de l'origine et de la fonction cellulaire, du microenvironnement, de la régulation paracrine de la production d'aldostérone et des interactions cellule endocrines – vaisseaux (mastocytes, fibres nerveuses et vaisseaux) dans des tissus surrénaliens de 14 patients avec APA par une technique d'immunofluorescence multiplexe

(méthodologie Opal). Les analyses ont été réalisées sur des coupes de surrénales avec APA, permettant d'étudier également le tissu péritumoral adjacent. Dans ces tissus, la quantification des mastocytes et des fibres nerveuses a révélé leur abondance dans les APA ainsi que dans les APCCs (Aldosterone Producing Cell Clusters), de petits amas de cellules responsables d'une production autonome d'aldostérone, dont le nombre augmente avec l'âge. En particulier, dans les APA comme dans les APCC, nous avons observé une forte expression de CYP11B2, de la β-caténine activée et de nombreux mastocytes. Ces travaux suggèrent que les différentes structures productrices d'aldostérone dans les surrénales avec APA partagent des caractéristiques moléculaires et un environnement cellulaire communs, malgré des statuts mutationnels différents, ce qui suggère des mécanismes de développement communs.

Mots clés : Hypertension artérielle, Hyperaldostéronisme primaire, surrénale, cortex surrénalien, APA, réseau vasculaire, linéage cellulaire, plasticité du cortex surrénalien

4. Abstract

Title: Vascular and hormonal interactions in primary aldosteronism

High blood pressure is a major cardiovascular risk factor. Primary aldosteronism (PA) is the most common form of secondary hypertension with a prevalence of 7 to 10% of hypertensive patients. Aldosterone producing adenomas (APA) and bilateral adrenal hyperplasia account for almost all cases of PA. Our laboratory has shown that increased nodulation and reduced vascularization of peritumoral tissue are major features of adrenals with APA. Furthermore, the structure and function of the adrenal cortex changes with age, possibly as a consequence of vascular dysfunction

The aim of my thesis was to better understand the interactions between vascular and endocrine cells, particularly in the zonation of the adrenal cortex and in the formation of APA. To this purpose, a new mouse model was generated, expressing the Cre recombinase under the control of the Cyp11b2 promoter and driving its expression specifically in the zona glomerulosa (ZG); these mice were crossed with mTmG reporter mice.

Using cell lineage tracing, we have shown that the transdifferentiation of adrenal cortex cells is nearly complete at 5 weeks of age in females while it continues until 12 weeks in males. In both male and female mice, the expression of Cyp11b2 and Vegfa does not vary between 5 and 12 weeks of age. The study of the plasticity and adaptative dynamics of the adrenal cortex shows that a two weeks change in salt intake modulates the size of the zona glomerulosa and the expression of Cyp11b2 in male and female mice, without changing the adrenal cortical lineage. The adaptation of the hormonal function is accompanied by a change in the vascular area of the adrenal cortex, which increases on a low-salt diet and decreases on a high-salt diet; however, sexual dimorphism is observed. A three-week treatment with an exogenous glucocorticoid, dexamethasone, induces a regression of the zona fasciculata and a major disorganization of the vascular network; this effect is reversible, the adrenal cortex recovering its structure two weeks after the end of treatment. This model allows us to study the plasticity of the adrenal cortex and to address the question of the role of hormonal and vascular interactions in the adaptation process to pathophysiological changes.

In parallel to this work, I have studied the expression of proteins marker of cellular origin and function, microenvironment, paracrine regulation of aldosterone production and endocrine cell-vessel interactions (mast cells, nerve fibers and vessels) in adrenal tissues of 14 patients with APA by a multiplex immunofluorescence technique (Opal methodology). The analyses were performed on adrenal sections with APA, allowing to study also the adjacent peritumoral tissue. In these tissues, quantification of mast cells and nerve fibers revealed their abundance in APAs as well as in APCCs (Aldosterone Producing Cell Cluster), small clusters of cells responsible for autonomous aldosterone

production, whose number increases with age. In particular, in both APAs and APCC, we observed high expression of CYP11B2, activated β-catenin, and numerous mast cells. This work suggests that the different aldosterone-producing structures in the adrenals with APA share common molecular features and cellular environment, despite different mutation status, suggesting common developmental mechanisms.

Keywords: High blood pressure, Primary aldosteronism, Adrenal, Adrenal cortex, APA, vessels, cell lineage, Plasticity and dynamics of adrenal cortex

5. Introduction

5.1 La glande surrénale

5.1.1 Anatomie et structure de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont localisées au niveau du pôle supérieur des deux reins. A l'âge adulte, elles ne représentent qu'un trentième de la taille du rein (Megha et al. 2022).

Ce sont des glandes extrêmement vascularisées constituées de 2 parties (Figure1) :
- le cortex constitue la région périphérique de la glande. Très graisseuse, apparaissant jaune blanchâtre, elle est aussi appelée corticosurrénale et représente plus de 80% de la surrénale ;
- la médulla constitue la région centrale de la glande. Visible uniquement à la coupe, brune, elle est également appelée médullo-surrénale et ne représente qu'environ 15% de la glande surrénale.

Le cortex surrénalien humain est un organe multifonctionnel responsable de la sécrétion des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes et des précurseurs des stéroïdes sexuels.
Le cortex surrénalien est composé de trois couches distinctes, la zone glomérulée qui exprime l'aldostérone synthase (codée par le gène *CYP11B2*) et produit l'aldostérone. La zone fasciculée exprime la 11-β-hydroxylase (codée par le gène *CYP11B1*) et produit le cortisol et la zone réticulée qui produit des androgènes. Le principal androgène produit dans la zone réticulée est la déhydroépiandrostérone (DHEA), c'est le stéroïde le plus abondant dans l'organisme. La DHEA sert de précurseur pour la synthèse de nombreuses autres hormones produites par la glande surrénale, comme la progestérone, les œstrogènes et la testostérone. Ainsi on parle de zonation fonctionnelle du cortex surrénalien ; en effet chaque zone produit des hormones stéroïdes différentes en raison de l'expression zone-spécifique de deux enzymes : l'aldostérone synthase et la 11β-hydroxylase.

- La zone glomérulée (ZG) est constituée de cellules épithéliales formant de petits amas plutôt arrondis. Ces cellules sont de petite taille avec un cytoplasme clarifié et un ratio cytoplasme/noyau faible. La ZG est responsable de la production des hormones minéralocorticoïdes, principalement l'aldostérone. Ces cellules se caractérisent également par une signature moléculaire particulière. Comme nous le verrons plus loin, l'expression d'un certain nombre de protéines est restreinte à la ZG, c'est le cas par exemple de l'aldostérone synthase, de disabled 2 (Dab2), de la protéine delta-like homologue 1 (DLK1) et de la β-caténine (Pignatti et al. 2017; Yates et al. 2013).

L'aldostérone est synthétisée grâce à l'activité de l'aldostérone synthase, l'enzyme qui catalyse les trois dernières étapes de la biosynthèse de l'aldostérone : l'hydroxylation en position C11 de la désoxycorticostérone, produisant la corticostérone, suivie d'une hydroxylation en position C18,

produisant la 18-hydroxycorticostérone, et enfin une oxydation du groupe hydroxyle en C18, qui entraîne la formation de l'aldostérone (Zennaro, Boulkroun, and Fernandes-Rosa 2017).

- La zone fasciculée (ZF) constitue la plus grande partie du cortex. Les cellules épithéliales sont localisées au pourtour de vaisseaux capillaires. La ZF est formée de cellules de grande taille organisées en travées parallèles les unes aux autres, avec un cytoplasme clair et un ratio cytoplasme/noyau élevé. Cette zone est le lieu de biosynthèse des glucocorticoïdes, en particulier du cortisol, qui est synthétisé à partir de la 17OH-progestérone par une 21-hydroxylation pour former le 11-désoxycortisol, suivie par l'hydroxylation en position C11 par l'enzyme 11β-hydroxylase (Pignatti et al. 2017; Yates et al. 2013).

- La zone réticulée est un vestige du cortex fœtal dans lequel les cellules sont organisées en cordon anastomosé, formant un réseau très enchevêtré. Elle est impliquée dans la sécrétion des précurseurs d'androgènes comme la déhydroépiandrostérone (DHEA) qui sert de précurseurs d'œstrogène pour le placenta et l'androsténédione.

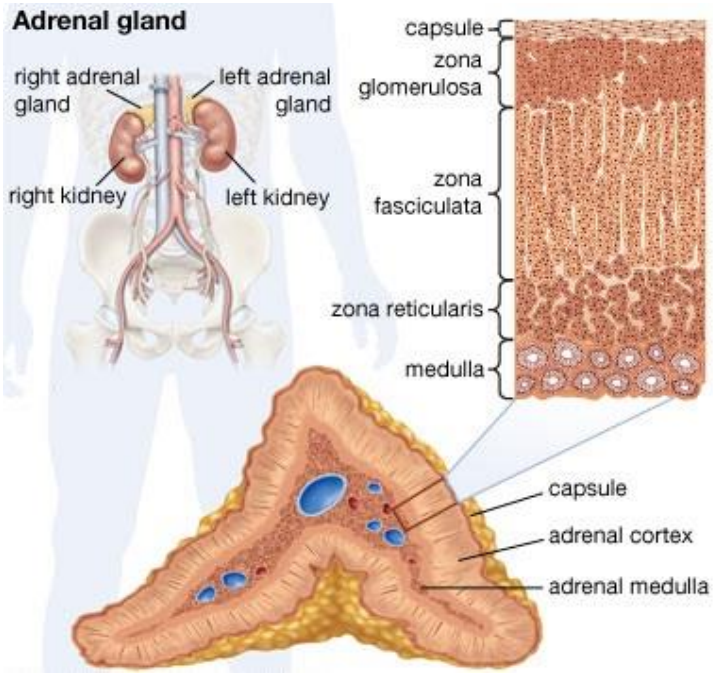


Figure 1. Anatomie et structure de la glande surrénale. https://www.britannica.com/science/adrenal-gland#/media/1/6405/121578

5.1.2 Vascularisation de la surrénale

La surrénale humaine est une glande extrêmement vascularisée. Le développement du réseau vasculaire est fondamental pour la croissance de l'organe et la différenciation pendant l'embryogenèse, pour l'arrivée d'agent trophiques et de précurseurs des hormones stéroïdes et pour la sécrétion des hormones dans la circulation. Cette vascularisation permet que chaque cellule du cortex surrénalien soit en contact avec au moins une cellule endothéliale (Thomas et al. 2003). Les interactions entre les cellules corticosurrénaliennes et les cellules endothéliales permettant le développement coordonné du réseau vasculaire lorsque les cellules surrénaliennes prolifèrent et l'organe grandit.

Une partie du flux artériel vers les deux glandes surrénales est assurée par l'aorte abdominale. Le reste du flux artériel est assuré bilatéralement par l'artère rénale, ainsi que par l'artère phrénique pour la surrénale droite et par une branche caudale de l'aorte pour la surrénale gauche (Thomas et al. 2003; Bassett and West 1997). Au centre de la médulla, la veine centrale est responsable du drainage veineux. Le drainage se fait par quelques veinules dans les sinusoïdes médullaires. Cette transition abrupte à la jonction cortico-médullaire a été appelée le "Vascular dam" surrénalien (Figure 2). Cette veine fusionne avec la veine cave pour la surrénale droite et la veine rénale pour la surrénale gauche. On distingue trois artères surrénales : l'artère surrénale supérieure, l'artère surrénale moyenne et l'artère surrénale inférieure, qui proviennent de l'artère phrénique inférieure, de l'aorte et de l'artère rénale respectivement (Udare et al. 2021).

À partir de la capsule, deux types d'artères émergent du plexus artériolaire capsulaire et pénètrent dans le cortex et la médulla : 1) les artères de la médulla, responsables de l'approvisionnement artériel de la médulla après avoir traversé directement le cortex surrénalien ; et 2) les artères corticales, qui se divisent en de nombreuses petites branches (jusqu'à 50-60). Ces artères naissent directement du plexus capsulaire, forment un réseau anastomotique dans la ZG, puis traversent la ZF sous forme de sinusoïdes capillaires longitudinaux entre les colonnes de cellules de la ZF (Thomas et al. 2003; Bassett and West 1997) et traversent ensuite la zone réticulée où elles forment un riche plexus vasculaire (Dobbie andSymington 1966) (Figure2).

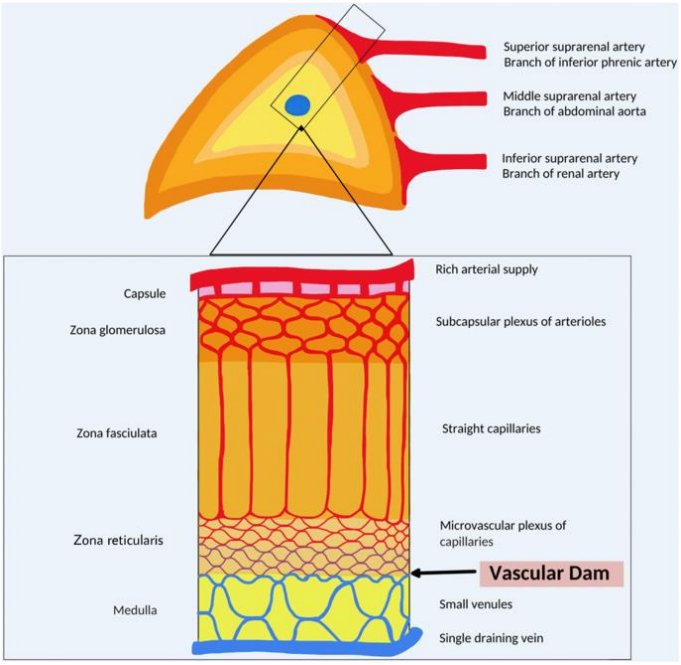


Figure 2. Vascularisation de la glande surrénale. De: CT and MR imaging of acute adrenal disorders, Udare et al,2021, DOI: 10.1007/s00261-020-02580-w

La vascularisation de la glande surrénale est constituée de sinusoïdes fenestrés (Ryan et al. 1975) qui sont hautement perméables aux fluides et aux petites molécules. Cela facilite l'apport de nutriments, d'oxygène et de cholestérol à la glande mais également la sécrétion d'hormones stéroïdes dans le flux sanguin.

Le lit capillaire largement ramifié du cortex surrénalien suggère fortement une interaction entre les cellules endothéliales et les cellules épithéliales surrénaliennes (Bassett and West 1997; Sasano et al. 1998). En effet, l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) contrôle le développement coordonné des vaisseaux et des cellules endocrines. L'interaction entre les cellules corticosurrénaliennes et les cellules endothéliales permet un développement coordonné du réseau vasculaire avec la prolifération des cellules surrénales et la croissance de l'organe. Une autre caractéristique des glandes endocrines est la forte expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) pendant la période

embryonnaire et chez l'adulte, indépendamment de l'absence d'angiogenèse active. Dans ce contexte, le rôle du VEGF-A, dont l'expression est contrôlée par l'ACTH, est de maintenir une forte densité de microvaisseaux fenestrés stables (Vittet et al. 2000). La sécrétion combinée de facteurs angiogéniques par les cellules endocrines et de facteurs trophiques par les cellules endothéliales permet de maintenir une "symbiose" entre ces compartiments cellulaires. La régulation de la vascularisation et de la croissance des surrénales doit être coordonnée afin de garantir que la masse corticale dispose d'un support vasculaire approprié, indispensable à la fois à la croissance du cortex et à sa fonction endocrine (Ishimoto and Jaffe 2011).

5.1.3 Régulation de la vascularisation dans le cortex surrénalien

Le maintien de la vascularisation du cortex surrénalien et la régulation du flux sanguin par vasoconstriction impliquent différentes voies de signalisation.

L'angiotensine II joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle notamment par son action directe sur la vasoconstriction (Weir 1999). Il est intéressant de noter que dans la surrénale, en fonction des niveaux d'angiotensine II on pourra observer une vasodilatation ou une vasoconstriction. Une faible concentration d'angiotensine II induit, via l'activation du récepteur à l'angiotensine II de type 2 (AT2R), la production et la libération d'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales, tandis qu'une concentration élevée d'angiotensine II entraîne une vasoconstriction due à l'activation du récepteur à l'angiotensine II de type 1 (AT1R) des muscles lisses, ce qui entraîne une diminution du flux sanguin surrénalien (Pueyo et al. 1998).

Rôle direct de l'ACTH

L'ACTH joue un rôle dans le développement et le maintien de la vascularisation du cortex surrénalien, et régule le flux sanguin vers la glande surrénale par la libération d'agents vasorelaxants par les cellules corticosurrénales, tels que les métabolites de l'acide arachidonique (i. e l'epoxyeicosatrienoic acids, EETs) (Zhang et al. 2007), mais aussi par la libération d'histamine et de sérotonine par les mastocytes surrénaliens, facteurs modulant la tonicité des artérioles surrénaliennes (Hinson et al. 1989), influençant indirectement la production de stéroïdes (Figure 3). En réponse à l'ACTH, les cellules d'origine bovine de la zone fasciculée et réticulée sécrètent une protéine appelée corticotropin-induced secreted protein (CISP) (Danik et al. 1999). L'analyse par séquençage de cette protéine a révélé une forte homologie avec les séquences de la thrombospondine-2 (TSP2), murine et humaine. La thrombospondine-2 est une glycoprotéine sécrétée qui appartient à la famille des grandes protéines

matricellulaires (Danik et al. 1999; Pellerin et al. 1993). Les thrombospondines (TSPs) sont impliquées dans divers processus biologiques, tels que l'adhésion, la propagation et la migration des cellules, ainsi que l'angiogenèse (Stenina-Adognravi 2013). Il a été démontré que TSP2 peut agir comme un inhibiteur de l'angiogenèse. En effet, in vitro, TSP2 pourrait inhiber la migration des cellules endothéliales capillaires en inhibant leur étalement et, in vivo, la néovascularisation (Volpert et al. 1995). Il a également été démontré que le NO induit l'angiogenèse via l'inhibition de l'expression de TSP2, confirmant le rôle anti-angiogénique de cette protéine (MacLauchlan et al. 2011). En outre, des approches in vitro ont permis de montrer que TSP2 pouvaient inhiber la migration de cellules en culture suggérant que TSP2 pouvait servir de médiateur à la migration centripète des cellules corticosurrénaliennes dépendante de l'ACTH (Pellerin et al. 1994). Cependant, l'absence d'expression de TSP2 chez les souris n'entraine pas d'altération de la morphologie du cortex surrénalien (Themis R. Kyriakides et al. 1998; T. R. Kyriakides et al. 1998).

Dans la glande surrénale, l'ACTH induit de façon rapide, après 2 à 4h de traitement, une augmentation de l'expression des ARNm codant pour le VEGF (Gaillard I est al, J Cell Physiol, 2000). De façon intéressante cet effet est indépendant de la transcription et serait dû à une stabilisation des ARNm codant pour le VEGF par la protéine HuR dont la localisation cytoplasmique est induite par l'ACTH alors que son expression nucléaire est réduite (Cherradi et al. 2006). HuR est une protéine qui appartient à la famille ELAV (embryonic-lethal abnormal visual in Drosophila melanogaster). Elle est exprimée de manière ubiquitaire ; elle se lie à l'ARN et joue un rôle dans la régulation post transcriptionnelle de l'expression génique. Il a été montré que la protéine HuR se lie à des AU-rich elements (ARE) situés dans la région 3' non traduite (3'-UTR) de l'ARNm du VEGF, entrainant une augmentation de sa stabilité et ainsi de son expression. L'ACTH induit également une augmentation de l'expression de Tis11b (tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b) une protéine à doigt de zinc qui joue un rôle dans la déstabilisation de certains ARNm. Ainsi Tis11b déstabilise l'ARNm du VEGF en se fixant sur une séquence spécifique de sa région 3' non traduite (3'-UTR) appelée TBE (Tis11b binding element) entrainant une diminution de son expression (Ciais et al. 2004; Cherradi et al. 2006). Ainsi Hur et Tis11b exerceraient des effets antagonistes, l'augmentation rapide de l'expression cytoplasmique permettrait une augmentation transitoire du VEGF par une stabilisation de ces ARNm alors que l'augmentation de l'expression de Tis11b viendrait ensuite antagoniser cet effet, résultant en une augmentation transitoire de l'expression du VEGF. A l'inverse, la suppression de l'ACTH par la dexaméthasone chez la souris induit une diminution progressive de l'expression du VEGF dans les cellules du cortex surrénalien et la régression de la vascularisation (Thomas et al. 2003).

Rôle des mastocytes

De manière intéressante, des études ont également montré le rôle des mastocytes dans le développement et le maintien de la vascularisation et dans la vasoconstriction. Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire. Elle dérivent de cellules souches hématopoïétiques et ont la propriété de sécréter de la sérotonine, de la chondroïtine, de l'histamine et des protéases (Krystel-Whittemore, Dileepan, and Wood 2016). Dans la glande surrénale, les mastocytes sont présents dans la région sous-capsulaire, modulant le tonus des artérioles de la glande surrénale et donc le flux sanguin par la libération d'histamine et de sérotonine (5-hydroxytryptamine ; 5-HT) (Hervé Lefebvre et al. 2016). Ces cellules sont également une source de facteurs angiogéniques dont le VEGF, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) 1, le facteur de croissance transformant β (TGF-β), le facteur de nécrose tumorale-α (TNF-α) et l'interleukine (IL) 8. Ils induisent également l'expression du VEGF par la libération de cytokines et de facteurs de croissance (TNF-α, TGF-β, facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), FGF2 et IL-6) (Lefebvre et al. 2016). Les facteurs de croissance et les cytokines libérés par les mastocytes ont la capacité de moduler la fonction des cellules endothéliales en augmentant l'expression de la sélectine E mais aussi en stimulant d'autres cellules qui facilitent l'angiogenèse comme les fibroblastes, les cellules épithéliales et les macrophages (Coussens and Werb 2002). L'activation des mastocytes induit également une augmentation de la perméabilité microvasculaire, ce qui a des effets proangiogéniques suite à la libération d'histamine, de prostaglandine D2, de leucotriène B4, de leucotriène C4, de VEGF et de facteur d'activation des plaquettes (Norrby 2002) (Figure3).

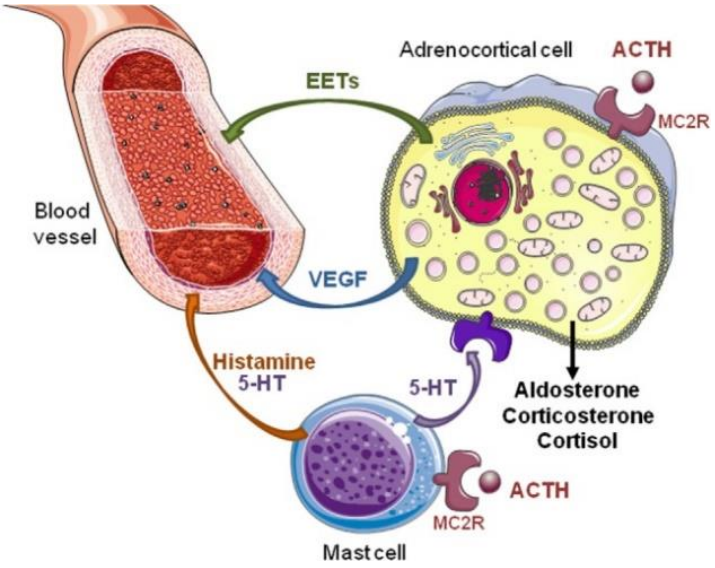


Figure 3. Les effets de l'ACTH sur la vascularisation du cortex surrénalien. L'ACTH par son action sur son récepteur MC2R agit sur la surrénale en stimulant la sécrétion des hormones stéroïdiennes, du VEGF et des acides époxyeicosatriénoïques (EET). Le VEGF stimule l'angiogenèse induisant ainsi la croissance de la surrénale. Les EETs sont des agents vasorelaxants qui suite à la stimulation par l'ACTH favorise la production des stéroïdes. Egalement l'ACTH stimule la production des histamines et de sérotonine (5-HT) par les mastocytes modulant le flux sanguin et induisant une stéroïdogenèse. En plus, la signalisation de la 5-HT stimule la sécrétion de stéroïdes par l'activation de différents sous-types de récepteurs 5-HT exprimés par les cellules corticosurrénaliennes humaines normales et tumorales**.** De: Lefebvre et al, Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions; https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00098

5.1.4 Vascularisation dans la surrénale fœtale

La corticosurrénale et la médullosurrénale sont issus de deux tissus embryologiques distincts : la médulla dérive de la crête neurale, tandis que le cortex se développe à partir du mésoderme intermédiaire. Au cours du développement, chez l'homme, le cortex de la surrénale fœtale, qui se développe à partir du primordium surrénalien, est constitué de deux zones :

- La zone interne, appelée **zone fœtale**, où l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse est importante,
- et une zone externe plus petite, appelée **zone définitive** (ZD), où l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse est plus faible (Yates et al. 2013).

La zone fœtale du cortex surrénalien est l'un des organes les plus vascularisés dans le fœtus humain (Pereira et al. 2021) ; ceci étant associé à une expression élevée du VEGF. Ainsi, le VEGF peut agir comme un régulateur local de la vascularisation de la zone fœtale. La vascularisation de la zone fœtale est assurée par les artères centrales de la surrénale. La vascularisation de la zone définitive est constituée d'artérioles distinctes qui proviennent de branches terminales du réseau artériel capsulaire et pénètrent dans la glande le long de travées de tissu conjonctif, cette vascularisation est assurée par les artères supérieures. La majeure partie de la néovascularisation se produit dans la zone fœtale (Jan

L. Shifren et al. 1998). Cette disposition vasculaire entraîne un flux sanguin centripète de la capsule à travers la zone définitive et dans le réseau sinusoïdal de la zone fœtale pour finalement atteindre la veine centrale. L'angiogenèse est essentielle pour la croissance rapide de la surrénale fœtale humaine. De plus, la surrénale fœtale humaine nécessite le développement d'un système vasculaire étendu pour l'acheminement des précurseurs d'hormones stéroïdes vers la glande et la sécrétion des produits hormonaux dans la circulation périphérique. Divers acteurs sont impliqués dans la régulation de l'angiogenèse. L'évaluation de l'expression et de la régulation de facteurs angiogéniques spécifiques des cellules endothéliales vasculaires, de membres de la famille VEGF, des angiopoïétines (Angs) 1 et 2 dans la surrénale fœtale humaine a montré que ces molécules y sont toutes exprimées (Jan L. Shifren et al. 1998; J L Shifren et al. 1994). Par ailleurs, à partir de cultures primaires de cellules de surrénale fœtale humaine, il a été montré que l'ACTH régule l'expression de ces différents facteurs, ce qui suggère que ces derniers pourraient être des régulateurs locaux clés de l'angiogenèse (Ishimoto, Ginzinger, and Jaffe 2006). Ainsi, ces différents facteurs peuvent médier l'action tropique de l'ACTH, exerçant un contrôle parallèle sur le système vasculaire. En particulier, l'ACTH induit une modification de l'équilibre dans lequel l'Ang2 prédomine sur l'Ang1. De plus, l'Ang2 est principalement localisée à la périphérie de la surrénale fœtale humaine (c'est-à-dire dans la DZ et la région externe de la FZ) (Figure 4). Cependant, son expression est limitée aux sites de remodelage vasculaire, et il a été ainsi proposé que l'Ang2 rende les cellules endothéliales sensibles aux stimuli angiogéniques, tels que le VEGF-A et le FGF-2 (Lobov, Brooks, and Lang 2002). En outre, on a constaté que le facteur stéroïdogène 1 (SF1) et l'Ang2 étaient coexprimés au cours des premiers stades du développement de l'HFA (Ferraz-de-Souza et al. 2011). Il a été démontré qu'en plus du rôle que joue SF-1 dans le développement et la fonction des surrénales, il aurait également un rôle crucial dans l'angiogenèse surrénalienne en se liant au promoteur du gène Ang2 dans la surrénale fœtale humaine (Ozisik et al. 2003), induisant une augmentation de son expression. Des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont

montré que SF-1 se liait au promoteur de l'Ang2 suggérant que SF-1 pourrait jouer un rôle régulateur de l'angiogenèse de la surrénale (Ferraz-de-Souza et al. 2011).

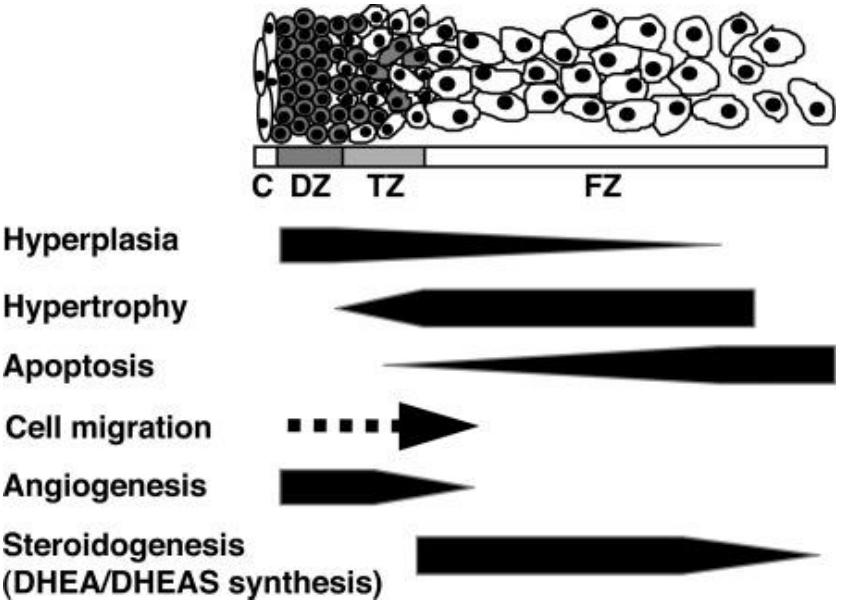


Figure 4. Angiogenèse dans la surrénale fœtale. Les cellules semblent proliférer en périphérie, migrer de façon centripète, se différencier pour former les compartiments corticaux spécialisés, puis subir une sénescence lorsqu'elles atteignent le centre du cortex. L'angiogenèse (formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux sanguins préexistants) se produit à la périphérie de la glande. De: Ishimoto et al Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit

5.1.5 Innervation de la glande surrénale

La glande surrénale est considérée être un des organes les plus richement innervés, si on prend en considération sa taille. La surrénale, reçoit un vaste réseau de nerfs efférents provenant à la fois du système nerveux sympathique et parasympathique ainsi que du système afférent (Parker et al. 1993). Chez le rat, il a été montré que l'innervation de la glande surrénale pouvait provenir de deux sources différentes (Holzwarth, Cunningham, and Kleitman 1987) :

1) d'un ensemble de nerfs à corps cellulaires venant de l'extérieur de la glande, traversant la capsule surrénale et pénétrant ensuite dans la surrénale parallèlement aux vaisseaux sanguins. Ils fonctionnent indépendamment de l'activité des nerfs splanchniques ;

2) d'un ensemble de nerfs ayant des corps cellulaires localisés dans la médullosurrénale et semblant être régulé par le nerf splanchnique.

Chez plusieurs espèces de mammifères, différents peptides et amines ont été identifiés dans les nerfs alimentant le cortex surrénalien. Il s'agit notamment du polypeptide intestinal vasoactif (VIP, Vasoactive Intestinal Peptide), du peptide lié au gène de la calcitonine (CGRP, Calcitonin Genre Related

Peptide), de la méthionine-encéphaline, de la leucine-encéphaline, du facteur de libération de la corticotropine (CRF, Corticotropin-Releasing Factor), de la substance P, du neuropeptide Y (NPY) et des catécholamines : dopamine, adrénaline et noradrénaline. De façon intéressante, plusieurs de ces substances ont été immunolocalisées dans les neurones qui alimentent principalement la région de la capsule surrénale et de la ZG (Vinson, Hinson, and Tóth 1994), suggérant qu'elles y jouent un rôle.

Les terminaisons nerveuses cholinergiques et adrénergiques du système nerveux se trouvent essentiellement dans la partie externe du cortex et dans la médulla, et sont rarement présentes dans la ZF et ZR. Ainsi de façon intéressante, ces composants du système nerveux se trouvent principalement associés au réseau vasculaire (Unsicker 1971; Parker et al. 1993). Le cortex est alimenté par des nerfs afférents et des fibres sympathiques provenant de la médulla (Yates et al. 2013). Les fibres préganglionnaires sympathiques myélinisées provenant de la colonne cellulaire intermédiaire ou de la corne latérale de T10-11 font synapse sur les cellules chromaffines médullaires. Ces terminaisons nerveuses pourraient moduler directement mais aussi indirectement la stéroïdogenèse en affectant la dégranulation des mastocytes ou le flux sanguin et le tonus vasculaire.

5.2 Développement de la glande surrénale

Le développement de la surrénale commence à la mi-gestation. Les cellules de la corticosurrénale humaine proviennent du mésoderme intermédiaire. La première structure reconnaissable de la glande surrénale est appelée "blastème surrénalien" (Jirasek JE 1980) ou "primordium surrénalien". Le cortex surrénalien, l'ovaire et le testicule proviennent d'un progéniteur commun : le primordium adrénogonadique (AGP). L'AGP est dérivé d'une région spécialisée de l'épithélium cœlomique connue sous le nom de crête urogénitale (Figure 5). Le cortex surrénalien est identifiable dès 4 semaines après la conception chez l'homme (Else and Hammer 2005) et entre 9.5 à 10 jours après la conception chez la souris (Hatano et al. 1996).

L'AGP est caractérisé par l'expression de facteurs de transcription spécifiques comme le Wilms tumor suppressor-1 (Wt1), la GATA-binding protein 4 (Gata4), et le steroidogenic factor-1 (Sf1, AdBP4 (Adrenal-4-binding protein) or Nr5a1) qui sont notamment des régulateurs de l'expression des gènes de la stéroïdogenèse et de l'identité des cellules stéroïdogéniques (Hatano et al. 1996; Luo, Ikeda, and Parker 1994; Else and Hammer 2005).

Au cours du développement, les progéniteurs du cortex surrénalien et des gonades se séparent et activent des programmes transcriptionnels différents. Les cellules de l'AGP qui expriment les niveaux les plus élevés de Sf-1 migrent de façon dorso-médiale dans le mésenchyme sous-jacent pour former les cellules surrénaliennes. Ces cellules progénitrices surrénaliennes sont caractérisées par une forte expression de Sf1 et une baisse progressive de l'expression de Wt1 et de Gata4 (Hatano et al. 1996; Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007). Au fur et à mesure, cette population de cellules exprimant Sf-1 est envahie et se combine avec les sympathoblastes dérivés de la crête neurale, qui constituent les précurseurs des cellules chromaffines de la médulla et qui ont migré depuis la ligne médiane dorsale, juste à côté du tube neural (Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007). Ces cellules de la crête neurale formeront les cellules neuroendocrines de la médullosurrénale et ne contribueront pas à la formation du cortex surrénalien. Par la suite, les cellules du primordium surrénalien prolifèrent de manière extensive et commencent à exprimer la 17α-hydroxylase alors que dans le même temps la vascularisation de la glande surrénale commence à se mettre en place (Kim and Choi 2020).

Les glandes surrénales naissantes sont ensuite enveloppées par des cellules mésenchymateuses qui vont former la capsule. Ces cellules proviennent à la fois du mésenchyme environnant et des cellules surrénales fœtales qui exprimaient auparavant Sf1 (Keegan and Hammer 2002).

Ces deux populations de cellules, corticales et médullaires, forment la surrénale qui est rapidement richement vascularisée et innervée. Chez la souris, l'invasion de la crête neurale est terminée à environ 12,5 jours après la conception ; la séparation de la glande du mésenchyme environnant est largement terminée à environ 14,5 jours après la conception (Figure 6).

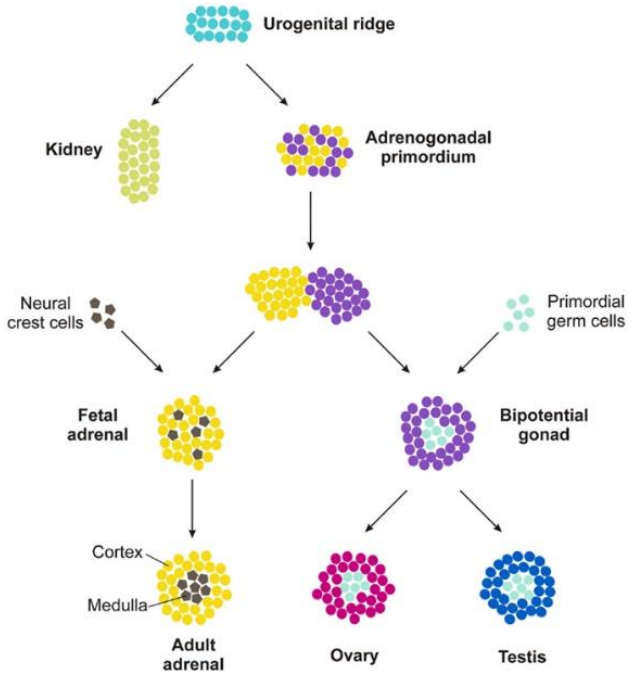


Figure 5. Développement de la glande surrénale et des gonades. De: Pihlajoki et al. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. 2015 10.3389/fendo.2015.00027

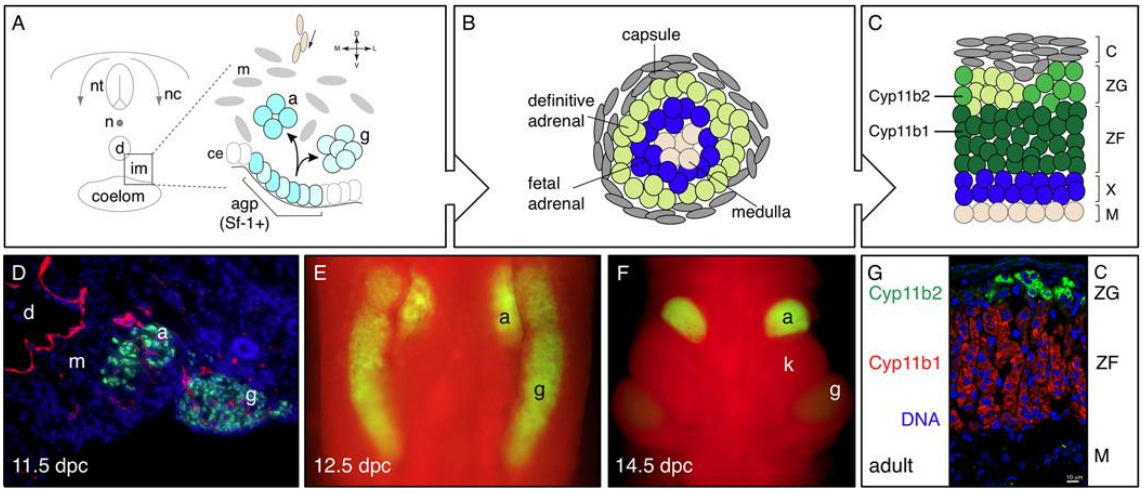


Figure 6. Développement de la glande surrénale. Au stade embryonnaire, après la croissance du primordium surrénalien, la population de progéniteurs surrénaliens du côté médial et la population de progéniteurs gonadiques du côté latéral se séparent pour former respectivement le primordium surrénalien et le primordium gonadique. À partir de 6 semaines post-conception (wpc), les cellules de la crête neurale qui deviendront plus tard la médullo-surrénale envahissent le primordium surrénalien. Les cellules mésenchymateuses qui deviendront la capsule les encapsulent pour établir la glande surrénale fœtale. La zone fœtale (FZ) élargie est progressivement remplacée par la zone définitive (ZD) externe. Après la naissance, la zone fœtale régresse par apoptose et le cortex surrénal commence la zonation de la zone définitive en zone glomérulée (ZG) et zone fasciculée (ZF). Parmi les trois grandes zones corticales, la zona reticularis (ZR) est la dernière à se développer. De: Kim JH et al, Embryonic Development and Adult Regeneration of the Adrenal Gland, DOI: 10.3803/EnM.2020.403

A la huitième semaine de gestation, la surrénale fœtale humaine est constituée de deux zones : une zone fœtale interne (ZF) et une zone définitive externe (ZD). La zone fœtale est épaisse et contient de grandes cellules éosinophiles, tandis que la zone définitive est mince et contient de petites cellules basophiles. La zone fœtale ressemble fonctionnellement à la ZR adulte, ainsi elle exprime CYP17A1, CYP11A1 (cholesterol side-chain cleavage enzyme) et CYB5 (Cytochrome B5) et produit de grandes quantités de DHEA et de DHEA-S, qui sont converties en œstrogènes par les actions séquentielles d'enzymes présentes au niveau du foie et du placenta. La zone définitive, au niveau du cortex externe, exprime des niveaux relativement faibles d'enzymes stéroïdogènes et émerge avec l'élargissement de la zone fœtale. Peu après cette période, une troisième zone corticale apparait entre la zone définitive et la zone fœtale qui porte le nom de zone de transition (TZ). Cette zone de transition est l'équivalent de la zone fasciculée et produit du cortisol. À la 30ème semaine de gestation, le cortex de la surrénale fœtale présente une forme rudimentaire du cortex surrénalien adulte ; la zone définitive et la zone de transition commencent à ressembler respectivement aux zones glomérulée et fasciculée (Sucheston and Cannon 1968) (Figures 6 et 7).

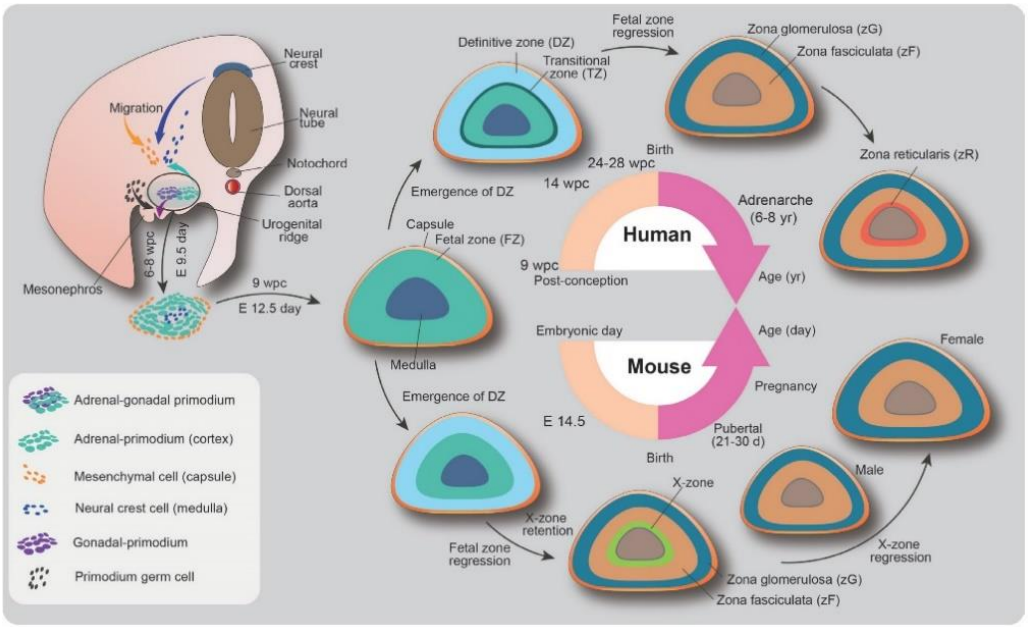


Figure 7. Développement de la glande surrénale humaine et murine. Au stade embryonnaire, après la croissance du primordium surrénalien (PSA) des deux côtés, la population de progéniteurs surrénaliens du côté médial du PSA et la population de progéniteurs gonadiques du côté latéral du PSA se séparent pour former respectivement le primordium surrénalien (PS) et le primordium gonadique (PG). À partir de 6 semaines post-conception (wpc), les cellules de la crête neurale qui deviendront plus tard la médullo-surrénale envahissent le PS et les cellules mésenchymateuses qui deviendront la capsule les encapsulent pour établir la glande surrénale fœtale. La zone fœtale (ZF) élargie est progressivement remplacée par la zone définitive (ZD) externe. Après la naissance, la zone fœtale régresse par apoptose et le cortex surrénal commence la zonation de la zone définitive en zone glomérulée (ZG) et zone fasciculée (ZF). Parmi les trois grandes zones corticales, la zona reticularis (zR) est la dernière à se développer. Vers l'âge de 6 à 8 ans, période connue sous le nom d'adrénarche, la ZR se forme à la limite corticale-médullaire du cortex surrénalien. La production d'androgènes surrénaliens est clairement observée à partir de ce stade. Contrairement à l'homme, le cortex surrénalien de la souris présente la zone X comme un compartiment cortical transitoire à la limite cortico-médullaire. La régression de la zone X est sexuellement dimorphique. De laufer et al, Sonic hedgehog signaling during adrenal development, 2013, doi : 10.1016/j.mce.2011.10.002

Entre 8 et 9 semaines après la conception, on observe un pic de production de cortisol par la zone de transition, associé avec une expression transitoire de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (HSD3B2) (Goto 2006). Une hypothèse formulée serait que cette production de cortisol protègerait le développement sexuel féminin en régulant négativement l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien fœtal et en inhibant ainsi la production d'androgènes surrénaliens pendant cette fenêtre de développement. Juste avant la naissance, il y a un deuxième pic de production de cortisol qui est nécessaire pour la maturation des organes fœtaux, et ceci est au moins partiellement régulé par l'ACTH de l'hypophyse fœtale.

À la naissance, la glande surrénale est presque aussi grande que le rein fœtal, mais la taille de l'organe diminue considérablement au cours des deux premières semaines de la vie néonatale. La surrénale fœtale humaine subit une involution rapide due à la disparition rapide de la zone fœtale, avec une diminution de la sécrétion d'androgènes. En conséquence, le poids total des glandes diminue d'environ 50 % (McNutt and Jones 1970).

Aucune différence entre les sexes n'a été démontrée dans la régression/involution de la zone fœtale chez l'homme. Après la naissance, la zone définitive se différencie et forme les différentes zones corticales adultes.

Chez les souris, la zone X qui est un résidu de la surrénale fœtale, reste présente après la naissance et disparait à la puberté chez les mâles et après la première gestation chez les femelles. La fonction de la zone X n'est pas bien définie, mais elle pourrait être impliquée dans le catabolisme de la progestérone (Hershkovitz et al. 2007). A côté de la différence anatomique entre les surrénales humaines et murines, une différence fonctionnelle existe au niveau des enzymes stéroïdogéniques exprimées. Les facteurs différentiellement exprimés entre les espèces sont la 17α-hydroxylase/17,20 lyase (CYP17A1) et le cytochrome b5 (CYB5). CYP17A1 est une enzyme bifonctionnelle qui catalyse la réaction de 17α-hydroxylation nécessaire à la synthèse du cortisol et la réaction de 17,20-lyase nécessaire à la production d'androgènes (Miller and Auchus 2011). L'activité lyase est renforcée par des interactions allostériques avec le CYB5. Chez l'homme, les cellules de la ZF et de la ZR ont une activité 17α-hydroxylase, le cortisol est donc le principal glucocorticoïde sécrété par la glande surrénale humaine tandis que, chez la souris, les cellules corticales de la surrénale n'expriment pas CYP17A1 et ainsi la

corticostérone constitue le principal glucocorticoïde sécrété et la production d'androgènes surrénaliens est inexistante (Beuschlein, Galac, and Wilson 2012) (Figure 8).

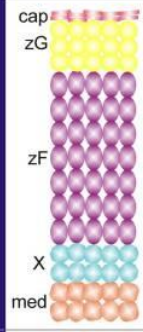
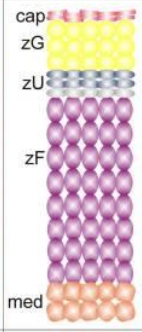
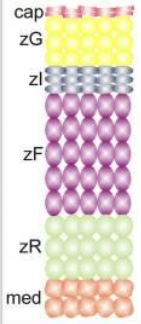
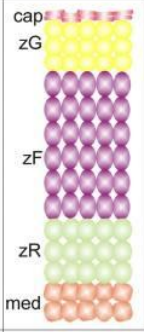
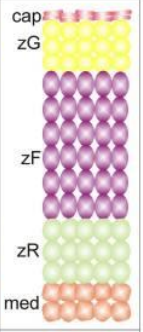
Species	Mouse	Rat	Ferret	Spiny Mouse	Human
Anatomy					
CYP17A1 expressed	No	No	Yes	Yes	Yes
Major glucocorticoid	Corticosterone	Corticosterone	Cortisol	Cortisol	Cortisol
Adrenal androgens	No	No	Minimal	Yes	Yes

Figure 8. Comparaison de l'Anatomie et physiologie du cortex surrénalien. De: Pihlajoki et al. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. 2015 10.3389/fendo.2015.00027

5.3 Renouvellement et Migration centripète de la glande surrénale

Le cortex surrénalien contient des cellules souches/progénitrices qui peuvent se diviser et se différencier pour remplacer les cellules sénescentes et maintenir ou développer les différentes zones du cortex. Le renouvellement cellulaire constant dans le cortex surrénalien facilite le remodelage rapide de l'organe en réponse à la demande physiologique en stéroïdes. Ainsi, pour répondre à des variations physiologiques, les zones peuvent s'élargir ou régresser de manière réversible.

Des modèles d'études de la migration et du renouvellement de la surrénale ont montré qu'il existe un renouvellement par migration centripète : les cellules souches/progénitrices de la périphérie du cortex surrénalien se différencient et migrent depuis la région périphérique de la glande vers l'intérieur avant de mourir par apoptose au contact de la médulla (Figure 9) (Zajicek, Ariel, and Arber 1986; Lerario et al. 2017).

Il est maintenant clair qu'il existe des pools distincts de cellules souches/progénitrices localisés au niveau de la capsule surrénale, du cortex sous-jacent ou encore de la région juxtamédullaire (Lerario et al. 2017). De façon intéressante, certains de ces pools semblent être activés uniquement pendant des fenêtres de développement spécifiques ou en réponse à une demande physiologique extrême.

Ainsi, chez les souris dépourvues de l'expression de la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A, Prkar1a, spécifiquement dans le cortex surrénalien (AdKO), il a été observé d'une part une expansion centrifuge de cellules fœtales à potentiel prolifératif émergeant du cortex interne et d'autre part une atrophie progressive de la zone fasciculée. Ces résultats indiquent que les zones corticosurrénales peuvent être reconstituées par migration centrifuge (Sahut-Barnola et al. 2010).

L'étude d'un modèle de souris avec une perte d'expression de Sonic hedgehog (Shh) dans la surrénale soutient également l'hypothèse d'une migration centripète de cellules indifférenciées situées sous la capsule de la surrénale et qui se différencient en cellules stéroïdogéniques. Shh est un membre de la famille hedgehog qui présente de multiples rôles durant le développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte, où il permet le maintien, la différenciation et la régulation de la population des cellules souches. Son expression reste limitée à des groupes de cellules indifférenciées situés sous la capsule de la surrénale, proche des cellules exprimant l'aldostérone synthase chez l'Homme et chez la souris, permettant de générer des cellules stéroïdogéniques (la voie de signalisation de Shh est détaillée plus loin dans le manuscrit). La perte conditionnelle d'expression de Shh dans la surrénale induit une diminution de la prolifération des cellules capsulaires et une réduction de 50 à 75% de l'épaisseur de la corticosurrénale (Yates et al. 2013). L'utilisation d'un modèle murin dans lequel la protéine fluorescente verte (GFP, Green Fluorescente Protein) n'est exprimée que dans les cellules de la ZG, grâce à l'utilisation d'une Cre recombinase insérée dans le locus de *Cyp11b2*, a permis de montrer que la zonation corticosurrénalienne dérive d'une transdifférenciation et d'une migration centripète dans le cortex surrénalien des cellules de la ZG en cellules de la ZF (Freedman et al. 2013). Le facteur de transcription Sf-1 joue un rôle important dans le maintien de la ZG ; sa délétion spécifique dans cette zone empêche la conversion des cellules souches embryonnaires et mésenchymateuses en cellules de la ZG. Cependant, cela n'impacte pas la formation de la ZF, suggérant l'existence de voies alternatives permettant la formation de la ZF (Freedman et al. 2013).

A ce jour différentes hypothèses sont évoquées afin d'expliquer comment le renouvellement des cellules du cortex surrénalien se fait. Bien que l'hypothèse d'une migration centripète et d'une transdifférenciation de cellules souches/progénitrices soit dominante, une autre hypothèse est également envisagée. En effet, contrairement à ce que l'on peut observer chez la souris où la ZG et la ZF sont en contact direct suggérant une différenciation des cellules de la ZG en ZF, le rat présente une couche intermédiaire qui sépare ces deux zones appelée zone indifférenciée (ZU, Undifferentiated zone). Cette zone se subdivise en deux sous-zones en contact avec la ZG ou la ZF, et qui se distinguent par l'expression ou non de Shh. La présence de cette zone suggère une différenciation bidirectionnelle des cellules progénitrices avec une différenciation des cellules exprimant Shh en cellules exprimant

l'aldostérone synthase tandis que les cellules n'exprimant pas Shh se différencieraient en cellules exprimant la 11β-hydroxylase (Yates et al. 2013).

Le cortex définitif est le siège d'un renouvellement continu en cellules stéroïdogènes pour compenser la mort des cellules qui atteignent la jonction corticomédullaire et ainsi maintenir la taille et la fonction du cortex surrénalien. Le renouvellement est soutenu par le recrutement de cellules souches capsulaires qui se caractérisent par l'expression de R-spondin 3 (Rspo3) et Gli1 et par l'absence d'expression de Sf1 ($Rspo3^+/Gli1^+/Sf1^-$) et de cellules progénitrices sous-capsulaires/ZG qui expriment notamment Shh, Wnt4 et Sf1 ($Shh^+/Wnt4^+/Sf1^+$) dans un processus qui implique les voies de signalisation RSPO/WNT/β-caténine et Shh. Ce processus conduit finalement à la différenciation des cellules progénitrices en cellules de ZG. Les cellules de la ZG migrent ensuite en profondeur dans le cortex de manière centripète tout en subissant un processus de transdifférenciation permettant leur conversion en cellules de la ZF (Vidal et al. 2016).

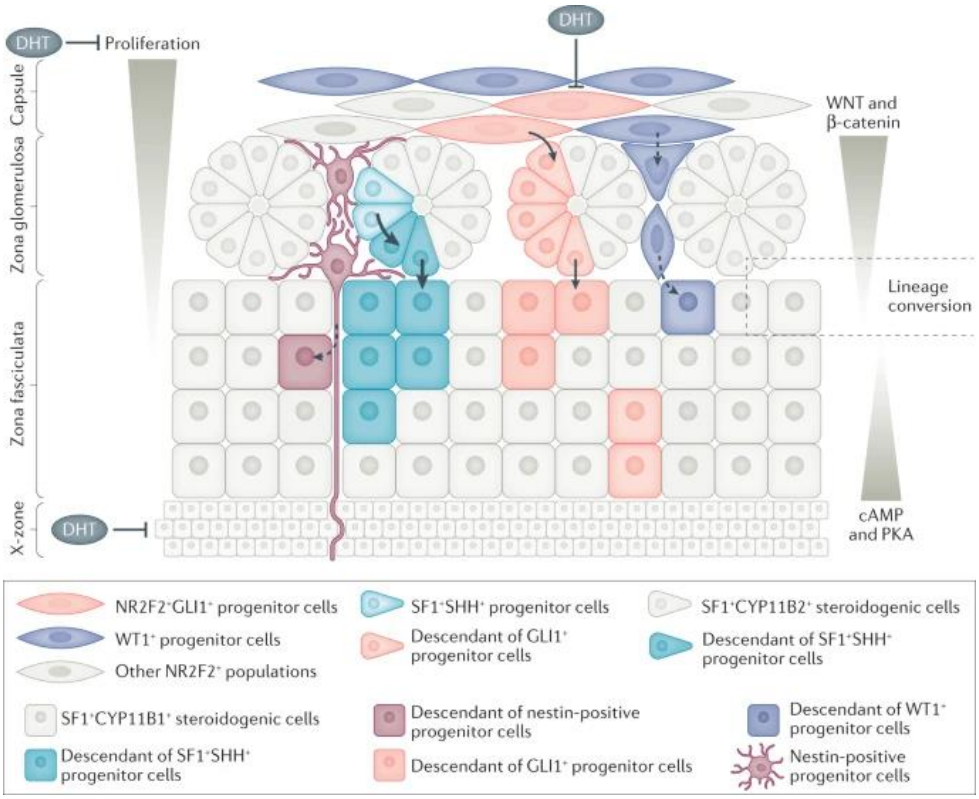


Figure 9. Renouvellement du cortex surrénalien chez la souris. Les cellules stéroïdogènes du cortex surrénalien de la souris sont principalement dérivées de populations de cellules progénitrices $GLI1^+$ dans la capsule (rose) et de progéniteurs stéroïdogènes 1-positifs ($SF1^+$) et sonic hedgehog-positifs (SHH^+) dans la zone glomérulée sous capsulaire (bleu clair). Les populations de progéniteurs positifs pour la protéine homologue de la tumeur de Wilms ($WT1^+$) dans la capsule externe et les populations de progéniteurs positifs pour la protéine nestine dans le cortex contribuent également à la reconstitution des cellules corticales. Comme la prolifération se produit principalement dans la capsule et le cortex externe, les cellules nouvellement générées subissent une différenciation en cellules de la zone glomérulée, qui subissent une migration centripète et une conversion de lignée en cellules de la zone fasciculée. Ces processus sont régulés par les niveaux d'activité des voies de signalisation WNT-β-caténine et AMP-protéine kinase A (PKA), qui sont mutuellement antagonistes. De : Lyraki et al, Adrenal cortex renewal in health and disease- 2021 DOI: 10.1038/s41574-021-00491-4

Les réservoirs de cellules souches/progénitrices sont eux-mêmes maintenus par l'activation de voies de signalisation spécifiques particulièrement les voies de signalisation Wnt et Shh. Ainsi, Rspo3, en se liant à l'un de ses récepteurs qui appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G contenant des répétitions de leucine-riches (Lgr), Lgr4/5/6, induit l'expression de Wnt4 et de Shh dans les cellules stéroïdogènes ; à son tour Shh, en se liant à son récepteur Ptch, active une signalisation qui permet le recrutement de cellules capsulaires. Au niveau de la capsule surrénalienne, les cellules non stéroïdogènes qui expriment Gli1, un gène cible de la voie Hedgehog, sont à l'origine des cellules stéroïdogènes qui vont ensuite migrer dans le cortex interne pendant la vie fœtale et postnatale. Notamment, en condition physiologique, ces cellules progénitrices $Gli1^{+}$ sont actives presque exclusivement chez les souris femelles (Grabek et al. 2019) mais conservent la capacité d'être activées chez les souris mâles lors de la régénération du cortex après un traitement à la dexaméthasone (Finco, Lerario, and Hammer 2018). Il est intéressant de noter qu'une sous-population de cellules capsulaires $Sf1^{-}$/$Gli1^{+}$ dérive d'une sous-population du cortex surrénalien fœtal $Sf1^{+}$ et que cette sous-population pourrait comprendre les progéniteurs corticosurrénaliens adultes. Par ailleurs, il a également été montré que des sous-populations de cellules de la ZG sont capables de générer des cellules d'autres zones du cortex. Ces cellules présentent un phénotype partiellement différencié, elles co-expriment Shh et Sf1 mais pas d'autres marqueurs stéroïdogéniques, tels que Cyp11b2, elles présentent également une activation de la voie de signalisation Wnt/β-caténine avec expression de marqueurs spécifiques comme l'Axin2 et Wnt4 ($Axin2^{+}$ et $Wnt4^{+}$) (Lyraki and Schedl 2021).

Wt1 est un facteur de transcription essentiel pour initier l'expression de Sf1 au cours du développement précoce de la surrénale. Ce facteur joue un rôle essentiel dans le maintien de l'identité du primordium adréno-gonadique (AGP, adreno-gonadal primordium) en régulant directement l'expression de gènes tels que *Gli1* et *Tcf21* (Bandiera et al. 2013). Cependant, après la séparation du primordium surrénalien et gonadique, l'expression de Wt1 s'arrête pour permettre la différenciation surrénalienne et l'activation du programme stéroïdogénique. De façon intéressante, l'expression de Wt1 n'est jamais trouvé dans le cortex surrénalien différencié (Val, Martinez-Barbera, and Swain 2007). Dans la glande surrénale adulte de souris, les descendants de ces progéniteurs exprimant Wt1 sont peu nombreux. Ils ne sont généralement pas entièrement différenciés et probablement incapables de produire des stéroïdes surrénaliens en raison de l'absence d'expression de certaines enzymes stéroïdogènes clés telles que l'enzyme mitochondriale de clivage de la chaîne latérale du cholestérol (également connue sous le nom de cytochrome P450scc) et la stéroïde 21-hydroxylase. Il existe également dans le cortex surrénalien une population de cellules, notamment dans la zone fasciculée, non stéroïdogènes qui expriment la nestine, une protéine de filament qui est principalement exprimée

dans le système nerveux en développement (Toti et al. 2005; S. Suzuki et al. 2010), et qui est capable de se différencier en une population de cellules productrices de stéroïdes. De façon remarquable, les cellules qui expriment la nestine étendent de longues projections vers la médulla, elles semblent particulièrement bien adaptées pour participer aux interactions cortex-médulla pendant les réponses au stress (Toti et al. 2005; Steenblock et al. 2018).

Une autre caractéristique de la glande surrénale est sa plasticité cellulaire. La plasticité désigne la capacité des cellules à adopter une autre identité fonctionnelle en réponse à des signaux provenant du milieu hormonal et du microenvironnement cellulaire. La transdifférenciation et la dédifférenciation sont des formes de plasticité cellulaire. Les travaux de Freedman et al sont une parfaite illustration de ce qu'est la plasticité des cellules corticosurrénaliennes. Cette étude a montré que la zonation corticosurrénalienne est orchestrée en partie par la conversion directe des cellules de la ZG en cellules de la ZF, et que cette conversion contribue au remodelage corticosurrénalien. Ainsi lorsque des souris sont soumises à un traitement avec des glucocorticoïdes, le rétrocontrôle négatif sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien conduit à une régression de la ZF.

D'une manière intéressante, la délétion conditionnelle du gène *Sf1* dans les cellules Cyp11b2^{+} n'entraine pas de modification dans la formation de cellules de type fasciculée fonctionnelles, même si la conversion des cellules de type glomérulée en cellules de type fasciculée est inhibée (Freedman et al. 2013). Ces résultats impliquent l'existence de voies alternatives pour l'origine et la différenciation des cellules de la ZF. L'identification de sources alternatives de cellules de type ZF fait l'objet de recherches actives.

5.4 Régulation de la stéroidogenèse

La stéroïdogenèse surrénalienne est un processus dynamique, elle est constituée d'une série de réactions enzymatiques consécutives qui transforment un précurseur commun, le cholestérol, en composés intermédiaires permettant la synthèse de 3 classes principales de stéroïdes : les minéralocorticoïdes (MCs), les glucocorticoïdes (GCs), et les précurseurs des androgènes.

Le cholestérol peut-être synthétisé de novo à partir d'acétate (Mason and Rainey 1987) mais il est principalement fourni par le cholestérol alimentaire transporté vers la cellule par les low-density lipoprotein (LDL) et les High-density lipoprotein (HDL) (Gwynne and Strauss 1982). Le cholestérol est stocké dans les cellules sous forme estérifiée. Pour initier la stéroïdogenèse, le cholestérol est mobilisé à partir d'un réservoir interne situé dans la membrane mitochondriale externe (OMM) (Miller and Auchus 2011). L'une des étapes limitantes de la biosynthèse de stéroïdes est la conversion du cholestérol en prégnénolone (Koritz and Kumar 1970) (Figure 10). Cette première étape est catalysée par l'enzyme de clivage des chaînes latérales (P450scc ou CYP11A1) qui est située au niveau de la membrane mitochondriale interne (Clark et al. 1994). La protéine StAR (steroidogenic acute regulatory) est un acteur clé du transfert du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne, où est localisée l'enzyme CYP11A1. L'expression de CYP11A1 est retrouvée dans les trois couches du cortex surrénalien (T. Suzuki et al. 2000; Baranowski, Arlt, and Idkowiak 2018) et permet d'assurer la conversion du cholestérol en prégnénolone, étape commune à la synthèse de tous les stéroïdes. Les étapes suivantes et le "destin" de la prégnénolone dépendent de la présence et de l'activité zone spécifique d'une combinaison distincte d'enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse.

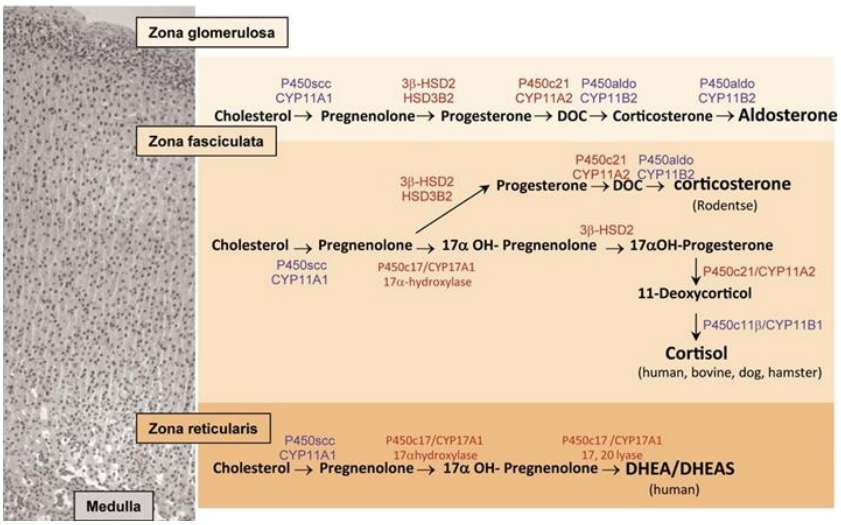


Figure 10. Stéroïdogenèse dans les trois zones du cortex surrénalien. De : Payet et al, 60 YEARS OF POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH, DOI:https://doi.org/10.1530/JME-15-0257

La synthèse des minéralocorticoïdes a lieu dans la zone glomérulée et nécessite l'action successive de trois enzymes :

1) la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (HSD3B2), qui effectue la conversion irréversible du groupe hydroxyle en un groupe céto sur le carbone 3 et l'isomérisation simultanée de la double liaison de la position Δ5 à la position Δ4 (Lachance et al. 1990), transformant la prégnénolone en progestérone ;

2) La 21-hydroxylase (CYP21A2, P450c21), qui convertit la progestérone en 11-désoxycosticostérone ;

3) L'aldostérone synthase (CYP11B2, P450c11AS), qui catalyse les trois dernières étapes de la synthèse de l'aldostérone : la 11β-hydroxylation, la 18-hydroxylation et l'oxydation du 18-méthyle. Le groupe 18-aldéhyde, dont dérive le nom "aldostérone", forme un hémiacétal cyclique intramoléculaire à l'aide du groupe 11β-hydroxyle, avec perte d'eau. La synthèse d'aldostérone est restreinte à la ZG : c'est la seule zone qui exprime CYP11B2. En revanche, la ZG exprime peu de 17α-hydroxylase/17,20-lyase (CYP17A1, P450c17), enzyme qui oriente les substrats stéroïdiens vers la synthèse du cortisol et des androgènes (Epstein and White 1994) (Figure 11).

La stéroïdogenèse est régulée par différents stimuli. Ainsi, la production de minéralocorticoïdes par la zone glomérulée est régulée principalement par le système rénine angiotensine et les concentrations en potassium extracellulaire alors que la production de glucocorticoïdes par la zone fasciculée est régulée par l'ACTH. La production de catécholamines par la médulla est régulée par le système nerveux sympathique et l'état de stress. Et d'une manière intéressante, il existe des boucles endocriniennes permettant la mise en place de rétrocontrôle négatif (Figure 12).

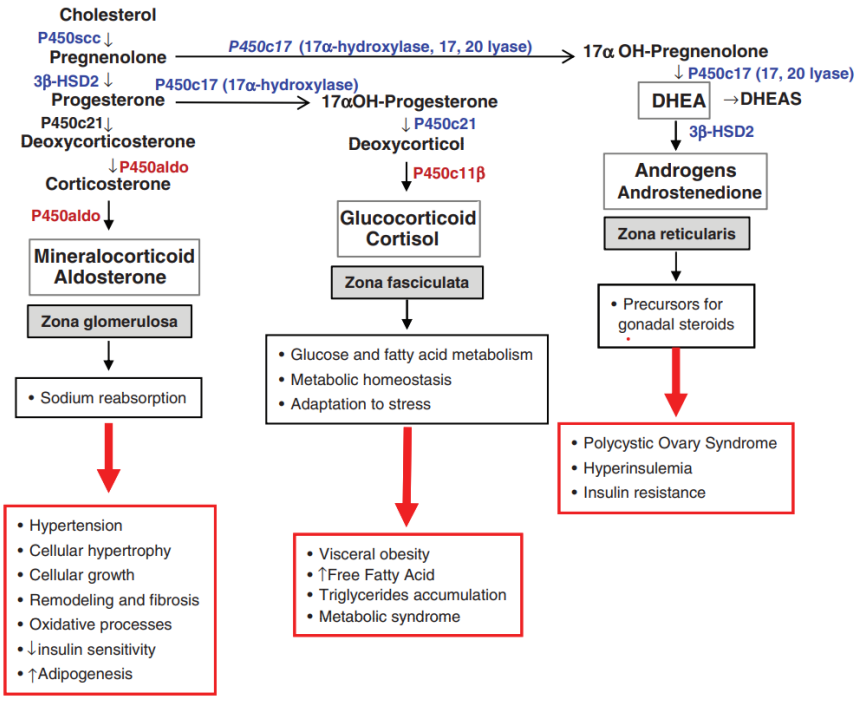


Figure 11. Les stéroïdes produits par le cortex surrénalien et leurs actions respectives. De Payet et al, Steroidogenesis-adrenal cell signal transduction- DOI: 10.1002/cphy.c130050

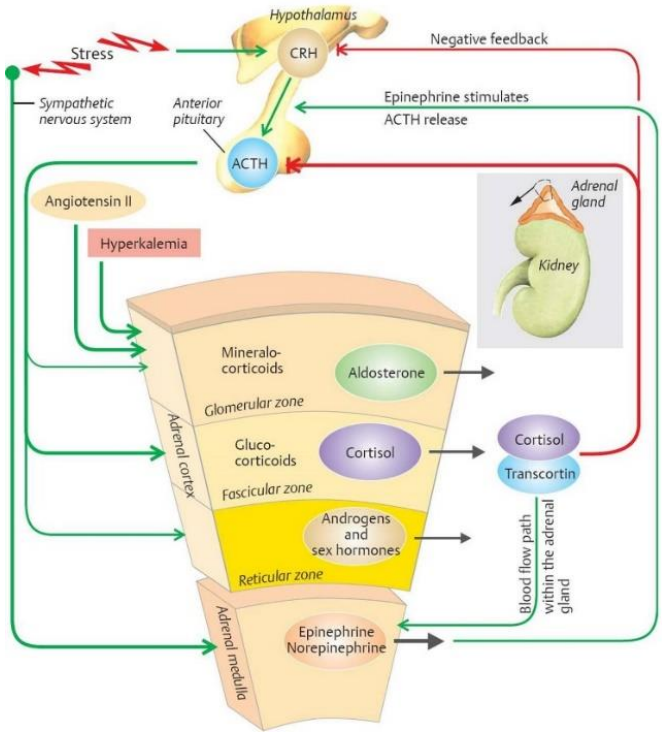


Figure 12. Régulation de la stéroïdogenèse. La sécrétion d'hormones par le cortex surrénalien est sous contrôle hypothalamique et hypophysaire. La médullo-surrénale est stimulée pour libérer des catécholamines par l'activation du système nerveux sympathique en réponse notamment au stress. L'hyperkaliémie et l'angiotensine II stimulent la biosynthèse de l'aldostérone, l'ACTH celle de cortisol. Les hormones corticosurrénales provoquent une rétro-inhibition de leurs hormones régulatrices en amont. Le cortisol agit également de manière paracrine pour stimuler la libération de catécholamines. L'épinéphrine et la norépinéphrine agissent sur l'hypophyse pour stimuler la libération de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). (CRH, hormone de libération des corticotrophines).

5.4.1 Mécanismes de régulation de la biosynthèse d'aldostérone

L'aldostérone joue un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle en raison de ses effets sur la réabsorption du sodium et la sécrétion du potassium par le rein. L'aldostérone exerce ainsi ses effets sur de nombreux tissus épithéliaux, comme le rein, le colon, les glandes salivaires et sudoripares mais aussi dans de nombreux autres tissus comme le cœur, le cerveau, le tissu adipeux.

Sur le système cardiovasculaire, l'excès d'aldostérone induit une hypertrophie cardiaque, de la fibrose et un remodelage vasculaire (He and Anderson 2013). Sur le cerveau, l'aldostérone pourrait favoriser les adaptations physiologiques et comportementales à court terme en réponse à des conditions de faible concentration en sodium (Geerling and Loewy 2009). Et finalement, il a été montré que l'aldostérone pourrait induire une résistance à l'insuline et une inflammation dans le tissu adipeux (Dinh Cat et al. 2016).

Ainsi, la biosynthèse de l'aldostérone est régulée par le système rénine-angiotensine (SRA) (Figure 13), par les concentrations en potassium extracellulaire et, dans une moindre mesure, par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) (Connell and Davies 2005). Nous le verrons plus loin, la biosynthèse d'aldostérone peut également être régulée par d'autres facteurs.

En cas de déshydratation, de baisse de la natrémie ou d'hémorragie, il y a une réduction de la perfusion rénale détectée par l'appareil juxtaglomérulaire. Au niveau de cet appareil juxtaglomérulaire, on trouve des cellules musculaires lisses vasculaires spécialisées qui sécrètent de la rénine en réponse à ces stimuli. L'étape initiale du système rénine angiotensine aldostérone (SRAA) est la synthèse de l'angiotensinogène dans le foie. L'angiotensinogène est ensuite converti en angiotensine (Ang) I sous l'action de la rénine qui est régulée par l'activité des barorécepteurs rénaux (S. Patel et al. 2017). L'Ang I est ensuite converti en Ang II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), qui est libérée de manière ubiquitaire par les cellules endothéliales (S. Patel et al. 2017). Il a été montré récemment que l'ACE-2 pouvait convertir l'Ang II en Ang-(1-7), qui pourrait atténuer la fonction de l'Ang II en exerçant des effets inverses (S. K. Patel et al. 2014). L'Ang-(1-7) peut être considéré comme un produit de dégradation de l'Ang II (Santos et al. 2018). L'Ang-(1-7) agit en se fixant sur son récepteur MasR qui est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G (RCPG), entrainant l'activation de différentes voies de signalisation. L'axe ACE2/Ang-(1-7)/MasR exerce un rôle cardioprotecteur ainsi que des actions vasodilatatrices (Alenina and dos Santos 2015). Une déficience en MasR, chez la souris, entrainent le développement d'une fibrose et d'un dysfonctionnement cardiaque ainsi que des effets extracardiaques surtout au niveau du cerveau et des reins (Santos et al. 2018).

L'angiotensine II a un effet important sur la vasoconstriction, l'activation du système nerveux sympathique mais surtout, elle stimule la production d'aldostérone par le cortex surrénal. L'aldostérone agit ensuite notamment au niveau du rein et plus particulièrement sur la partie distale des néphrons où elle stimule la réabsorption du sodium et l'excrétion du potassium, ce qui entraîne également une réabsorption d'eau. Il y a ainsi un effet de rétention d'eau et de sel, induisant une augmentation du volume extracellulaire et de la perfusion de l'appareil juxtaglomérulaire, ce qui a pour conséquence d'inhiber la production de rénine et ainsi celle d'aldostérone. L'activation du système rénine angiotensine conduit à la stimulation de la biosynthèse d'aldostérone via la liaison de l'angiotensine II (AngII) à son récepteur de type 1 (AT1R) exprimé par les cellules de la ZG. L'AT1R est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à la protéine $G\alpha_q$. La protéine $G\alpha_q$ agit notamment en activant la phospholipase C, induisant la génération d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) à partir de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2). La fixation de l'IP3 sur son récepteur (IP3R) situé au niveau du réticulum endoplasmique stimule le relargage de Ca^{2+} depuis le réticulum, augmentant ainsi la concentration intracellulaire en Ca^{2+} et activant la voie de signalisation calcique qui met en jeu notamment l'activation des Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinases I et II (CaMKI et CaMKII) (Hattangady et al. 2012). Ces kinases vont alors phosphoryler un certain nombre de protéines cibles impliquées dans la régulation de la biosynthèse de l'aldostérone. L'AngII agit également en inhibant l'activité des canaux potassiques TASK (TWIK-related acid-sensitive K^+) et de la pompe Na^+,K^+-ATPase, entrainant une dépolarisation de la membrane cellulaire, l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et l'activation de la signalisation calcique (Hattangady et al. 2012). Ainsi, des travaux menés sur une lignée de cellules corticosurrénalienne afin étudier la cinétique de la production d'aldostérone en réponse à l'AngII ont montré que l'AngII augmente l'expression des facteurs de transcription NGFIB et Nurr1 connus pour stimuler la production d'aldostérone (Szekeres et al. 2009). La stimulation de la signalisation calcique résulte ainsi en une stimulation de la biosynthèse d'aldostérone.

De même, une augmentation des concentrations de potassium extracellulaire régule la biosynthèse d'aldostérone. En effet les cellules de la ZG expriment un grand nombre de canaux potassiques et sont ainsi très sensible à de faibles variations de la kaliémie (Heitzmann et al. 2008). Ainsi l'augmentation du potassium extracellulaire induit une diminution de la conductance électrochimique des canaux potassiques TASK et TREK (TWIK-related K^+ channel), entrainant une dépolarisation de la membrane cellulaire suivie d'une activation des canaux calciques voltage-dépendants et d'une activation de la signalisation calcique (S. Bandulik 2017), le principal effecteur de la régulation de la biosynthèse d'aldostérone.

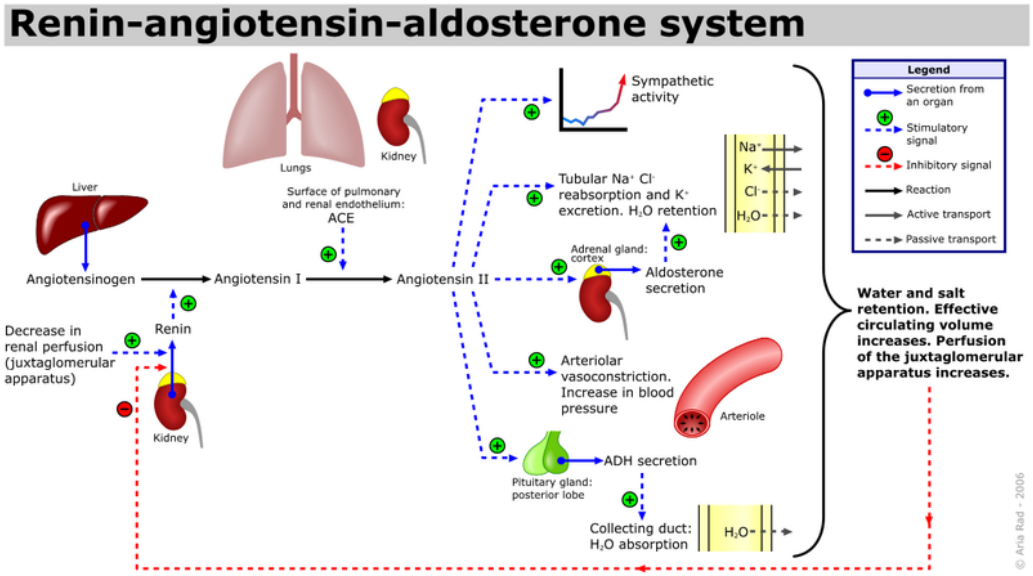


Figure 13. Système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA). Initiation et effets dans l'organisme (de Wikimedia Commons, le dépôt de médias libres ; https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Renin angiotensinaldosterone_system.svg&oldid=288052845

Dans certaines conditions, l'ACTH peut également réguler la biosynthèse d'aldostérone. L'ACTH se lie à son récepteur, le récepteur de la mélanocortine de type 2 (MC2R). Il s'agit d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine $G\alpha_s$. La fixation de l'ACTH sur ce récepteur active l'adénylate cyclase (AC), induisant l'activation de la voie de la PKA. La PKA active StAR (steroidogenic acute regulatory protein) soit directement par la phosphorylation au niveau de la sérine 194 chez la souris ou la sérine 195 chez l'homme, ce qui constitue une importante modification post-traductionnelle affectant la fonction de StAR (Baker et al. 2007), soit en augmentant son expression via la phosphorylation de CREB (cAMP response element binding protein), augmentant ainsi la quantité de cholestérol délivrée à la membrane mitochondriale interne. En outre, l'ACTH augmente également l'expression d'autres enzymes de la cascade stéroïdogénique, comme CYP11A1, augmentant ainsi la quantité de précurseurs pour la biosynthèse de l'aldostérone (Sewer and Waterman 2003; Ruggiero and Lalli 2016).

En plus de ces boucles de régulation endocrine, des mécanismes de régulation autocrine et paracrine de la production de l'aldostérone ont été décrits. Différents facteurs produits par les cellules stéroïdogènes, comme la rénine et l'AngII (Naruse et al. 1983; Nakamaru et al. 1985; P. Mulrow 1998), l'acide époxyeicosatriénoïque (EET) ou la prostaglandine E2 (PGE2), peuvent moduler la sécrétion de l'aldostérone par un mécanisme autocrine (Hervé Lefebvre et al. 2019). Des composants du SRA ont été décrits dans la surrénale, mais leur rôle dans la fonction surrénalienne et surtout dans la biosynthèse d'aldostérone n'est toujours pas clair (P. J. Mulrow 1992). Il a été proposé que le SRA

surrénalien puisse jouer un rôle dans le contrôle de la production de l'aldostérone en réponse à une augmentation du potassium extracellulaire (Nakamaru et al. 1985). Il est intéressant de noter que chez des souris de type sauvage, une production surrénalienne de rénine a été observée pendant le développement embryonnaire, alors que les reins sont immatures (Kon et al. 1990), mais qu'elle est inhibée après la naissance. Cependant, dans des modèles de souris spécifiques, l'expression de la rénine est observée même chez les souris adultes pour compenser une déficience en protéines impliquées dans le contrôle de la biosynthèse de l'aldostérone. C'est le cas chez les souris déficientes en Task3 (Sascha Bandulik et al. 2013) ou en aldostérone synthase (Lee et al. 2005), ainsi que chez les souris déficientes en mastocytes sous régime pauvre en sel (Boyer et al. 2017).

En outre, la régulation paracrine de la production d'aldostérone est médiée par des facteurs libérés par des composants du microenvironnement : cellules chromaffines, cellules endothéliales, adipocytes, fibres nerveuses et cellules immunitaires, tant dans les surrénales humaines normales que dans les surrénales de patients avec un adénome produisant de l'aldostérone (APA) (Ehrhart-Bornstein et al. 1998; Duparc et al. 2015; Wils et al. 2020; Lopez et al. 2020). Il est intéressant de noter que la sérotonine (5-HT) libérée par les mastocytes périvasculaires a été montrée pouvoir induire la production d'aldostérone en activant le récepteur 4 de la 5-hydroxytryptamine (5-HT4) exprimé dans les cellules de la ZG (H. Lefebvre et al. 2001). Les cellules chromaffines et les fibres nerveuses stimulent la production d'aldostérone en sécrétant des neurotransmetteurs (NT), notamment des catécholamines et divers neuropeptides (Louiset, Duparc, and Lefebvre 2019). En particulier, il a été démontré récemment que le neuropeptide substance P libéré par les fibres nerveuses intra-surrénales est capable de réguler la biosynthèse d'aldostérone dans le cortex surrénalien humain en se liant aux récepteurs de type 1 des neurokinines (Wils et al. 2020). La cytokine C1q/TNF related protein et l'adipokine leptine sont également capables in vitro d'activer la production d'aldostérone (Faulkner and Belin de Chantemèle 2019; Huby et al. 2015). Il a été montré que les cellules de la ZG expriment des récepteurs de la leptine permettant à la leptine libérée par les adipocytes surrénaliens ou péri-surrénaliens d'avoir un effet direct sur la production d'aldostérone (Faulkner and Belin de Chantemèle 2019). Enfin, les cellules endothéliales sécrètent l'endothéline 1 (ET-1) qui, en se liant aux récepteurs de l'endothéline de type A et B (ET-A, ET-B) sur les cellules corticosurrénales, peut stimuler la production d'aldostérone (G. Rossi et al. 1994; Zeng et al. 1998) (Figure 14).

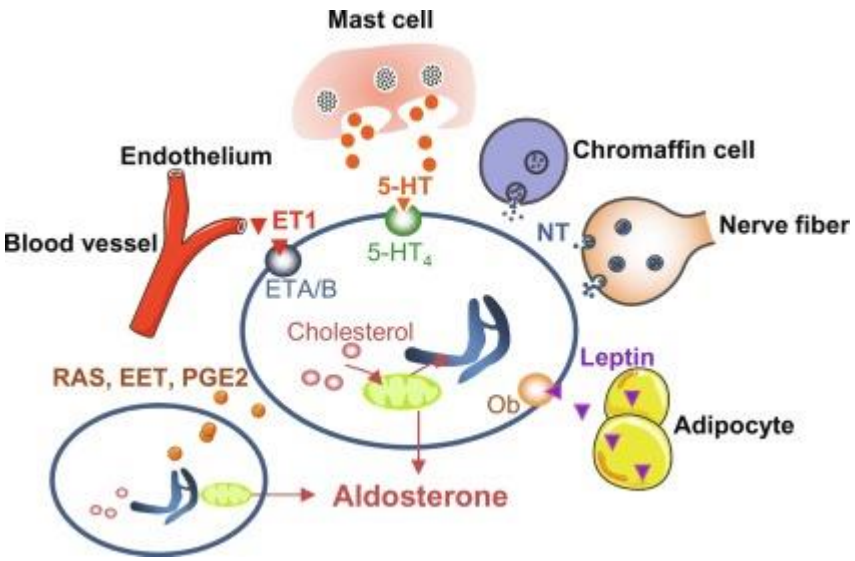


Figure 14. Les principaux stimulateurs paracrines de la production de l'aldostérone. De: Lefebvre et al, Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions, DOI: 10.3389/fendo.2016.00098

5.4.2 Mécanismes de régulation de la biosynthèse du cortisol

La biosynthèse des glucorticoïdes se produit au niveau de la ZF du cortex surrénalien et est régulée par le rythme circadien et le stress. Ces stimuli induisent la sécrétion de l'hormone de libération de la corticotropine (CRH) et de la vasopressine qui stimulent ensuite la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. L'ACTH stimule ensuite la production de glucorticoïdes par la zone fasciculée. Les glucorticoïdes ont de nombreux effets notamment sur le système immunitaire et inflammatoire, la dépression et l'anxiété, la croissance et la reproduction et bien d'autres encore (Whirledge and Cidlowski 2010).

La production de glucocorticoïdes suit un rythme circadien (Figure 15). Au niveau moléculaire, l'ACTH se lie au récepteur MC2R exprimé par les cellules de la zone fasciculée. Comme nous l'avons vu précédemment, le MC2R est un récepteur couplé à une protéine $G\alpha_s$ permettant l'activation de l'adénylate cyclase (AC) et l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. L'AC se lie aux sous-unités régulatrices de la PKA, ce qui entraîne la libération des sous-unités catalytiques. Ces sous-unités catalytiques phosphorylent des facteurs de transcription spécifiques comme CREB qui se lie à des

éléments régulateurs de *CYP11B1* et induit la biosynthèse du cortisol. La PKA phosphoryle également d'autres facteurs impliqués dans la stéroïdogenèse comme STAR.

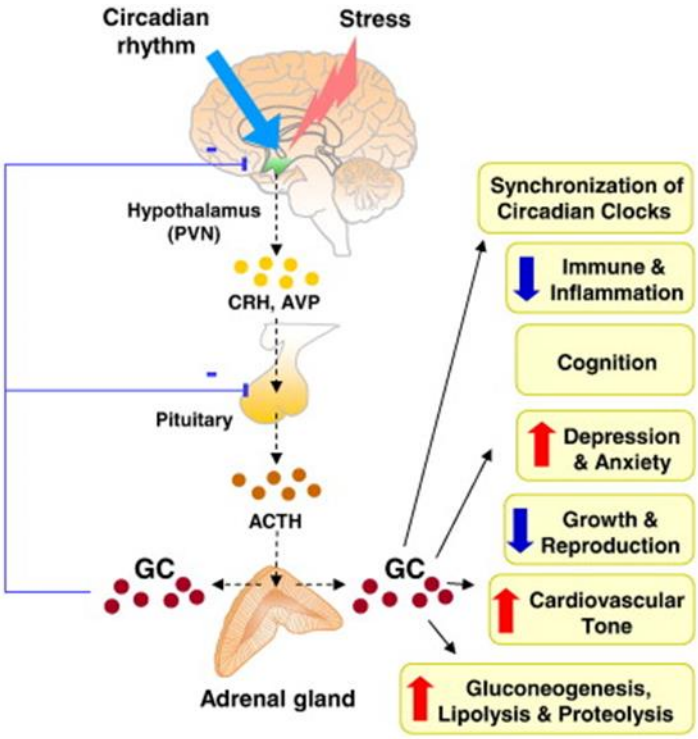


Figure 15. Régulation de la production des glucocorticoïdes et ses rôles physiologiques. La production de glucocorticoïdes (GC) est principalement régulée par l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), un circuit neuroendocrinien majeur du système de réponse au stress. Lorsque certains signaux neurochimiques atteignent l'hypothalamus à la suite d'un stress ou d'une entrée circadienne, un sous-ensemble de cellules neurosécrétrices localisées dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus libère de la CRH et de l'AVP pour induire la synthèse et la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse. L'ACTH stimule ensuite les cellules corticosurrénaliennes pour produire et sécréter des GC. Les GC exerce un rétro-contrôle de leur production en agissant sur l'axe neuroendocrinien HPA. En outre, les GC exercent des actions étendues dans l'organisme, selon les besoins, pour rétablir et maintenir diverses fonctions physiologiques. De : Son et al, The adrenal peripheral clock: glucocorticoid and the circadian timing system, DOI: 10.1016/j.yfrne.2011.07.003

Les glucocorticoïdes sont synthétisés dans la ZF. Comme pour l'aldostérone cela est dû à l'expression zone-spécifique de certaines enzymes clés, notamment CYP17A1 et CYP11B1. L'enzyme CYP17A1 catalyse la 17α-hydroxylation de la prégnénolone pour donner la 17-hydroxyprégnénolone et de la progestérone pour donner de la 17 hydroxyprogestérone (17OHP) avec une efficacité équivalente. L'enzyme CYP17A1 clive également la liaison C17-C20 de la 17-hydroxyprégnénolone et, à un degré bien moindre, de la 17-hydroxyprogestérone, ce qui conduit à la formation des stéroïdes à 19 atomes de carbone (C19). Les activités de la HDS3B2 et de CYP21A2, permettent la conversion des 17-hydroxystéroïdes en 11-déoxycortisol (DOC). Enfin, l'activité de la 11β-hydroxylase (CYP11B1, P450c11β), une enzyme qui présente une très forte homologie avec CYP11B2, est responsable de la biosynthèse du cortisol. Chez les rongeurs et de nombreux petits animaux, la ZF est dépourvue de

CYP17A1. Par conséquent, la progestérone est à la fois 21- et 11β-hydroxylée, les dernières étapes de biosynthèse des glucocorticoïdes produiront la corticostérone à la place du cortisol. La corticostérone est ainsi le glucocorticoïde dominant chez ces espèces, alors que chez l'homme c'est un précurseur du cortisol.

5.5 Dimorphisme sexuel dans le développement de la glande surrénale

En physiologie mais aussi en pathologie, les différences entre les femmes et les hommes existent. Cependant, ce dimorphisme sexuel en tant que source de différence dans le développement de certaines maladies a été largement négligé. Il a notamment été observé un dimorphisme sexuel quant à la distribution des maladies surrénaliennes entre les femmes et les hommes. Ainsi, pour les carcinomes corticosurrénaliens il existe un ratio 1.5-2.5 : 1 femme : homme (Fassnacht and Allolio 2009), pour les adénomes produisant de cortisol le ratio femme : homme est de 4–8 : 1 et pour les PPNAD (primary pigmented nodular adrenocortical disease), qui présentent un dimorphisme sexuel uniquement après l'âge de 12 ans, ce ratio est de 2–3 femmes pour 1 homme (Lacroix et al. 2015).

L'étude de différents modèles de souris a permis de mettre en évidence l'importance de ce dimorphisme sexuel dans le développement surrénalien et dans la différence de prévalence entre les femmes et les hommes dans les maladies corticosurrénaliennes. L'étude d'un modèle de souris avec une invalidation de la sous-unité régulatrice de la PKA dans le cortex surrénalien, le modèle DAdKO ($AS^{Cre/+::}Prkar1a^{fl/fl}$), a montré l'importance de la régulation de la voie de signalisation PKA dans l'homéostasie du cortex surrénalien (Dumontet et al. 2018). La voie de signalisation PKA dans la surrénale sera détaillée dans le chapitre suivant. De façon intéressante, cette étude a mis en évidence de nettes différences entre mâles et femelles dans l'homéostasie de la corticosurrénale et l'apparition/progression de la maladie. Les femelles DAdKO développent un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH dès l'âge de 3 mois, alors que chez les mâles DAdKO ce syndrome n'apparait qu'entre 7 et 12 mois. L'apparition du syndrome de Cushing et les altérations du cortex sont retardées par les androgènes, comme le montrent les expériences de castration et de supplémentation hormonale chez les mâles DAdKO. De plus, cette étude a révélé que les androgènes testiculaires activent la signalisation WNT qui antagonise la signalisation de la PKA, conduisant à une diminution du renouvellement des cellules corticosurrénaliennes qui est 3 fois plus lente chez les mâles par rapport aux femelles.

Les glandes surrénales de la souris sont sexuellement dimorphiques. En effet, les glandes surrénales des femelles présentent un poids plus élevé que celles des mâles. Dans leur étude, Bielohuby et al ont suivi le développement de la surrénale chez des souris mâles et femelles pendant plusieurs semaines

à partir de la naissance. Ils ont ainsi montré qu'il existe une première phase de croissance rapide dans la surrénale des souris jusqu'à la 7ème semaine. Entre la 3ème et la 7ème semaine, le poids des glandes surrénales est multiplié par deux chez les femelles comme chez les mâles. Par la suite, alors que chez les souris femelles le poids des glandes surrénales reste constant après la 7ème semaine, chez les souris mâles il a été montré une réduction de 25 % de leur poids entre les 7ème et 9ème semaine. Afin d'aller plus loin dans la compréhension du dimorphisme sexuel dans la corticosurrénale, les auteurs de ce travail ont étudié comment les différentes zones du cortex évoluaient en fonction de l'âge et du sexe. Si jusqu'à l'âge de 7 semaines le volume de la ZG est similaire entre les femelles et les mâles, il diminue chez les souris mâles à 9 semaines pour réaugmenter ensuite entre la 9ème et la 11ème semaine alors qu'il demeure inchangé chez les souris femelles pendant cette période. La ZF atteint, quant à elle son volume maximal à l'âge de 5 semaines mais présente un volume significativement plus important chez les souris femelles. Bien que le volume de la ZF soit moindre chez les souris mâles comparé aux souris femelles, les concentrations sériques de corticostérone ne sont significativement plus basses que chez les souris âgées de 5 semaines (Bielohuby et al. 2007). Les auteurs expliquent ce résultat par la forte variation interindividuelle connue des niveaux de corticostérone sérique (Bielohuby et al. 2007).

La glande surrénale est un tissu qui présente une grande sensibilité au stress et produit des glucocorticoïdes après stimulation par l'ACTH. Il est intéressant de noter que cette réponse est soumise au rythme de l'horloge circadienne surrénalienne. Les travaux de Stagl et al ont également montré que la réactivité des glandes surrénales à l'ACTH était soumise à un dimorphisme sexuel chez la souris, la réactivité étant meilleure dans les surrénales des souris femelles (Stagl et al. 2018; Levasseur, Dumontet, and Martinez 2019).

Le renouvellement du cortex surrénalien est également un processus soumis à un dimorphisme sexuel. Alors que le remplacement complet du cortex surrénalien prend trois mois chez les souris femelles, il est de neuf mois chez les souris mâles (Grabek et al. 2019). Alors que chez les souris mâles, le renouvellement du cortex est principalement alimenté par la prolifération des cellules situées dans la ZG, chez les souris femelles il y a également un recrutement de cellules mésenchymateuses de la capsule. La prolifération ainsi que le recrutement de cellules souches sont tous les deux réprimés par les androgènes, ce qui apporte une explication moléculaire au dimorphisme sexuel de développement de la surrénale. En effet, il a été montré que chez les souris mâles, l'action des androgènes ralentissait les processus de renouvellement et de reconstitution du cortex par des mécanismes qui restent à clarifier. Chez les souris femelles, dans la capsule surrénalienne, des cellules souches $Gli1^+$ peuvent soit proliférer soit être recrutées pour assurer le renouvellement cellulaire du cortex définitif/adulte ; de même, les cellules progénitrices $Axin2^+/Shh^+$ résidant dans la ZG peuvent suivre la même voie

(Levasseur, Dumontet, and Martinez 2019). La migration centripète et la différenciation zonale résultent de l'interaction antagoniste entre les voies de signalisation WNT et PKA, la voie WNT favorisant l'identité ZG, tandis que la voie PKA stimule le renouvellement cellulaire et favorise la conversion à l'identité ZF et finalement à l'identité ZR. Dans la ZF, la voie Hippo exerce un rôle répressif dans la différenciation et le maintien de la ZF et donc potentiellement dans celui de la ZR.

Dumontet et al ont montré que les androgènes limitent cette action de renouvellement du cortex surrénalien en soutenant la voie RSPO/Wnt/β-caténine (Dumontet et al. 2018). Des éléments de réponse quant au rôle des androgènes dans ces processus pourraient être fournis par une étude récente dans laquelle le lignage des cellules souches surrénaliennes a été suivi chez des souris ayant subie une gonadectomie suivi d'un traitement à la dihydrotestostérone (DHT), un métabolite biologiquement actif de la testostérone (Grabek et al. 2019). Cette étude a révélé qu'après la puberté, l'activité des cellules souches est dirigée par les androgènes qui répriment le recrutement et la prolifération cellulaire des cellules souches capsulaires $Gli1^+$, ne laissant disponible pour le renouvellement du cortex qu'un seul compartiment progéniteur, les cellules Shh^+ sous capsulaires (Grabek et al. 2019). En revanche, chez les femelles l'absence d'androgène permet le recrutement au sein de deux populations différentes de cellules souches situées dans les compartiments capsulaire et stéroïdogène ($Gli1^+$et Shh^+) pour assurer le renouvellement du cortex conduisant à un renouvellement 3 fois plus rapide du cortex chez les souris femelles par rapport aux souris mâles (Figure 16).

Chez les souris femelles le taux de prolifération des cellules stéroïdogènes est 6,3 fois plus élevé que chez les souris mâles (Grabek et al. 2019) ; cependant cette augmentation de la prolifération observée dans le cortex surrénalien des souris femelles est contrebalancée par une augmentation de l'apoptose ce qui garantit le maintien de la taille des tissus (Grabek et al. 2019).

Ces études ont montré que chez les souris femelles mais pas chez les souris mâles, le renouvellement du cortex surrénalien se faisait notamment via le recrutement continuel de cellules souches capsulaires qui se transdifférencient vers la lignée des cellules stéroïdogènes. Enfin dans ce travail, Grabek et al ont montré que le dimorphisme sexuel observé dans le renouvellement du cortex surrénalien dépendait de l'activité des gonades plutôt que des chromosomes sexuels. En effet, chez des souris femelles Gli1-CreERT2::mTmG ovariectomisées à l'âge de 8 semaines puis recevant de la DHT pendant 6 semaines, il a été observé, en comparaison à des souris contrôles, une réduction significative de la prolifération des cellules capsulaires ainsi que du recrutement des cellules capsulaires $Gli1^+$, qui se trouve presque entièrement supprimé. De plus, chez des souris femelles gestantes, le traitement à la DHT, à partir de E14.5, inhibe le recrutement des cellules capsulaires au cours du développement des surrénales chez l'embryon (au stade E19.5). Ainsi, ces résultats révèlent

un rôle des androgènes dans l'inhibition de la prolifération et le recrutement des cellules souches capsulaires dans le renouvellement et le développement du cortex surrénalien.

Enfin, une étude récente du rôle de la voie de signalisation de la PKA dans le remodelage de la corticosurrénale a montré que cette signalisation était également impliquée dans le dimorphisme sexuel surrénalien et pourraient contribuer à expliquer la surreprésentation des maladies corticosurrénaliennes chez les femmes. Des souris avec une délétion génétique ciblée de *Prkar1a* spécifiquement dans la surrénale à l'âge adulte ou au stade fœtale ont été générées afin d'étudier l'homéostasie et la différenciation des surrénales et suivre la dynamique cellulaire ainsi que le remodelage du cortex chez les mâles et les femelles. Cette étude a montré que l'activation constitutive de la PKA accélérait le renouvellement cellulaire du cortex surrénalien dépendant des cellules de la ZG. Ce renouvellement nécessite une augmentation de la différentiation des cellules de la ZF. Ce mécanisme est moins actif chez les males en raison de l'activation de la signalisation WNT par les androgènes, inhibant ainsi la signalisation de la PKA (Dumontet et al. 2018) (Figure 16).

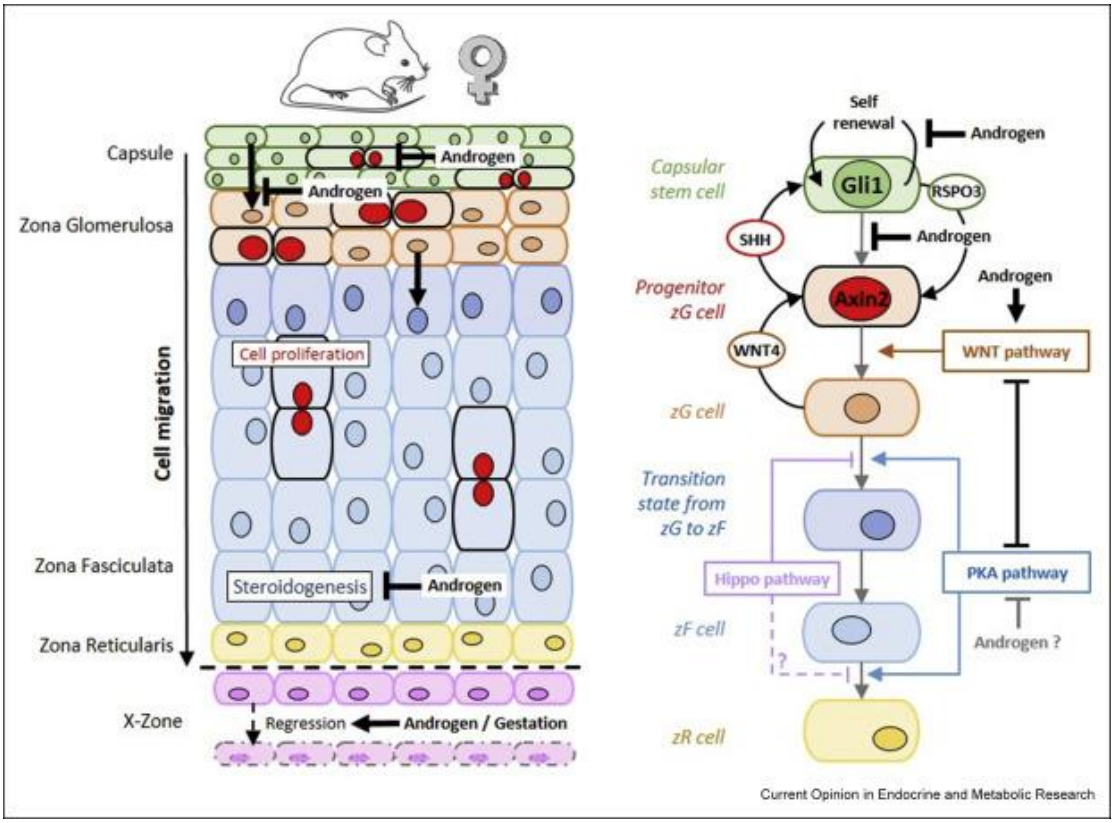


Figure 16. Le renouvellement du cortex surrénalien chez la femelle et le rôle des androgènes dans ce renouvellement. De : Grabek et al, The Adult Adrenal Cortex Undergoes Rapid Tissue Renewal in a Sex-Specific Manner DOI: 10.1016/j.stem.2019.04.012

5.6 Voies de signalisation dans la glande surrénale

Dans le cortex surrénalien, il est maintenant clairement établi que différentes voies de signalisation contrôlent les mécanismes de prolifération, de différenciation et de zonation. Ainsi, les voies de signalisation du facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), de Wnt, de HedgeHog et de la protéine kinase A jouent un rôle majeur au cours du développement embryonnaire et de l'homéostasie, mais aussi dans le maintien à long terme et la différenciation des populations de cellules souches et progénitrices dans le cortex surrénalien (Figure 17). Leur dérégulation joue un rôle pathogène dans divers troubles héréditaires et acquis de la corticosurrénale. Le rôle de certaines de ces voies va être détaillées dans les paragraphes qui suivent.

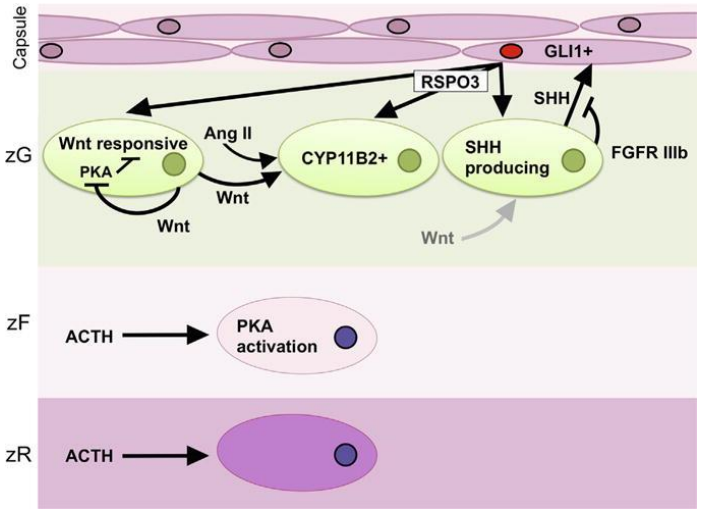


Figure 17. Les voies de signalisation dans le cortex surrénalien. Sonic Hedgehog (SHH) est produit par des groupes de cellules dans la ZG (cellules productrices de SHH), qui servent de population souche/progénitrice pour le cortex surrénal embryonnaire et postnatal. SHH agit sur les cellules capsulaires, provoquant l'expression et l'activation de GLI1 (GLI1$^+$). La signalisation en aval du récepteur des facteurs de croissance des fibroblastes IIIb (FGFR IIIb) dans les cellules ZG sous-capsulaires réduit la signalisation SHH chez la souris embryonnaire. Les cellules GLI1$^+$ constituent également des cellules souches/progénitrices dans le cortex surrénalien. Les cellules sensibles à Wnt sont celles qui présentent une signalisation Wnt canonique active. Le ligand WNT4, une cible et un effecteur de la signalisation Wnt canonique, agit sur les cellules de la ZG qui sécrètent l'aldostérone en réponse à l'angiotensine II (Ang II). L'expression de WNT4 augmente l'expression de CYP11B2 et la biosynthèse d'aldostérone. En l'absence de WNT4 ou en présence d'une stimulation accrue par l'ACTH, la PKA inhibe la signalisation Wnt canonique. Le ligand RSPO3 potentialise la signalisation Wnt et est nécessaire à l'expression de SHH, WNT4 et CYP11B2, tant au niveau embryonnaire que dans la surrénale post-natale. La majorité de la RSPO3 est produite par les cellules capsulaires GLI1$^+$. Les mécanismes connus d'action de RSPO3 sont médiés par la présence de ligands Wnt, bien que l'implication significative de Wnts spécifiques sur les cellules productrices de SHH (indiquées par la flèche grise) n'ait pas été démontrée dans le cortex surrénalien. Dans la ZF, l'ACTH stimule l'activité de la PKA, qui est associée à la croissance et à la production de cortisol. De : Penny et al, Cell signaling pathways in the adrenal cortex: Links to stem/progenitor biology and neoplasia, doi: 10.1016/j.mce.2016.12.005

5.6.1 La voie de signalisation Shh

Sonic hedgehog (Shh) est une protéine sécrétée de la famille hedgehog. Shh agit en se fixant à la protéine membranaires Patched homolog 1 (Ptch1). En absence de Shh, Ptch1 forme un complexe avec smoothened (Smo), une autre protéine membranaire, réprimant ainsi son activité. La fixation de Shh à Patched entraine la dissociation du complexe Ptch1/Smo et l'activation de la voie de signalisation, mettant en jeu les facteurs de transcription à doigt de zinc de la famille Gli, Gli1, Gli2 et Gli3, et la régulation de l'expression d'un certain nombre de gènes cibles (Laufer et al. 2012; Gomes et al. 2014). La voie de signalisation Shh joue un rôle majeur dans la physiologie des cellules souches et dans l'organogenèse.

Chez la souris, l'expression de Shh commence dès le jour E13.5 de développement embryonnaire (Ching and Vilain 2009). Shh est exprimée au niveau de la couche sous capsulaire de cellules corticales à E14,5, elle a également été trouvée dans ces mêmes groupes de cellules à des stades de développement plus précoces (E13,5) et plus tardifs (E15,5, P0, adulte). Par rapport au volume total de la surrénale, le nombre de cellules exprimant Shh diminue avec l'âge, l'expression se trouvant restreinte à une fine couche de cellules sous-capsulaires.

La localisation des cellules cibles de Shh a été étudiée par l'expression de son récepteur Patched homolog 1 (Ptch1) et d'un facteur de transcription induit par la signalisation Hh, Gli1 par Guasti et al (Guasti et al. 2011). Les cellules cibles de Shh ont été détectées dans la capsule de la surrénale. Il a été montré également que les cellules qui produisent Shh possèdent un potentiel stéroïdogène, comme le montre l'expression de Sf1 et de Star, cependant elles n'expriment aucune des autres enzymes nécessaires aux réactions terminales de la production de minéralocorticoïdes ou de glucocorticoïdes (Laufer et al. 2012).

Au cours du développement de la glande surrénale, les cellules exprimant Gli1 donnent naissance aux cellules indifférenciées qui expriment Shh et à leurs cellules stéroïdogènes descendantes des trois zones corticales (P. King, Paul, and Laufer 2009). Cependant, on observe une diminution marquée de la contribution des cellules $Gli1^{+}$ à la reconstitution corticale homéostatique de la glande adulte. Au lieu de cela, les cellules exprimant Shh deviennent les principaux contributeurs au maintien des cellules corticales adultes. Des études de lignage qui ont permis de suivre les cellules exprimant Shh et les cellules dérivées révèlent que si les cellules exprimant Shh sont limitées au cortex externe, les cellules

issues de cellules exprimant Shh forment des bandes radiales clonales qui descendent dans le cortex au fil du temps, peuplant à la fois le ZG et le ZF (P. King, Paul, and Laufer 2009). Ces études indiquent un rôle potentiel pour les cellules exprimant Shh en tant que population souche/progénitrice du cortex surrénal. En effet, la perte globale ou spécifique aux surrénales de Shh entraîne une réduction du primordium surrénalien et la présence d'un cortex surrénalien hypoplasique, respectivement (Ching and Vilain 2009).

L'inactivation conditionnelle de Shh dans les cellules exprimant SF1 du cortex surrénalien à l'aide d'un système Cre-loxP ($Shh^{fl/fl;\ SF1/Cre+}$) entraine une hypoplasie et une désorganisation importantes du cortex. Chez ces souris, il a été montré que la masse des surrénales était considérablement réduite et que l'encapsulation de la médulla par le cortex ne se faisait pas, alors que l'initiation de la différenciation des corticosurrénales semblait se dérouler normalement (Ching and Vilain 2009). Il est à noter également une sécrétion plus élevée d'ACTH en comparaison aux souris sauvages, suggérant également un rôle de Shh dans la modulation de la fonction endocrine du cortex surrénalien.

De façon remarquable, une analyse du phénotype moléculaire des APA réalisée au laboratoire a mis en évidence une augmentation importante de l'expression de Shh au niveau de la ZG hyperplasique péritumorale mais aussi au niveau de l'APA. De plus, des analyses transcriptomiques réalisées sur 12 APA et 11 surrénales contrôles démontrent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation Shh (Boulkroun et al. 2011). Il reste maintenant à comprendre si l'activation de cette voie de signalisation contribue à une prolifération cellulaire accrue ou si elle serait à l'origine de la formation de l'APA.

5.6.2 La voie de signalisation Wnt/β-caténine

La voie de signalisation Wnt/β-caténine est indispensable pour la croissance, la prolifération cellulaire et le maintien de l'intégrité des tissus dans de nombreux organes tels que l'intestin, le foie, le cerveau et la surrénale (Drelon et al. 2016).

On distingue les voies de signalisation Wnt canonique en non canonique. La voie de signalisation Wnt canonique est largement impliquée dans le maintien de l'homéostasie de la corticosurrénale, et la dérégulation de cette voie est notamment impliquée dans le développent des adénomes et de cancers de la corticosurrénale. La signalisation Wnt canonique, également appelée signalisation Wnt/β-caténine, est caractérisée par la stabilisation de la β-caténine en aval de la liaison du ligand Wnt aux récepteurs de surface cellulaire Frizzled. Par la suite, la β-caténine est transloquée dans le noyau et

joue le rôle de co-activateur de cibles transcriptionnelles (MacDonald, Tamai, and He 2009). La voie de signalisation Wnt non canonique englobe différentes cascades de signalisation dépendantes de Wnt et indépendantes de la β-caténine, ce qui inclut la voie de polarité cellulaire planaire qui joue un rôle dans la régulation du cytosquelette et les voies Wnt-calcium (Komiya and Habas 2008).

Je vais me focaliser sur la voie de signalisation dite canonique dont la caractérisation dans la surrénale est beaucoup plus complète. En l'absence de ligands Wnt, la localisation nucléaire de la β-caténine et l'activité transcriptionnelle subséquente sont inhibées par un complexe de destruction, qui comprend les protéines AXIN, APC, GSK3β et CK1. Ce complexe de destruction se lie à la β-caténine cytoplasmique libre et la phosphoryle sur des résidus sérine et thréonine spécifiques, conduisant à son ubiquitination et à sa dégradation par le protéasome. Lors de la liaison d'un ligand Wnt au récepteur Frizzled et au corécepteur LRP5/6, le complexe de destruction est inactivé, permettant l'accumulation cytoplasmique de la β-caténine et sa translocation nucléaire. Dans le noyau, la β-caténine forme des complexes avec les facteurs de transcription TCF/LEF et active la transcription de gènes cibles.

Le cortex surrénalien se renouvelle continuellement, environ tous les 1 à 3 mois, malgré un taux de prolifération relativement faible (Chang et al. 2013). Des études récentes ont montré que des niveaux élevés de signalisation Wnt/β-caténine au sein de la ZG contribuent à la détermination de l'identité de cette zone à la fois en régulant positivement la transcription de gènes spécifiques à la ZG (ex, *Cyp11b2*, Aldostérone Synthase) et en régulant négativement l'expression de gènes spécifiques à la ZF (par exemple, *Cyp11b1*, 11β-hydroxylase) (Drelon et al. 2016; Berthon et al. 2014).

La voie de signalisation WNT/β-caténine a été montrée être activée dans 70% des adénomes produisant de l'aldostérone, suggérant un rôle de cette voie de signalisation dans leur développement. Ainsi l'étude d'un modèle de souris avec une activation constitutive de la β-caténine dans la surrénale a montré qu'elle pouvait stimuler une production accrue d'aldostérone. Cette stimulation serait due à l'activité transcriptionnelle de la β-caténine qui stimule l'expression de trois acteurs majeurs de la synthèse de l'aldostérone, à savoir AT1R, CYP21 et CYP11B2, par des mécanismes directs et indirects impliquant NURR1 et NUR77 (Berthon et al. 2014).

Pignatti et al (Pignatti et al. 2020) ont étudié le rôle d'une activation constitutive de la β-caténine par la délétion de l'exon 3 du gène Ctnnb1 (βcat-GOF), qui code notamment la région régulatrice de la protéine, dans la ZG du cortex surrénalien (souris $AS^{Cre/+}$::$Ctnnb1^{flox(ex3)/+}$). Cette délétion entraine une stabilisation de la β-caténine et par conséquent une activation continue de cette voie de signalisation. Cette étude a confirmé que l'expression de la β-caténine était restreinte aux cellules de la ZG quel que soit l'âge des souris étudiées. Chez ces souris, l'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine induit

une expansion de la ZG, conséquence d'une hyperplasie cellulaire, indépendamment de leur sexe et de leur âge.

La voie de signalisation Wnt/β-caténine agit sur la stabilisation et le maintien de l'identité des cellules de la ZG à deux niveaux :

- En inhibant la transdifférentiation des cellules de la ZG en cellules de la ZF. Cette conclusion vient d'études de lignage réalisées à partir de surrénales de souris $AS^{Cre/+}$::$Ctnnb1^{flox(ex3)/+}$ qui ont été croisées avec des souris rapportrices mTmG (Pignatti et al. 2020). Dans les surrénales de ces souris, le suivi du lignage cellulaire a montré un blocage de la contribution des cellules de la ZG à la formation des cellules de la ZF.
- En stimulant l'expression de la phosphodiestérase PDE2A, qui régule de façon négative l'identité de la ZF. La PDE2A inactive et hydrolyse l'AMPc, principal second messager de la voie de signalisation PKA qui est indispensable pour le maintien de la fonction de la ZF.

De façon intéressante, l'activation du SRAA induit une expansion de la ZG tout comme l'activation constitutive de la β-caténine. Cependant les mécanismes mis en jeu sont totalement différents. En effet, alors qu'en réponse à l'AngII l'expansion de la ZG est due à une augmentation de la prolifération cellulaire ; chez la souris βcat-GOF l'expansion de la ZG vient d'un blocage de la transdifférenciation des cellules de ZG en ZF (Figure 18).

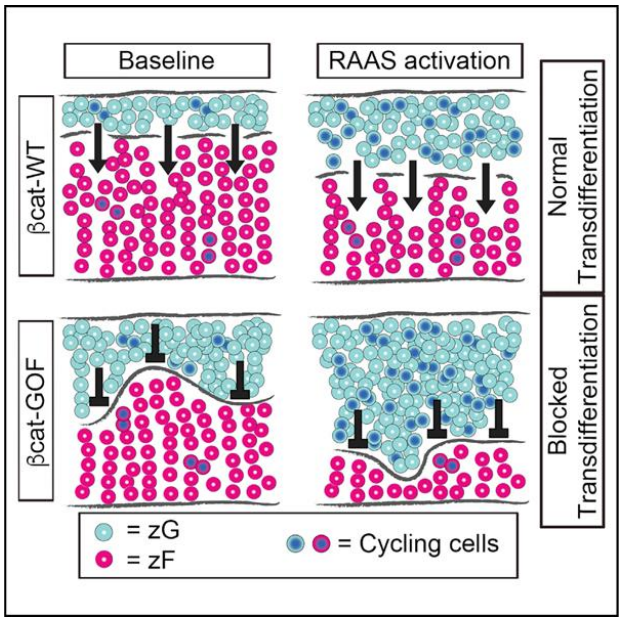


Figure 18. Rôle de la signalisation Wnt/β-caténine dans la prolifération des cellules de la ZG. La transdifférenciation est bloquée dans les surrénales de souris βcat-GOF, comme indiqué par le symbole (⊥). L'index de prolifération de la ZG (nombre total de cellules Ki67-positives normalisé par la surface de la ZG) est diminué ou inchangé dans la ZG de souris βcat-GOF par rapport aux contrôles et augmenté chez les souris βcat-GOF exposées au SRAA activé. De : Pignatti et al Beta-Catenin Causes Adrenal Hyperplasia by Blocking Zonal Transdifferentiation, DOI : https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107524

5.6.3 La voie de signalisation cAMP/PKA

La voie de signalisation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) /protéine kinase A (PKA) joue un rôle central dans la croissance, la prolifération, la différentiation, l'apoptose et le maintien des cellules de la corticosurrénale. Elle est également essentielle pour stimuler la production de glucocorticoïdes et d'androgènes par les zone fasciculée et réticulée. La PKA phosphoryle un certain nombre de cibles cytosoliques et nucléaires, notamment des facteurs de transcription de la famille CREB/ATF.

En condition physiologique, les cellules corticosurrénaliennes sont notamment sous le contrôle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui induit une cascade de signalisation via sa fixation au récepteur MC2R, un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) et dont l'expression est retrouvée dans tout le cortex de la surrénale. L'activation du MC2R, qui est couplé à la protéine $G\alpha_s$, conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc et l'activation de la PKA.

L'holoenzyme PKA sous sa forme inactive est un tétramère composé d'un dimère de deux sous-unités régulatrices (R) et de deux sous unités catalytiques (C). Lors de la liaison de deux molécules d'AMPc à chaque sous-unité R, les sous-unités C sont libérées et peuvent alors phosphoryler leurs cibles localisées dans le cytosol ainsi que dans le noyau. Dans les cellules corticosurrénales, cela conduit à une stimulation aiguë de la synthèse de glucocorticoïdes par les cellules de la ZF ainsi qu'à une induction transcriptionnelle ultérieure des enzymes stéroïdogènes et des gènes impliqués dans la réplication cellulaire (Calebiro et al. 2015). Dans une moindre mesure, l'ACTH peut également induire une biosynthèse d'aldostérone par les cellules de la ZG (Figure 19,20).

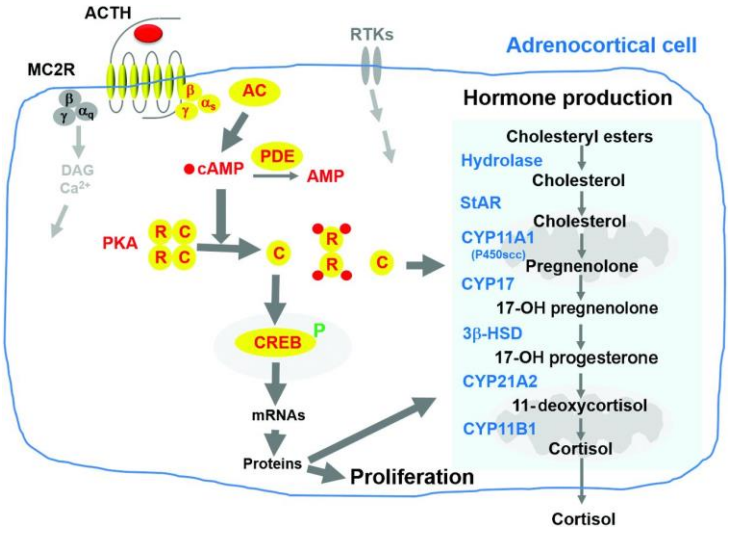


Figure 19. La signalisation cAMP/PKA dans la surrénale. La liaison de l'ACTH au MC2R induit une activation de l'AC, une augmentation de l'AMPc induisant l'activation de la PKA qui peut phosphoryler différentes cibles impliquées dans la régulation de la biosynthèse de cortisol et la prolifération cellulaire. De : Calebiro et al, cAMP signaling in cortisol producing adrenal adenoma, DOI:10.1530/EJE-15-0353

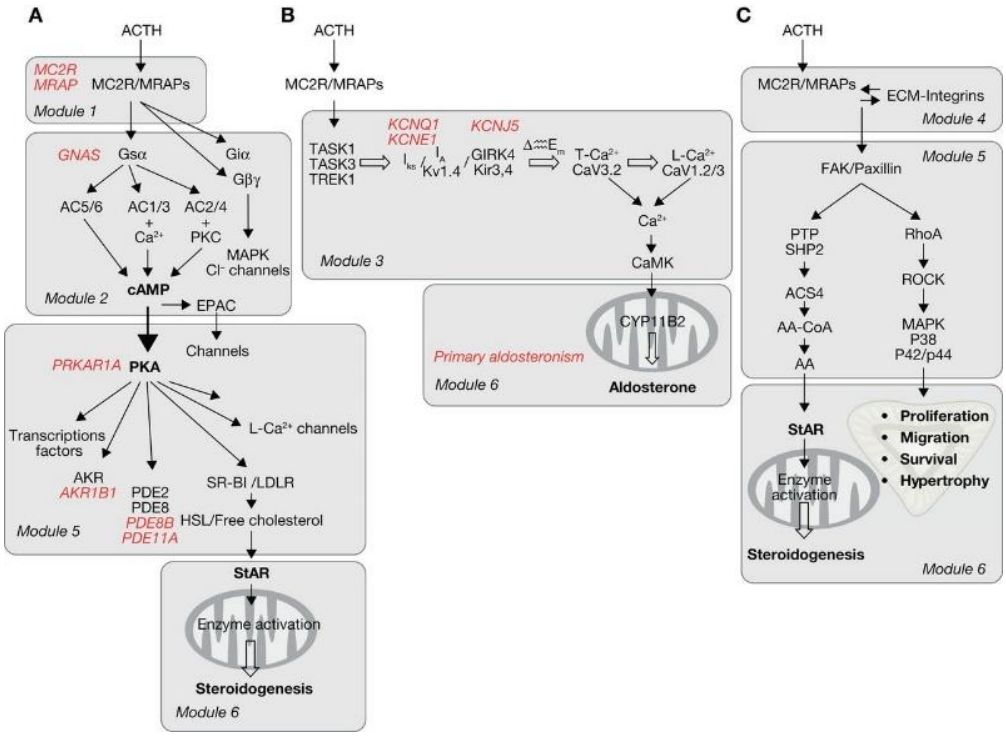


Figure 20. Illustrations des principales cascades de signalisation stimulées par l'ACTH, de la liaison à son récepteur à la fonction cellulaire dans les cellules corticosurrénales. De : Payet et al, 60 YEARS OF POMC: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH, https://doi.org/10.1530/JME-15-0257

5.7 L'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle (HTA) est un facteur de risque cardiovasculaire majeur qui touche environ 25% de la population générale dans les pays industrialisés. L'hypertension est définie comme une tension artérielle élevée égale ou supérieure à 140 mmHg de pression systolique et/ou 90 mmHg de pression diastolique. Jusqu'à 53% des patients souffrant d'HTA ne sont pas conscients de leur maladie et ne sont pas traités (Chow 2013). Dans certains cas, les patients ne présentent aucun symptôme avant que de graves complications n'aient été causés à des organes cibles tels que le cœur, les reins et le cerveau, ce qui se manifeste par des crises cardiaques, des insuffisances rénales ou des accidents vasculaires cérébraux. Il existe différents types de traitement pour ces patients hypertendus ;

cependant, la pression artérielle optimale n'est pas atteinte chez les deux tiers des patients hypertendus, malgré l'utilisation de différentes combinaisons de médicaments.

L'identification de formes secondaires d'HTA est essentielle pour une meilleure prise en charge des patients hypertendus et la prévention des complications cardiovasculaires. L'identification des causes secondaires est donc essentielle pour mettre en œuvre des traitements efficaces chez les patients atteints d'HTA. Les causes secondaires de l'hypertension comprennent un certain nombre de troubles surrénaliens, dans lesquels une production hormonale accrue et autonome augmente la pression artérielle. Il s'agit de l'hyperaldostéronisme primaire, du syndrome de Cushing et du phéochromocytome. Dans la plupart des cas, ces maladies sont curables et une intervention chirurgicale ou médicamenteuse permet de normaliser la pression artérielle. Cependant, dans de nombreux cas, ces troubles endocriniens ne sont pas diagnostiqués.

5.7.1 Régulation de la pression artérielle par le SRAA

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) est un composant essentiel de la régulation de la pression artérielle. Le SRAA agit en augmentant le volume sanguin ainsi que la résistance vasculaire systémique. Le point de départ du SRAA est la rénine, une hormone libérée par les cellules granulaires de l'appareil juxtaglomérulaire, une structure spécialisée comprenant des parties du tubule collecteur distal (TCD) et l'artériole afférente adjacente du glomérule. La rénine est libérée en réponse à une concentration accrue de sel dans le sang, à une réduction du flux sanguin rénal ou à une stimulation du système nerveux sympathique agissant sur les récepteurs β1-adrenergiques (J. A. King, Lush, and Fray 1993).

La rénine transforme l'angiotensinogène, une protéine synthétisée par le foie, en angiotensine I, qui est ensuite transformé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en angiotensine II. L'angiotensine II provoque une vasoconstriction dans la circulation systémique via le récepteur de type 1 (AT1R) et dans la microvasculature rénale, en diminuant préférentiellement le diamètre des artérioles efférentes (Joannidis and Hoste 2018). L'ECA, que l'on trouve principalement dans les poumons, est également un acteur de la dégradation de la bradykinine, qui a une action vasodilatatrice. La dégradation de la bradykinine de façon concomitante à la production d'Ang II contribue ainsi à favoriser les effets vasoconstricteurs de l'Ang II (Witherow et al. 2001). L'angiotensine II, en se liant à son récepteur AT1R exprimé par les cellules de la ZG du cortex surrénalien stimule la biosynthèse d'aldostérone (Pearce, Bhargava, and Cole 2003). L'aldostérone agit sur les cellules

principales du tubule contourné distal et du canal collecteur du néphron, augmentant la réabsorption de Na^+ et l'excrétion de K^+. La réabsorption du sel médiée par l'aldostérone est également liée à la sécrétion de H^+. Cette augmentation de la réabsorption sodée augmente la volémie et la pression artérielle. L'angiotensine II est également capable d'augmenter le volume plasmatique par la stimulation de la soif par l'augmentation de la biosynthèse de l'hormone antidiurétique (ADH), un autre régulateur de la pression artérielle (Witherow et al. 2001).

La régulation de la pression artérielle par l'aldostérone n'est pas seulement liée au rôle de l'hormone au niveau du rein, mais aussi à ses effets sur le système cardiovasculaire. L'utilisation d'antagoniste du récepteur minéralocorticoïde, qui bloque les effets de l'aldostérone, font désormais partie des options thérapeutiques.

5.7.2 Composante génétique de la pression artérielle

Il existe une composante génétique de la pression artérielle. Ainsi des associations ont été montré entre l'HTA et plus de 30 gènes, avec des variants rares entraînant des formes monogéniques d'hypertension ou d'hypotension et plus de 1 477 polymorphismes mononucléotidiques (SNP) communs associés au phénotype de la pression artérielle (Lip and Padmanabhan 2020).

La pression artérielle est un trait polygénique multifactoriel et, par extension, l'hypertension (qui est une dichotomisation du trait quantitatif de la pression artérielle) est également un trait complexe multifactoriel avec des mécanismes moléculaires complexes influençant le phénotype final.

Les SNP identifiés dans les études d'association à l'échelle du génome (GWAS) comme étant associés au phénotype de la pression artérielle n'expliquent qu'environ 27 % de l'héritabilité de la pression artérielle, estimée à 30-50 %, et l'effet de chaque SNP sur le phénotype de la pression artérielle est faible. La majorité des SNP identifiés dans le cadre d'études GWAS présentent des associations pléiotropiques, et l'élucidation de ces signaux et des voies biologiques sous-jacentes offre des possibilités potentielles pour la réadaptation des médicaments.

5.8 L'hyperaldostéronisme primaire

L'hyperaldostéronisme primaire (HAP) est la forme la plus fréquente d'HTA secondaire, avec une prévalence estimée de 5 % des patients hypertendus, pouvant atteindre jusque 10 à 20 % chez les patients référés dans des centres spécialisés (Hannemann and Wallaschofski 2012; Monticone et al. 2017) et 20 % chez les patients souffrant d'HTA résistante (Calhoun et al. 2002; Douma et al. 2008).

L’HAP est dû à une production excessive et autonome d'aldostérone par le cortex surrénalien. L’HAP résulte dans la majorité des cas d'un adénome produisant de l’aldostérone (APA) unilatéral ou d'une hyperplasie bilatérale des surrénales (BAH, également appelée hyperaldostéronisme idiopathique). L'HAP se caractérise par une augmentation de la pression artérielle, une augmentation du rapport aldostérone/rénine, qui est la principale caractéristique utilisée pour le dépistage, souvent une hypokaliémie et une alcalose métabolique et ainsi qu’un risque accru de complications cardiovasculaires. Ainsi, la prévalence de coronaropathie, d'infarctus du myocarde, d'insuffisance cardiaque, d'hypertrophie ventriculaire gauche et de fibrillation auriculaire est plus élevée chez les patients avec un HAP que chez ceux avec une HTA essentielle de niveau comparable, même après ajustement pour la durée de l'hypertension, l’âge et le sexe (Gian Paolo Rossi et al. 2006) (Savard et al. 2013). Le diagnostic est posé en présence de taux de rénine supprimés et d'un rapport aldostérone/rénine accru, et est confirmé par l'un des différents tests de suppression. L'imagerie surrénalienne et le cathétérisme des veines surrénales permettent de distinguer les formes unilatérales et bilatérales et d'instaurer un traitement optimal, soit une surrénalectomie pour les APA, soit un traitement par antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes pour les formes bilatérales (Funder et al. 2016). Bien que des recommandations pour le diagnostic et le traitement de l'HAP aient été publiées récemment et soient largement utilisées dans les centres de référence (Funder et al. 2016; 2008), il est urgent d'apporter des améliorations pour un meilleur diagnostic, une meilleure identification des sous-types et un meilleur traitement des patients non opérables afin de permettre une meilleure prise en charge et une meilleure prévention des complications cardiovasculaires.

Au cours des dix dernières années, des progrès importants ont été réalisés dans l'élucidation des défauts génétiques qui sous-tendent les formes familiales et sporadiques de l'HAP, fournissant un modèle pathogénique à son développement. En particulier, des mutations somatiques et germinales ont été identifiées dans les gènes codant pour des canaux ioniques (*KCNJ5* (Choi et al. 2011), *CACNA1D* (Azizan et al. 2013), *CACNA1H* (Scholl, Stölting, et al. 2015), *CLCN2* (Fabio L. Fernandes-Rosa et al. 2018)) et des ATPases (*ATP1A1*, *ATP2B3*) (Beuschlein et al. 2013) dans jusqu'à 96% des APA en fonction des études (Nanba et al. 2018; 2019; 2020; De Sousa et al. 2020; Ono et al. 2020). Ces mutations entraînent une dépolarisation de la membrane cellulaire (*KCNJ5*, *ATP1A1*, *CLCN2*) ou une augmentation du calcium intracellulaire (*ATP2B3*, *CACNA1D*, *CACNA1H*), ce qui conduit à l'activation de la signalisation calcique qui est le principal déclencheur de la biosynthèse d'aldostérone. En outre, des mutations dans le gène *CTNNB1* codant pour la β-caténine, un régulateur clé du développement et de la fonction du cortex surrénalien, ont été identifiées dans environ 5% des APA (Teo et al. 2015; Scholl, Healy, et al. 2015), soit seules, soit en association avec des mutations de *GNAQ/GNA11* chez des patients présentant un HAP à la puberté, pendant la grossesse ou à la ménopause (Zhou et al.

2021). Enfin des mutations dans le gène *PRKACA* (codant pour la sous-unité catalytique α de la protéine kinase activée par l'AMP) ont été décrites chez deux patients (Rhayem et al. 2016).

Les mutations germinales identifiées dans des formes familiales d'HAP permettent de distinguer quatre formes différentes d'hyperaldostéronisme familial (FH), en fonction de l'anomalie génétique sous-jacente (Fabio L. Fernandes-Rosa et al. 2018; Scholl et al. 2018; Zennaro 2019).

Cependant, on ne sait toujours pas si ces mutations, en plus de favoriser la biosynthèse d'aldostérone, augmentent également la prolifération cellulaire et induisent la formation de nodules et différentes hypothèses ont émergé ces dernières années. Différents mécanismes pathogéniques ont été proposés, soit l'implication d'un mécanisme à deux hits responsables de la prolifération des cellules corticosurrénaliennes et de la sécrétion hormonale soit le développement d'APA à partir d'amas de cellules productrices d'aldostérone (APCC) du cortex surrénalien. Ces mécanismes seront discutés plus loin dans le manuscrit. Enfin, il a été postulé que les modifications de l'apport vasculaire au cortex surrénalien, dues à des phénomènes d'athérosclérose ou d'hypertension artérielle, peuvent influencer la morphologie du cortex surrénalien, entraînant une croissance compensatoire et la formation de nodules en réponse à l'hypoxie locale ("Sasano H., Suzuki T., Moriya T. (2004) Adrenal Cortex. In: Lloyd R.V. (Eds) Endocrine Pathology. Humana Press, Totowa," n.d.). Cela pourrait éventuellement conduire au développement de l'APA dans des cas extrêmes.

5.8.1 Les formes familiales de l'HAP

Bien que la majorité des cas soient sporadiques, l'HAP peut être transmis comme un trait mendélien dans des formes familiales de la maladie. Le premier défaut génétique associé à l'HAP a été décrit il y a près de 30 ans. Un gène chimérique, dans lequel les régions régulatrices du gène *CYP11B1* sont juxtaposées à la séquence codante du gène *CYP11B2*, a été identifié. Les formes familiales de l'HAP représentent 1 à 5 % des cas et sont transmises comme un trait autosomique dominant. Quatre formes différentes ont été décrites, en fonction du défaut génétique sous-jacent et sont présentées dans le Tableau 1 et la Figure 21 (Fabio L. Fernandes-Rosa, Boulkroun, and Zennaro 2020).

Tableau 1. Caractéristiques des formes familiales d'hyperaldostéronisme primaire. De :Fabio L.Fernandes-Rosa et al, Genetic and Genomic Mechanisms of Primary Aldosteronism, https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.005

Disease	Age of onset	Specific features	Gene	Transmission	Treatment
FH-I	Variable Often before 20 yr	Cerebrovascular events at young age (<30 yr)	Chimeric *CYP11B1/B2*	Autosomal dominant	Glucocorticoids, MR antagonist
FH-II	Variable Young onset in patients with *CLCN2* mutations	None	*CLCN2*	Autosomal dominant	MR antagonist
FH-III	Before 20 yr Variable in mild forms	Massive bilateral adrenal hyperplasia in severe cases	*KCNJ5*	Autosomal dominant	MR antagonist Bilateral adrenalectomy in severe cases
FH-IV	Variable Most frequent before 20 yr	Developmental disorder in some cases	*CACNA1H*	Autosomal dominant	MR antagonist
Primary aldosteronism, seizures and neurologic abnormalities (PASNA)	Childhood	Seizures and neurological abnormalities	*CACNA1D*	? (*de novo*)	MR antagonist Calcium channel blocker

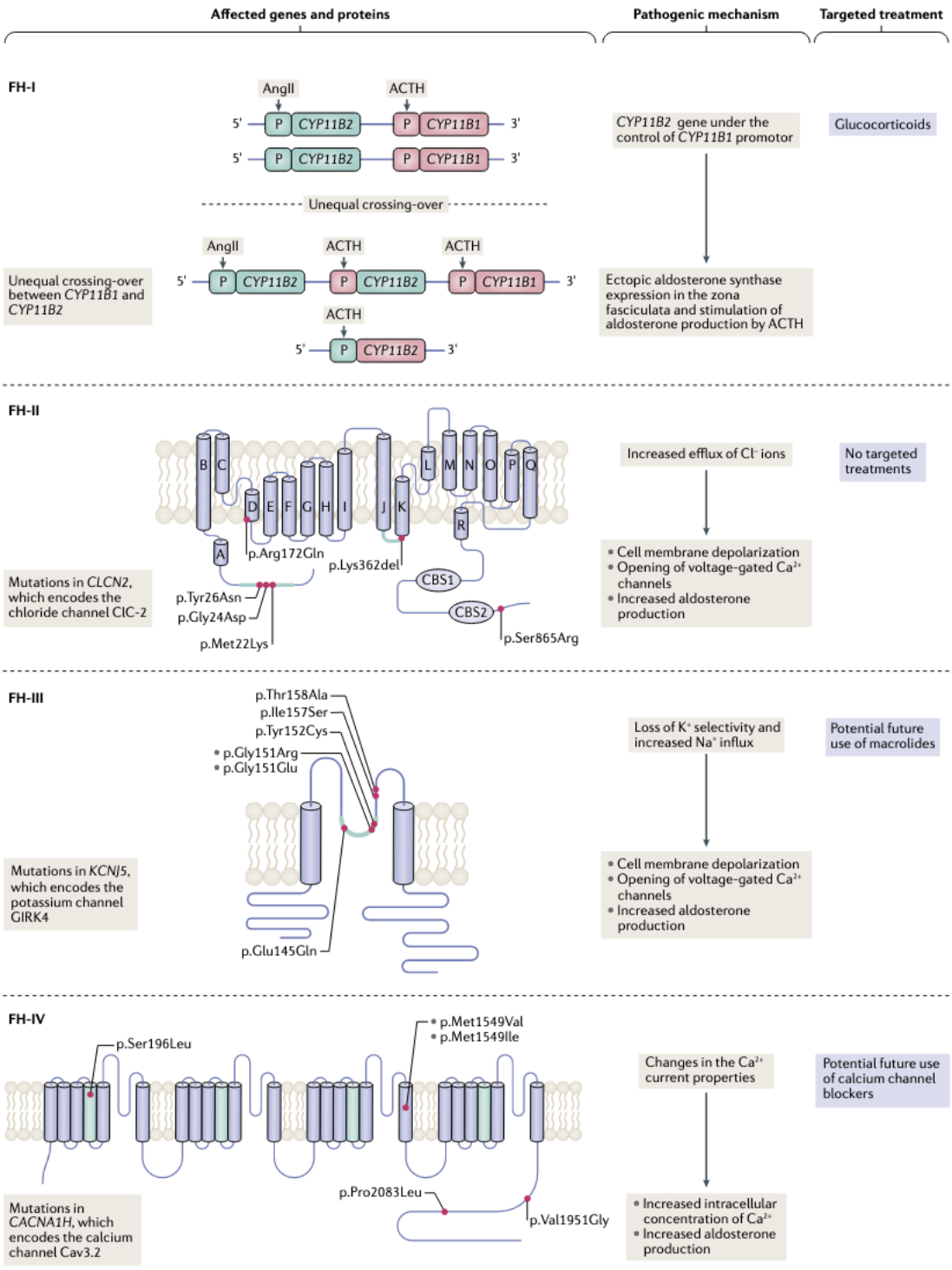


Figure 21 Mécanismes génétiques et pathogéniques de l'hyperaldostéronisme familial et traitement ciblé De : Fernandes-Rosa et al, Nat Rev Endocrinol, 2020.

L'hyperaldostéronisme familial de type I, FH-I

Le FH-I ou aldostéronisme remédiable par les glucocorticoïdes (GRA) est une maladie autosomique dominante dont la prévalence est de ≈1% chez les patients adultes avec HAP (Mulatero et al. 2011; Stowasser and Gordon 2001), mais peut atteindreà 3% dans les cohortes pédiatriques (Pallauf et al. 2012). Il est caractérisé par une hypertension sévère chez les enfants ou chez les jeunes adultes (apparition précoce) avec une hérédité autosomique dominante et souvent associée à une rénine plasmatique supprimée, à une hypokaliémie, à une alcalose métabolique et à des taux sériques élevés de stéroïdes hybrides 18-hydroxycortisol et 18-oxocortisol ; la suppression de l'aldostérone par des niveaux élevés de l'hormone de croissance et de dexaméthasone est efficace pour réduire les taux plasmatiques d'aldostérone (Sutherland, Ruse, and Laidlaw 1966). Ces caractéristiques sont une conséquence du défaut génétique sous-jacent, qui consiste en la formation d'un gène chimérique entre les régions régulatrices du gène *CYP11B1* et les régions codantes du gène *CYP11B2* en raison d'un croisement inégal pendant la méiose. La formation du gène chimérique entraîne une expression ectopique de CYP11B2 dans l'ensemble du cortex surrénalien, l'aldostérone est alors produite dans la ZF avec une régulation inappropriée de la biosynthèse d'aldostérone par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) (Figure 21) (Stowasser and Gordon 2001; Zennaro, Boulkroun, and Fernandes-Rosa 2020). Cependant, les conséquences cardiovasculaires d'un excès d'aldostérone peuvent se manifester même chez de jeunes patients normotendus (Stowasser et al. 2005) et les patients atteints de FH-I présentent un risque cardiovasculaire accru, avec un nombre plus élevé d'événements cérébrovasculaires à un jeune âge (Litchfield et al. 1998).

L'hyperaldostéronisme familial de type II, FH-II

Jusque récemment, le FH-II était considéré être la forme la plus courante de FH, avec une prévalence de 1,2 à 6,0 % chez les adultes atteints d'HAP (Mulatero et al. 2011; Stowasser and Gordon 2001; Pallauf et al. 2012). Le FH-II regroupait les formes familiales d'HAP non remédiable par les glucocorticoïdes, transmise sur un mode autosomique dominant.

Récemment et grâce à l'utilisation du séquençage d'exome entier, un nouveau gène associé au FH-II a été découvert. Deux groupes ont en effet identifié plusieurs mutations gain de fonction dans le gène *CLCN2* codant pour le canal chlorure CLC-2 chez des patients atteints de FH-II et d'HAP précoce et ont décrit pour la première fois l'implication d'un canal chlorure dans la régulation de la production d'aldostérone (Figure 21) (Fabio L. Fernandes-Rosa et al. 2018; Scholl et al. 2018). Dans la première de ces études, une mutation hétérozygote de novo p.Gly24Asp dans le gène *CLCN2* a été identifiée chez

une patiente diagnostiquée à l'âge de 9 ans avec une hypertension sévère, une aldostéronémie élevée associée à une hypokaliémie profonde (Fernandes-Rosa et al. 2018). Cette mutation gain de fonction affecte une région hautement conservée du canal chlorure ClC-2, conduisant à une activation constitutive du canal. L'expression du canal ClC-2 mutée dans des cellules corticosurrénaliennes entraîne une augmentation des courants chlorure et une dépolarisation de la membrane cellulaire de la ZG, induisant l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage et stimule la production autonome d'aldostérone. Ce travail montre ainsi pour la première fois l'implication d'un canal anionique dans la régulation de la biosynthèse de l'aldostérone, et dans le développement de l'HAP (Fabio L. Fernandes-Rosa et al. 2018).

Dans la seconde étude, le séquençage de l'exome entier de trois membres d'une grande famille australienne atteinte de FH-II précédemment décrite par Stowasser et al. (Stowasser et al. 2003) a permis d'identifier une mutation germinale dans le gène *CLCN2*, p.Arg172Gln, chez les membres affectés de la famille. La même mutation a été identifiée dans trois autres cas d'HAP à début précoce, l'un dans un contexte familial, l'autre survenant de novo. En outre, les auteurs ont identifié 4 autres variants germinaux de *CLCN2*, p.Met22Lys, p.Tyr26Asn, p.Lys362del et p.Ser865Arg chez 4 patients non apparentés présentant un HAP (Scholl et al. 2018). L'immunohistochimie a confirmé l'expression de ClC-2 dans la ZG surrénalienne humaine. Les canaux mutés présentent un gain de fonction, avec des probabilités d'ouverture plus élevées au potentiel de repos de la ZG.

Ces résultats indiquent que le gène *CLCN2* devrait être inclus dans le panel de gènes qui sont dépistés chez les patients qui développent un hyperaldostéronisme primaire de façon précoce et dans les familles avec un diagnostic de FH-II. Les mutations peuvent être situées dans différents domaines du canal CLC-2 et donc affecter la fonction du canal à des degrés différents, ce qui explique l'hétérogénéité phénotypique et la présence de cas relativement bénins.

L'hyperaldostéronisme familial de type III, FH-III

Le FH-III est une forme familiale non remédiable par les glucocorticoïdes, caractérisé par une hypertension sévère à début précoce, un hyperaldostéronisme, une hypokaliémie profonde et des niveaux élevés de stéroïdes hybrides 18-oxocortisol et 18-hydroxycortisol (Geller et al. 2008). Afin de contrôler la pression artérielle, certains patients doivent subir une surrénalectomie bilatérale, indiquant la présence d'une hyperplasie bilatérale massive du cortex surrénalien. Des mutations germinales récurrentes dans le gène *KCNJ5* (codant pour le canal potassique GIRK4) ont été identifiées dans le FH-III (Figure 21) (Choi et al. 2011). *KCNJ5* code pour le canal potassique 4 de rectification vers l'intérieur activé par la protéine G (GIRK4), qui est composé de deux domaines transmembranaires (M1

et M2), d'une région formant un pore (H5) et des extrémités N et C cytoplasmiques qui participent à la structure du pore. Les mutations sont situées dans un domaine hautement conservé à l'intérieur ou à proximité du filtre de sélectivité du canal. Elles induisent un gain de fonction, avec une perte de sélectivité du potassium en faveur d'une augmentation de l'influx de sodium non spécifique dans la cellule. Il en résulte une dépolarisation de la membrane cellulaire, une augmentation des concentrations de calcium intracellulaire, une activation de la signalisation calcique et une stimulation de la biosynthèse autonome d'aldostérone (Choi et al. 2011). Différentes mutations de *KCNJ5* ont été décrites dans la littérature et ne sont pas toutes associées à une forme sévère de FH-III (Mulatero et al. 2013). En effet, des mutations de KCNJ5 ont également été identifiées chez des patients diagnostiqués avec un HAP plus modeste dans un contexte de FH-II, sans hyperplasie bilatérale des surrénales à l'imagerie et avec une pression artérielle contrôlée par des médicaments classiques. Le diagnostic génétique a permis de reclasser ces patients dans des formes légères de FH-III.

L'hyperaldostéronisme familial de type IV, FH-IV

Le FH-IV est une forme de FH non remédiable par les glucocorticoïdes, qui a été attribuée à des mutations germinales du gène *CACNA1H*. L'analyse familiale a montré que malgré la transmission autosomique dominante de la mutation, des différences pouvaient être observées au sein des membres de la famille sur le plan clinique, indiquant une pénétrance incomplète de la maladie (Figure 21) (Scholl, Healy, et al. 2015).

CACNA1H code pour la sous-unité α1 du canal calcique de type T voltage-dépendant Cav3.2. La structure de cette sous-unité consiste en 4 domaines homologues (nommés de I à IV) où chaque domaine contient 6 hélices transmembranaires (S1-S6). Une mutation récurrente p.Met1549Val dans CACNA1H a été identifiée pour la première fois chez 5 patients souffrant d'hypertension due à un HAP de façon précoce et chez leurs proches. La mutation affecte les propriétés électrophysiologiques du canal, induisant spécifiquement un déplacement de la sensibilité du canal vers un courant plus négatif et une modification de ses propriétés d'inactivation, qui déclenche une ouverture du canal à des potentiels membranaires moins dépolarisés, permettant l'activation de la signalisation calcique en l'absence de stimulation. Scholl et al ont démontré dans leur étude que l'expression du canal Cav3.2 portant la mutation p.Met1549Val dans des cellules corticosurrénalienne induisait une augmentation plus importante de la biosynthèse d'aldostérone et de l'expression de CYP11B2 par rapport aux cellules transfectées avec le canal Cav3.2 de type sauvage.

Dans une étude similaire, Daniil et al ont identifié quatre mutations germinales dans le gène *CACNA1H* chez des patients atteints d'HAP avec différentes présentations phénotypiques. Deux des variants (p.Val1951Glu et p.Pro2083Leu) identifiés dans cette étude sont situés dans l'extrémité C-terminale cytoplasmique du canal. Le variant p.Ser196Leu est située dans le segment S4 du domaine I du canal, la mutation p.Met1549Ile est située quant à elle dans le segment S6 du domaine III. La mutation p.Met1549Ile, affectant le même acide aminé que celle décrite par Scholl et al chez les patients atteints de FH-IV, a été identifiée chez un patient présentant un HAP à début précoce et un trouble du développement complexe. Les mutations p.Ser196Leu et p.Pro2083Leu du canal Cav3.2 ont été identifiées chez deux patients atteints de FH-II, et la mutation p.Val1951Glu chez un patient avec un APA. L'analyse électrophysiologique de ces différents mutants a révélé des changements significatifs dans les propriétés des courants calciques pour tous les mutants, suggérant un phénotype de gain de fonction. De plus, l'expression de différents mutant du canal Cav3.2 dans la lignée cellulaire corticosurrénale H295R-S2 entraine une augmentation de la production d'aldostérone et de l'expression des enzymes stéroïdogènes après une stimulation au potassium (Daniil et al. 2016).

5.8.2 Les mutations somatiques dans l'APA

De nombreuses mutations somatiques récurrentes ont été identifiées dans l'APA. Celles-ci touchent des gènes codant pour des canaux ioniques (*KCNJ5* (Choi et al. 2011) et *CACNA1D* (Scholl et al. 2013)) dont certains sont également impliqués dans les formes héréditaires. Par ailleurs, des mutations récurrentes ont été identifiées dans les gènes codant pour des ATPases (*ATP1A1* (Beuschlein et al. 2013; Azizan et al. 2013) et *ATP2B3* (Beuschlein et al. 2013)) qui régulent l'homéostasie ionique intracellulaire et le potentiel membranaire (Figure 22).

KCNJ5 code pour un canal K+ à rectification vers l'intérieur (GIRK4). Dans la surrénale son expression est restreinte essentiellement aux cellules de la ZG. Ces canaux potassiques induisent de grands courants entrants au niveau de la membrane cellulaire. Les APA avec des mutations *KCNJ5* sont caractérisés par une augmentation de la conductance du sodium (Na^+) et une dépolarisation des cellules, ce qui, dans les cellules glomérulées surrénales, entraîne une entrée de calcium ($Ca2^+$), signal de stimulation de la production d'aldostérone (Choi et al. 2011). De Sousa et al a montré que les adénomes porteurs de mutations *KCNJ5* présentaient davantage de cellules claires et de cellules exprimant CYP11B1, et moins de cellules exprimant CYP11B2, par rapport aux autres groupes de mutations. Le 18-hydroxycortisol et le 18-oxocortisol étaient plus élevés chez les patients porteurs de mutations *KCNJ5*. Ces mutations sont associées au sexe féminin et à des patients plus jeunes (De Sousa et al. 2020; Fabio Luiz Fernandes-Rosa et al. 2014)

Cav 1.3 (canal calcique, voltage-dépendant, type L, sous-unité alpha-1d) est un canal calcique impliqué dans la physiologie des cellules de la ZG et codé par le gène *CACNA1D*. Cav 1.3 est un canal calcique de type L composé de quatre domaines répétés (I à IV), chacun de ces domaines étant constitué de six segments transmembranaires (I à IV). Plusieurs mutations somatiques différentes de *CACNA1D* ont été identifiées dans l'APA. Il s'agit de mutations gain de fonction, qui entraînent l'activation du canal à un potentiel de membrane cellulaire moins dépolarisé et retardent l'inactivation du canal, ce qui entraîne une augmentation de la signalisation calcique dans la cellule et l'induction de la biosynthèse de l'aldostérone. Les résidus modifiés se trouvent dans les segments S6 qui bordent le pore du canal (Azizan et al. 2013).

La sous unité α1 de la Na^+/K^+-ATPase, codée par le gène *ATP1A1*, et la pompe calcique membranaire PMCA3, codée par le gène *ATP2B3*, sont des membres de la famille des ATPases de type P et sont composées de dix domaines transmembranaires (M1 - M10) avec des extrémités N- et C-terminales intracellulaires. Les mutations du gène *ATP1A1* affectent les acides aminés des hélices transmembranaires M1, M4 et M9. Elles entraînent une perte d'activité de la pompe et une réduction de son affinité pour le potassium ainsi qu'une fuite vers l'intérieur du sodium, induisant une dépolarisation membranaire (Figure 22) (Beuschlein et al. 2013). De plus, les pompes mutantes peuvent induire une fuite de protons, conduisant à une acidification intracellulaire qui pourrait contribuer à la production d'aldostérone (Figure 22). En effet, l'expression de la sous-unité α1 de la Na^+/K^+ ATPase portant les mutations L104R, V332G, G99R dans des cellules corticosurrénaliennes NCI-H295R n'induit pas d'augmentation des concentrations intracellulaires de Ca^{2+}, mais est responsable d'une acidification intracellulaire, conduisant à une augmentation de la production d'aldostérone (Stindl et al. 2015).

Dans des conditions physiologiques, la pompe PMCA3 extrude un Ca^{2+} cytosolique en échange de deux H^+. Les mutations de PMCA3 se produisent dans le domaine transmembranaire M4 et induisent la suppression d'un tronçon d'acides aminés entre les leucines 425 et 433 (Fabio Luiz Fernandes-Rosa et al. 2014; Beuschlein et al. 2013). Les cellules exprimant un mutant de la pompe PMCA3 ont une capacité réduite à permettre l'extrusion du Ca^{2+}, suggérant que les mutations qui affecte cette pompe conduisent à une perte de fonction (Figure 22). De plus, elles induisent un influx accru de Ca^{2+} probablement dû à l'ouverture de canaux Ca^{2+} activés par la dépolarisation ou à une fuite de Ca^{2+} par la pompe mutée. Toutes ces mutations induisent une augmentation des concentrations intracellulaires en calcium, suivie d'une activation de la signalisation calcique et donc une augmentation de la biosynthèse d'aldostérone.

Une étude portant sur 474 sujets présentant un APA, réalisée au sein du Réseau européen pour l'étude des tumeurs surrénaliennes (ENS@T), a permis de trouver des mutations dans 54,2% des APA. Parmi les tumeurs mutées 38% d'entre elles portaient des mutations affectant le gène *KCNJ5*, 9,3% *CACNA1D*, 5,3% ATP1A1 et 1,7% ATP2B3 (Fabio Luiz Fernandes-Rosa et al. 2014). Les patients présentant des mutations du gène *KCNJ5* étaient majoritairement des femmes et des patients plus jeunes, tandis que les APA présentant des mutations du gène *CACNA1D* étaient plus petites que les APA portant d'autre type de mutations. Une méta-analyse récente portant sur 1636 patients issus de 13 études a montré une prévalence des mutations de *KCNJ5* de 43%, avec des fréquences beaucoup plus élevées (jusqu'à 77%) dans les populations d'Asie de l'Est par rapport aux études réalisées sur les populations européennes. Les APA porteurs de mutations de *KCNJ5* étaient associés à des tumeurs plus grandes et à une concentration plasmatique d'aldostérone plus élevée par rapport aux APA sans mutation. Les APA porteurs de mutations *KCNJ5* sont essentiellement composés de cellules de type ZF. D'autres mutations ont été associées principalement au sexe masculin, les mutations du gène *ATP1A1* et à des tumeurs plus petites, les mutations du gène *CACNA1D* (Lenzini et al. 2015).

Plus récemment, l'utilisation de séquençage de nouvelle génération (NGS) réalisées à partir d'ADN extrait de tissu d'APA inclus en paraffine et dont il a été vérifié qu'il y avait bien une expression de CYP11B2 par immunohistochimie a permis de revoir à la hausse la prévalence de ces mutations dans l'APA. Ainsi dans une étude plus récente, Nanba et al ont appliqué cette stratégie sur 75 échantillons de surrénales provenant de patients américains blancs. Cette stratégie a permis d'identifier des mutations somatiques dans 88 % des APA (Nanba et al., 2018). Là encore, les mutations de KCNJ5 étaient les plus fréquentes (43 %), suivies des mutations de *CACNA1D* (21 %), d'*ATP1A1* (17 %), d'*ATP2B3* (4 %) et de *CTNNB1* (3 %). Des résultats similaires ont été obtenus en analysant des adénomes corticosurrénaliens provenant de 79 patients noirs atteints d'APA. Des mutations somatiques dans les gènes responsables de la production autonome d'aldostérone ont été trouvées dans 93.75 % des APA (De Sousa et al. 2020). Il est intéressant de noter que les mutations de *CACNA1D* ont une fréquence de 27 %, celle des mutations *KCNJ5* est de 44 %, celle des mutations *ATP1A1* est de 13 % et celle des mutation *ATP2B3* est de 10 % (De Sousa et al. 2020).

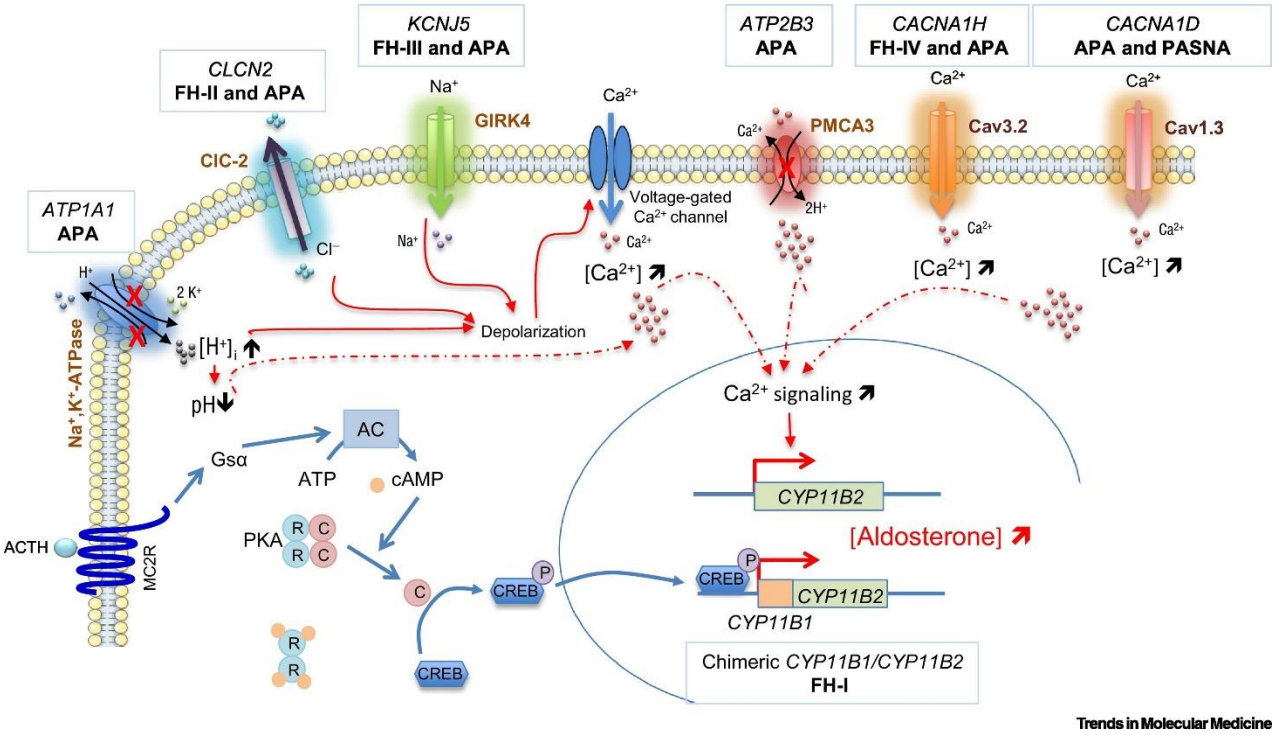


Figure 22. Les mécanismes cellulaires de la production de l'aldostérone dans la surrénale normale et avec APA. Les cellules de la zone glomérulée non stimulées sont hyperpolarisées par l'expression d'un grand nombre de canaux potassiques. Après la stimulation de la biosynthèse de l'aldostérone, la dépolarisation de la membrane cellulaire induit l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et active la signalisation calcique ; le principal déclencheur de la biosynthèse de l'aldostérone. Les mutations de différents canaux et pompes dans l'hyperaldostéronisme familiale (FH) et les adénomes produisant de l'aldostérone (APA) augmentent les concentrations de calcium intracellulaire, stimulant ensuite la transcription de CYP11B2 et augmentant la biosynthèse d'aldostérone. Les mutations du canal potassique GIRK4 (vert) entraînent une entrée de sodium au lieu d'une extrusion de potassium ; les mutations du canal chlorure ClC-2 (bleu clair) augmentent l'efflux de chlorure ; les mutations de la sous-unité α1 de la Na+, K+-ATPase (bleu foncé) entraînent une perte de l'activité de la pompe, mais aussi une entrée de protons dans les cellules. Globalement, ces mutations conduisent à une dépolarisation de la membrane cellulaire et à l'ouverture des canaux calciques dépendant du voltage. Les mutations de la sous-unité α1 du canal Ca2+ de type l Cav1.3 (rouge clair), et de la sous-unité α1 du canal Ca^{2+} de type T Cav3.2 (orange), entraînent des modifications de leurs propriétés fonctionnelles, permettant notamment l'entrée de calcium à un potentiel membranaire plus faible, tandis que les mutations de l'ATPase 3 de transport du calcium de la membrane plasmique (PMCA3) (rouge foncé) sont responsables de la perte de l'activité de la pompe et de l'accumulation de calcium dans les cellules. Dans le cas du FH-I, un gène chimérique dans lequel la région codante de CYP11B2 est fusionnée à la région régulatrice de CYP11B1 entraîne l'expression ectopique de CYP11B2 dans tout le cortex surrénalien et le contrôle de la biosynthèse de l'aldostérone principalement par l'ACTH, par la liaison au récepteur de la mélanocortine 2 (MC2R) et l'activation de voie de la signalisation PKA. De: Fabio L.Fernandes-Rosa et al, Genetic and Genomic Mechanisms of Primary Aldosteronism, https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.005

D'autres mutations moins fréquentes qui jouent un rôle important dans l'APA ont été identifiées dans les gènes *CTNNB1* et *PRKACA*.

Le gène *CTNNB1* code pour la β-caténine. Comme nous l'avons vu précédemment cette protéine est un élément central de la voie de signalisation Wnt/β-caténine, qui a un rôle essentiel dans le développement du cortex surrénalien, dans la différenciation de la ZG et dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (El Wakil and Lalli 2011). Ces mutations ont été trouvées dans 2 à 5% des APA et sont plus fréquentes chez les femmes (Scholl, Healy, et al. 2015; Teo et al. 2015). Les mutations sont

localisées spécifiquement dans l'exon 3, qui code pour une région importante pour la régulation de la stabilité de la protéine. Récemment, des mutations gain de fonction du gène de la protéine G *GNA11*, ou de son proche homologue *GNAQ*, ont été identifiées dans les APA porteurs de mutations *CTNNB1*. Dans la ZG, les protéines $G_{q/11}$ sont notamment impliquées dans la réponse des cellules à l'Ang II, induisant une activation de la signalisation calcique et de la biosynthèse d'aldostérone. Des études in vitro de transfections de cellules corticosurrénaliennes ont mis en évidence des effets additifs des mutations *GNA11* et *CTNNB1* sur la sécrétion d'aldostérone. Une augmentation de l'expression d'un certain nombre de gènes dans les APA avec la double mutation notamment le gène *LHCGR* qui code pour le récepteur de l'hormone lutéinisante (LH) et de l'hormone gonadotrophine chorionique (HCG) a également été montré. La surexpression de ce récepteur, dans ces tumeurs porteuses d'une double mutation *CTNNB1* et *GNAQ/11* pourrait expliquer pourquoi chez ces patients l'hyperaldostéronisme se déclenche à la puberté, lors de la grossesse ou de la ménopause (Zhou et al. 2021) (Figure 23).

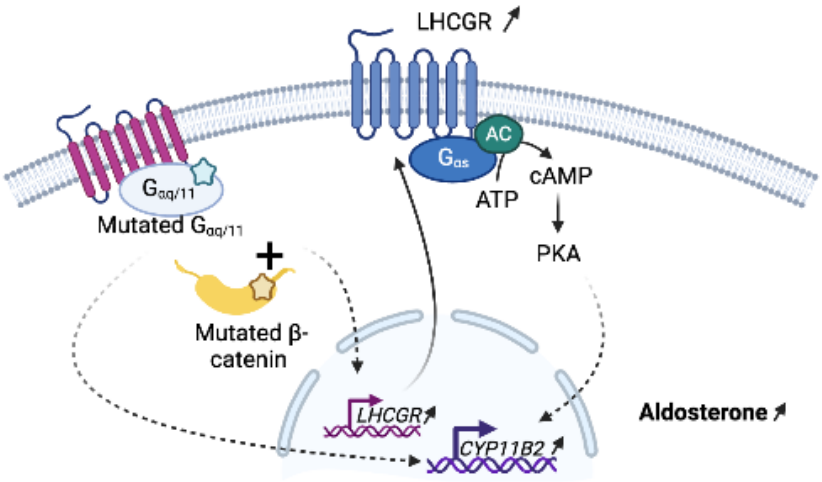


Figure 23. Mutations GNAQ/GNA11 dans les APA porteurs de mutations CTNNB1.

Dans une bien moindre mesure, des mutations somatiques du gène *PRKACA*, qui code pour la sous-unité catalytique α de la PKA, ont été décrites dans l'APA (Rhayem et al. 2016). Une étude réalisée sur une cohorte de 122 patients a montré une prévalence de 1,6% de cette mutation. L'une des mutations décrites dans cette étude était nouvelle (p.His88As) (Rhayem et al. 2016), tandis que l'autre mutation, p.Leu206Arg, avait été précédemment décrite comme une mutation somatique récurrente chez des patients atteints d'adénome produisant du cortisol et de syndrome de Cushing. Jusqu'à présent, les mutations des gènes *PRKACA* et de *CTNNB1* étaient principalement associées à des adénomes producteurs de cortisol et/ou à des cancers corticosurrénaliens. Par conséquent, les mécanismes expliquant comment les mêmes mutations entraînent deux phénotypes hormonaux différents restent à établir.

5.8.3 Les APCC et leur rôle dans la biosynthèse de l'aldostérone et le développement de l'HAP

Malgré les avancés de ces dernières années concernant les bases génétiques de l'HAP, les mécanismes par lesquels ces mutations somatiques induisent une prolifération cellulaire et la formation d'APA restent à établir. Il a été montré que les surrénales avec APA présentaient un remodelage cortical important avec de nombreux nodules secondaires et une diminution de la vascularisation (Boulkroun et al. 2010) et que différentes mutations somatiques étaient retrouvées dans des surrénales multinodulaires avec APA (Fabio Luiz Fernandes-Rosa et al. 2015). Ces résultats suggèrent un processus à deux « hits » impliquant à la fois une prolifération cellulaire anormale, via l'activation de voies de signalisation particulières, et l'apparition de mutations somatiques conduisant à une activation de la voie calcique responsable de la production d'aldostérone (Figure 24). Cette hypothèse d'un modèle à deux hits a été renforcée par l'étude du cas d'un patient jeune atteint d'HAP présentant une sécrétion latéralisée d'aldostérone mais également d'une polypose adénomateuse familiale asymptomatique associé à une mutation germinale hétérozygote du gène APC (Adenomatous Polyposis Coli), qui est une protéine importante de la voie Wnt/β-caténine. Chez ce patient, la surrénale réséquée présentait trois nodules avec une perte d'hétérozygotie du gène APC. Un seul nodule exprimait l'aldostérone synthase ; celui-ci était porteur, également, d'une mutation somatique de *KCNJ5* (Vouillarmet et al. 2016). Plus récemment, l'identification de mutations *GNAQ/GNA11* dans des APA porteurs de mutations CTNNB1 est également un élément en faveur d'un modèle à deux hits de formation de l'APA.

Une seconde hypothèse est avancée. Ainsi, différents auteurs suggèrent que les APA pourraient dériver de structures particulières de la zone glomérulée de la surrénale, appelées aldosterone producing cell clusters (APCC). Les APCC sont des agrégats de cellules situés sous la capsule surrénalienne et qui expriment CYP11B2. Il a été suggéré qu'il s'agit de structures dans lesquelles la production d'aldostérone est autonome, puisque des mutations somatiques similaires à celles décrites dans les APA ont été identifiées notamment dans des surrénales issus de sujets sains (Omata et al. 2017).

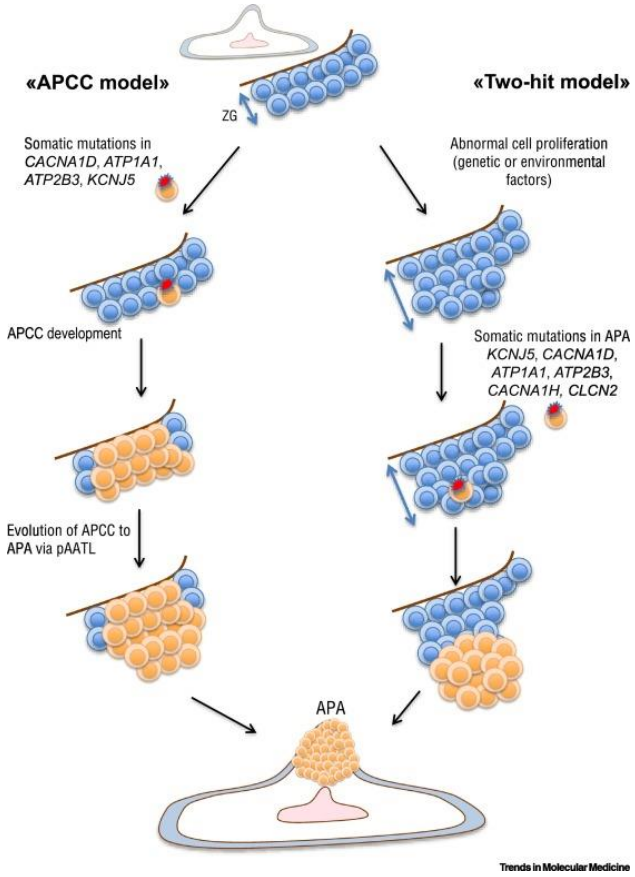


Figure 24. Les 2 hypothèses pour le développement de l'APA. L'hypothèse des APCC : dans la ZG, la présence des mutations dans les gènes qui sont à l'origine du développement de l'APA, provoque la formation des APCC, produisant de l'aldostérone d'une manière autonome et excessive. Dans certains cas ces structures peuvent évoluer pour donner naissance à l'APA via des structures intermédiaires, les pAATL (possible APCC to-APA transitional lesion). Développement de l'APA en 2 hits : l'activation de certaines voies de signalisation dans la ZG, particulièrement la voie de signalisation la β-caténine provoque une prolifération cellulaire anormale. Cette prolifération non contrôlée constitue un environnement favorable pour l'apparition des mutations somatiques responsable de la sécrétion hormonale par ces adénomes. De: Fabio L.Fernandes-Rosa et al, Genetic and Genomic Mechanisms of Primary Aldosteronism, https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.005

Dans les surrénales issus de sujets sains il a été montré que la ZG était discontinue et que toutes les cellules de la ZG n'exprimaient pas CYP11B2 (Boulkroun et al. 2010). Les APCC, ces agrégats ou nids de cellules, diffèrent de la zonation typique produisant l'aldostérone observée dans les surrénales humaines. Les APCC sont formés d'une partie externe composée de cellules de la ZG et d'une partie plus interne composée de cellules semblables aux cellules de la ZF. Une des hypothèses sur la formation des APCC est qu'une mutation somatique dans les cellules de la ZG bloque la transdifférenciation des cellules de la ZG en ZF, ce qui provoque l'accumulation de cellules ZG mutées et, par conséquent, la formation d'APCC. Il est intéressant de noter que les APCC sont également présents dans les surrénales adjacentes à l'APA.

Au-delà des différences de taille, les APCC sont distincts des APA, par différentes caractéristiques :

1- Les APCC sont constitués de cellules de type ZG et ZF sans délimitation évidente par rapport au reste du cortex, tandis que les APA sont délimités du tissu adjacent par du tissu fibreux ;
2- Les APCC expriment CYP11B2, mais pas CYP11B1, alors qu'on trouve certains APA constitués de cellules tumorales hétérogènes exprimant CYP11B2 et/ou CYP11B1. Donc, les APCC et les APA se distinguent par leur taille, et leurs profils d'expression enzymatique (Nishimoto et al. 2016).

Chez les sujets jeunes, entre 0 et 11 ans, l'expression de l'aldostérone synthase est continue au niveau de la ZG et les surrénales présentent plutôt une zonation dite « classique » du cortex avec peu d'APCC. En revanche, chez les sujets plus âgés, entre 18 et 50 ans, il a été observé la présence d'APCC, présentant un marquage de l'aldostérone synthase important, et dont le nombre et la taille augmentent en fonction de l'âge du sujet. Chez ces sujets, une perte concomitante de l'expression continue de l'aldostérone synthase au niveau de la ZG est observée. Ceci pourrait indiquer que la production d'aldostérone par cette zone serait inhibée par un rétrocontrôle négatif due à la production autonome d'aldostérone par les APCC (Nanba et al. 2017).

5.9 Interaction vasculaire et hormonale dans la glande surrénale

5.9.1 Adaptation physiologique du cortex surrénalien

Le cortex surrénalien est un organe hautement plastique, dans lequel les stimuli environnementaux se traduisent par des réponses hormonales qui peuvent impliquer un remodelage tissulaire extrême. L'expansion de la ZG observée sous un régime pauvre en sel, qui stimule le système rénine-angiotensine pour favoriser la biosynthèse d'aldostérone, en est un exemple (McEwan, Vinson, and Kenyon 1999). D'autre part, l'excès de glucocorticoïdes endogènes ou exogènes, comme le traitement à la dexaméthasone, entraîne une régression importante de la ZF et une suppression de la production de glucocorticoïdes (Freedman et al. 2013). Ces deux changements sont réversibles et peuvent impliquer une modification majeure de la vascularisation surrénalienne.

L'ACTH est la principale hormone régulant la fonction de la ZF et de la ZR et stimulant la biosynthèse des glucocorticoïdes ; elle stimule également, dans une moindre mesure, la production d'aldostérone par la ZG. Par ailleurs, l'ACTH, lorsqu'elle se lie à son récepteur MC2R dans les surrénales, induit également la production par les surrénales de facteurs affectant leur croissance et leur flux sanguin. En effet, l'ACTH contrôle l'angiogenèse et la vascularisation dans la glande surrénale en stimulant la production intra-surrénale de VEGF et des EETs vaso-relaxants. D'autre part, le VEGF peut agir sur les cellules surrénales en se liant aux récepteurs du VEGF présents sur les cellules corticosurrénaliennes et stimuler la production d'aldostérone. La vascularisation et le développement de la corticosurrénale doivent être coordonnés pour que les cellules corticosurrénaliennes aient accès aux vaisseaux sanguins au fur et à mesure de la croissance de la surrénale.

Chez l'Homme, la vascularisation de la glande surrénale est établie dès la huitième semaine de gestation, lorsque la surrénale est alimentée par les artères de l'aorte descendante, et que les sinusoïdes capillaires à l'intérieur de la glande forment un continuum avec la circulation systémique. Cette stimulation est médiée par des facteurs angiogéniques spécifiques comme le VEGF (Ishimoto et al. 2008). Shifren et al ont montré que le cortex surrénalien fœtal humain est hautement vascularisé (Jan L. Shifren et al. 1998), ce qui est cohérent avec sa fonction d'organe endocrine, et que le cortex surrénalien fœtal humain exprime le VEGF, qui peut réguler le développement vasculaire cortical (Ishimoto et al. 2008). L'ACTH augmente l'expression de l'ARNm codant pour le VEGF (Gaillard et al. 2000) ; cela pourrait suggérer que l'expression et la sécrétion du VEGF par les cellules du cortex surrénalien fœtal humain sont régulées par l'ACTH et les facteurs qui augmentent la production intracellulaire d'AMPc. Dans la même étude, les auteurs ont également démontré que la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase et l'ACTH sont capables de stimuler l'expression et la sécrétion du

VEGF par les cellules corticosurrénaliennes fœtales humaines. Cela suggère que les voies de l'adénylate cyclase et de l'AMPc sont les principaux régulateurs de la production de VEGF dépendante de l'ACTH. Par conséquent, l'ACTH induit les enzymes stéroïdogènes, la production de cortisol et d'aldostérone et l'expression de différents facteurs de croissance par la même voie, ce qui suggère que l'ACTH peut coordonner la vascularisation, le développement corticosurrénalien et la stéroïdogenèse dans la glande surrénale.

5.9.2 Interaction entre l'aldostérone et le système vasculaire

Outre l'AngII, le potassium extracellulaire et l'ACTH, il a été démontré que l'endothéline et le VEGF stimulent la production d'aldostérone de manière paracrine (Ehrhart-Bornstein et al. 1998; Gennari-Moser et al. 2013). En particulier, il a été démontré que le VEGF stimule la production d'aldostérone indirectement en maintenant l'intégrité endothéliale mais aussi directement en stimulant l'expression de l'aldostérone synthase dans les cellules de la ZG (Gennari-Moser et al. 2013). L'action du VEGF est soit synergique, soit indépendante de l'Ang II. Il est intéressant de noter que, contrairement à l'Ang II, le VEGF n'augmente pas l'expression de StAR. Le rôle stimulant du VEGF se limite à augmenter la production d'aldostérone, mais ne modifie pas la biosynthèse du cortisol dans les cellules corticosurrénaliennes H295R (Gennari-Moser et al. 2013). De plus, l'inhibition du VEGF par surexpression de la tyrosine kinase-1 soluble de type fms (sFlt-1) chez le rat est associée à une réduction de la vascularisation de la corticosurrénale (réduction du marqueur de cellules endothéliales CD31) qui s'accompagne d'une réduction de la production d'aldostérone (Gennari-Moser et al. 2013). Ces résultats suggèrent que le VEGF peut avoir un rôle dans la production d'aldostérone indépendamment du SRA et peut jouer un rôle dans la surproduction autonome d'aldostérone dans l'HAP.

Il a également été démontré que l'application d'un milieu conditionné venant de cellules endothéliales stimule la production d'aldostérone dans les cellules corticosurrénaliennes humaines H295R (Ansurudeen et al. 2007; Willenberg, Schinner, and Ansurudeen 2008). L'interaction entre les cellules endothéliales et stéroïdogènes a été démontrée au niveau moléculaire. Des études in vitro sur des cellules corticosurrénaliennes humaines en culture ont révélé que des cytokines comme l'IL-6 et l'ET-1, ainsi que l'oxyde nitrique (NO) produit par les cellules endothéliales, sont les principaux acteurs de cette interaction (G. Rossi et al. 1994; Zeng et al. 1998; G. P. Rossi et al. 2002). Les cellules corticosurrénaliennes expriment la préproendothéline, le précurseur de l'ET-1, ainsi que l'enzyme de conversion de l'endothéline, qui permet la génération de l'ET-1, un peptide de 21 acides aminés (Zeng et al. 1998; Mazzocchi et al. 1996). Il est intéressant de noter que l'ET-1 stimule la biosynthèse

d'aldostérone chez l'homme et chez le rat (Mazzocchi et al. 1996). Cette action est médiée par les deux sous-types de récepteurs de l'endothéline ETA et ETB exprimés dans la ZG du cortex surrénalien (G. Rossi et al. 1994; Zeng et al. 1998) (Figure 25).

D'autre part, l'aldostérone peut agir non seulement sur les cellules épithéliales rénales pour réguler la pression artérielle mais aussi sur les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires. En effet, il a été démontré que l'activation de son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (MR), induit un dysfonctionnement endothélial, une inflammation, un remodelage, un raidissement et une athérosclérose (Rocha et al. 2002; Oberleithner 2005; Nishizaka et al. 2004; Krug et al. 2007; Caprio et al. 2008; Hashikabe et al. 2006). En outre, il a été démontré chez la souris que l'aldostérone augmente la densité des vaisseaux en réponse à l'ischémie, un phénomène médié par l'activation du MR, la signalisation de l'angiotensine II et le VEGF (Michel et al. 2004). L'aldostérone augmente également l'expression du facteur de croissance placentaire (PGF, un membre de la famille du VEGF) dans les vaisseaux athérosclérotiques humains, ce qui entraîne une inflammation et une prolifération des cellules vasculaires (Jaffe et al. 2010). L'aldostérone peut également stimuler la production de VEGF-A dans les neutrophiles humains en activant les voies PI3 kinases, ERK1/2, et dans une moindre mesure p38 MAPK, ce qui suggère que l'aldostérone a un rôle actif sur la néovascularisation (C. Walczak et al. 2011).

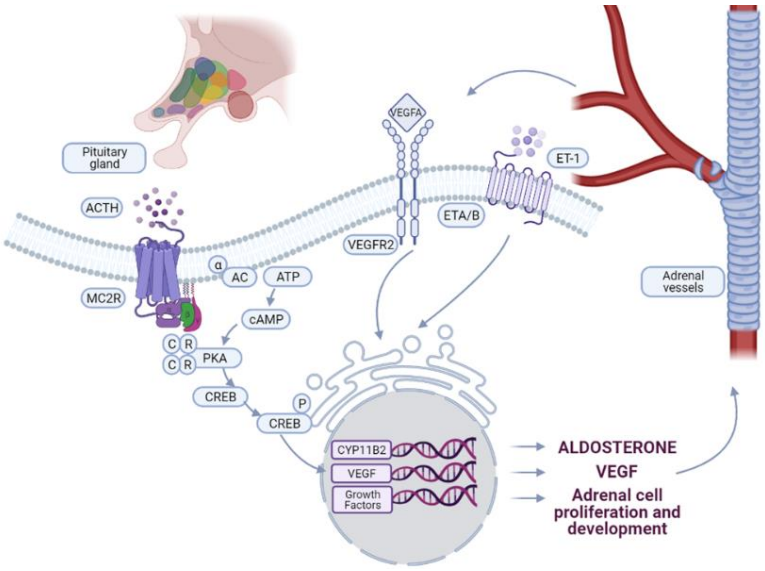


Figure 25. Interactions vasculaires et hormonales dans la surrénale. L'ACTH, produite par l'hypophyse, contrôle les interactions entre les cellules stéroïdogènes et les vaisseaux. La liaison de l'ACTH au MC2R entraîne l'activation de la voie de signalisation PKA, stimulant l'expression du CYP11B2 et la biosynthèse de l'aldostérone. L'ACTH stimule également l'expression du VEGF-A et de facteurs de croissance spécifiques par les cellules surrénales, ce qui entraîne la croissance des vaisseaux. En se liant au VEGFR2, le VEGF-A stimule d'une part la croissance des cellules endothéliales et d'autre part l'expression de facteurs de croissance impliqués dans le maintien et la fonction de la corticosurrénale. La biosynthèse de l'aldostérone est également induite par l'ET-1 par liaison aux récepteurs de l'endothéline ETA et ETB, exprimés dans la ZG de la corticosurrénale.

6. Objectif du travail de thèse

L'objectif de mon travail de thèse est de mieux comprendre l'interaction entre l'angiogenèse et la prolifération, en particulier dans les phénomènes de zonation du cortex surrénalien, de production d'aldostérone et de formation d'APA. Pour cela nous avons développé une double approche : i) l'étude d'un nouveau modèle de souris généré au laboratoire exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur Cyp11b2 croisées avec des souris rapportrice mTmG. La structure du cortex surrénalien, sa vascularisation ainsi que les conséquences moléculaires de différents régimes et traitements connu pour moduler la plasticité de la surrénale ont été analysés ; ii) l'étude du rôle des voies de signalisation Wnt/β-caténine et ACTH ainsi que des éléments de la régulation paracrine de la biosynthèse de l'aldostérone dans le développement de l'APA et des autres structures produisant l'aldostérone et leur rôle dans l'hétérogénéité intratumorale et le statut mutationnel. L'ensemble de ce projet a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes responsables de la pathologie surrénalienne en relation avec la nodulation et la production d'aldostérone.

7. Partie 1 : Interaction hormonale et vasculaire dans l'hyperaldostéronisme primaire

7.1.1 Littérature et hypothèse

La glande surrénale est un organe régénératif et multifonctionnel. Le cortex surrénalien est un tissu hautement dynamique où la croissance et la fonction sont profondément interconnectées. La régulation de la stéroïdogenèse dépend d'une signalisation endocrine appropriée, et de l'intégrité de la structure et de l'homéostasie de la surrénale (Gallo-Payet and Battista 2014). La perturbation de la zonation et de l'homéostasie a été impliquée dans de nombreuses maladies surrénaliennes, telles que l'HAP, les adénomes produisant du cortisol et d'autres (E. M. Walczak and Hammer 2015). Chez la souris, les cellules du cortex externe, y compris la ZG et la ZF, présentent un taux de prolifération supérieur à celui du cortex interne (ZX), et la mort cellulaire est principalement observée à la limite cortico-médullaire dans des conditions physiologiques (Kataoka, Ikehara, and Hattori 1996). Le cortex surrénalien adulte contient une hiérarchie de lignée stricte de progéniteurs indifférenciés qui peuvent se différencier en cellules matures. En plus, des cellules souches résidant dans le cortex périphérique sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en cellules stéroïdogéniques. Il est également théoriquement possible que des cellules corticales matures se dédifférencient en progéniteurs immatures, ce qui pourrait ensuite donner naissance à des cellules de ZG et ZF matures.

Toutes les études confirment que la transdifférenciation/conversion directe de ZG mature en ZF représente un mécanisme cellulaire majeur du renouvellement corticosurrénal adulte en condition physiologique (Figure 26).

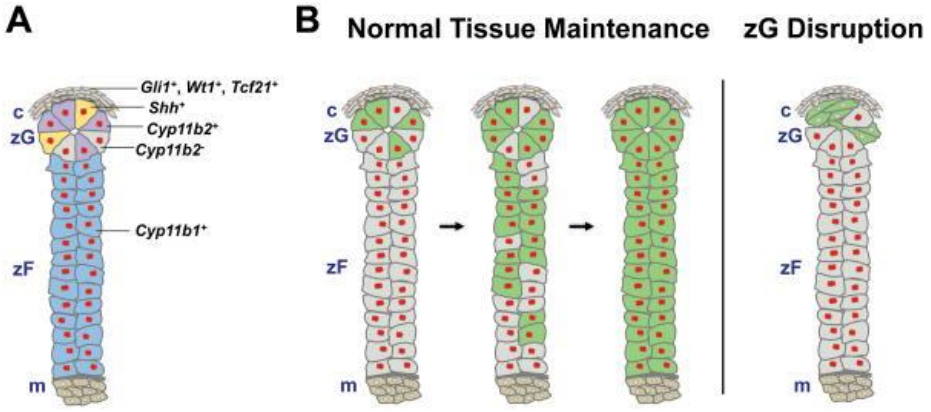


Figure 26. Les mécanismes cellulaires responsable du renouvellement de la corticosurrénale adulte. La surrénale adulte contient des cellules souches résidant dans le cortex périphérique et capables d'un auto-renouvellement illimité et d'une différenciation en types de cellules stéroïdogènes. De : Pignatti et al, Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex, DOI:10.1016/j.mce.2016.09.003

Comme de nombreux tissus endocrines, le cortex surrénalien est un tissu hautement vascularisé (Figure 27). Un réseau dense de capillaires sanguins irrigue de manière centripète la glande surrénale, permettant à chaque cellule endocrine d'être en contact avec une cellule endothéliale.

Ce réseau vasculaire est nécessaire pour la croissance des organes, la différenciation au cours de l'embryogenèse, l'arrivée d'agents trophiques (comme l'ACTH) et de précurseurs des hormones stéroïdes et la sécrétion d'hormones dans la circulation.

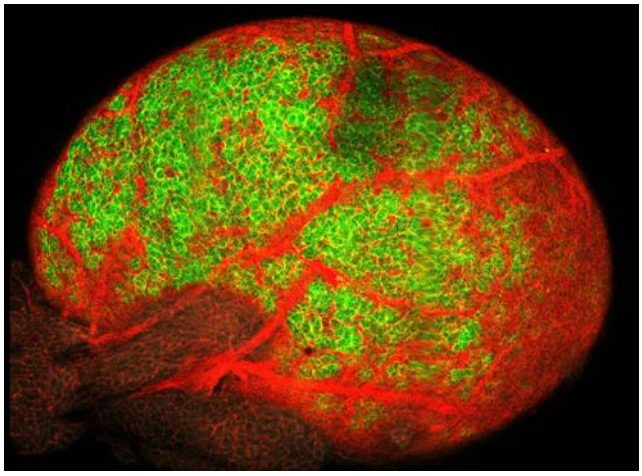


Figure 27. Vascularisation de la glande surrénale chez une souris de 2 semaines. Image prise en imagerie confocale.

Notre laboratoire a montré (Boulkroun et al. 2010) que les surrénales avec APA sont caractérisées par un remodelage tissulaire et une diminution de la vascularisation du cortex surrénalien adjacent à l'APA ainsi que par une augmentation de la nodulation surrénale. Il a également été montré une vascularisation réduite dans les tissus adjacents à l'APA par rapport aux surrénales provenant de sujets sains (Figure 28).

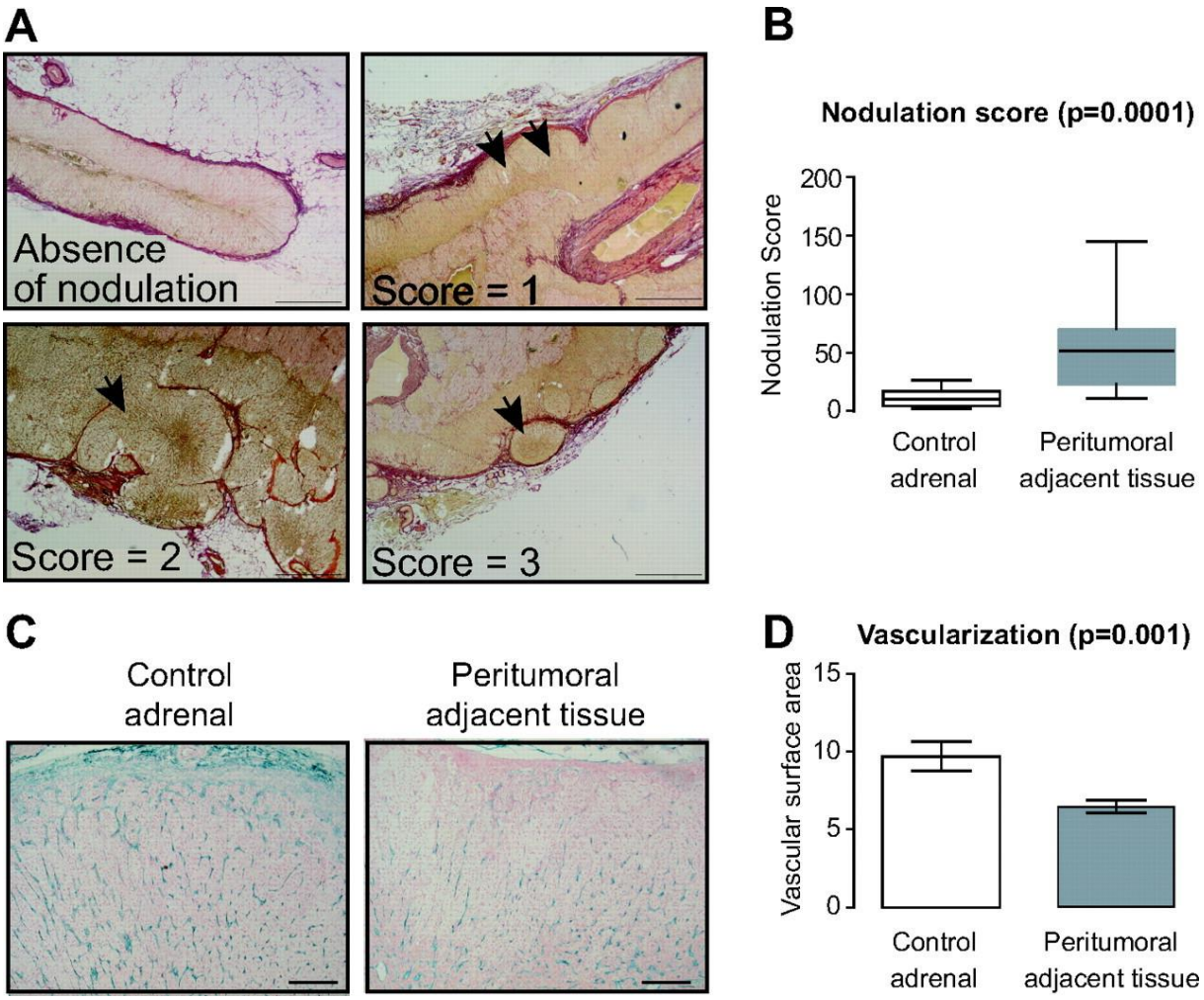


Figure 28. Nodulation dans la surrénale contrôle et dans le tissu adjacent péritumoral. A. Coloration au Rouge Sirius et quantification du score de la nodulation. **B.** Les scores de nodulation ont été déterminés pour la surrénale contrôle et les APA et indiquent une augmentation significative de la nodulation dans le tissu adjacent péritumoral par rapport à la surrénale contrôle. **C.** immunohistochimie CD34 sur la surrénale contrôle et le tissu adjacent péritumoral révélant une architecture vasculaire normale. **D**. la quantification de la surface vasculaire dans la surrénale contrôle et le tissu adjacent péritumoral a montré une diminution significative de la vascularisation dans le tissu adjacent péritumoral. De: Boulkroun et al, Adrenal Cortex Remodeling and Functional Zona Glomerulosa Hyperplasia in Primary Aldosteronism, DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158543

De façon intéressante, de nombreuses études indiquent que la structure et la fonction du cortex surrénalien évoluent avec l'âge et que cela pourrait être la conséquence d'un dysfonctionnement vasculaire (Figure 29). Le vieillissement est associé à une augmentation de la nodulation surrénale dans la population générale, ce qui pourrait représenter une croissance compensatoire en réponse à des modifications ischémiques dues à une athérosclérose localisée ou à l'hypertension artérielle.

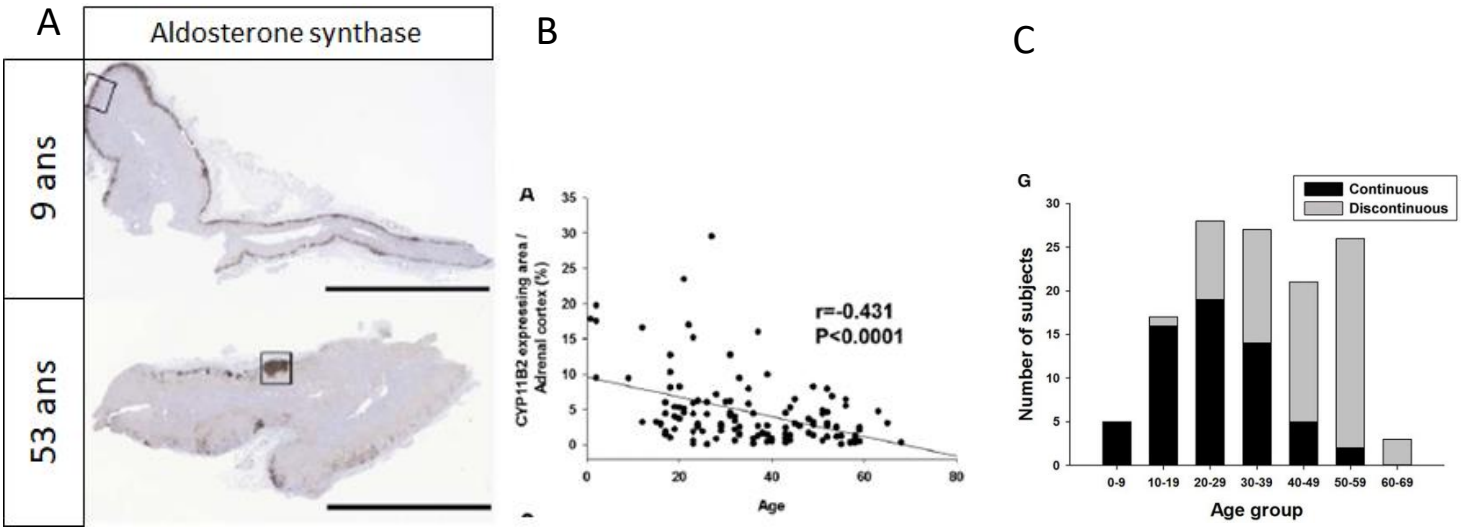


Figure 29. **Expression continue et discontinue de CYP11B2 au cours du vieillissement. A**. Expression continue de CYP11B2 (en brun) dans la ZG de la glande surrénale jeune (garçon de 9 ans) et Expression discontinue du CYP11B2 dans la ZG avec des APCCs dans la glande surrénale plus âgée (femme de 53 ans). **B.** Corrélation entre l'âge et la surface totale d'expression de CYP11B2 normalisée à la surface du cortex surrénal (%). **C.** Distribution du modèle d'expression continue et discontinue de CYP11B2 dans les groupes d'âge. La barre noire indique une expression continue de CYP11B2, et la barre grise une expression discontinue de CYP11B2. De : Nanba K, et al Age-Related Autonomous AldosteronismClinical Perspective. Circulation. 25 juill 2017;136(4):347-55

Nous émettons l'hypothèse que les modifications vasculaires surrénales avec l'âge peuvent modifier la structure et la fonction du cortex surrénalien, entraînant une augmentation de la nodulation, créant un environnement propice au développement de l'APA.

Ainsi, notre objectif est de mieux comprendre l'interaction entre l'angiogenèse et la prolifération cellulaire, en particulier dans la zonation du cortex surrénalien, la production d'aldostérone et la formation d'APA.

Nous avons récemment développé dans notre laboratoire des souris génétiquement modifiées exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du gène *Cyp11b2*, codant pour l'aldostérone synthase et spécifiquement exprimée dans la zone glomérulée (ZG) du cortex surrénalien. Ces souris ont été croisées avec des souris rapportrices mTmG, chez lesquelles l'activation de la Cre recombinase va induire l'expression de la protéine GFP sur un fond exprimant la protéine Tomato. Dans notre modèle le promoteur endogène de *Cyp11b2* dirige la transcription de la Cre.

7.1.2 Matériel et méthodes

7.1.2.1 *Souris*

Toutes les procédures d'expérimentation animale ont été approuvées par le comité d'éthique local de l'Université de Paris (N°21-011), et par le ministère français de la recherche et des études supérieures.

7.1.2.2 *Génération de souris Cyp11b2 Cre*

La génération et la validation des souris Cyp11b2 Cre a été réalisée grâce à une collaboration avec GenOway (France). La génération de ces souris a été faite sur un fond génétique C57BL/6. Il y a quelques années, Freedman et collègues ont généré un modèle de souris avec une recombinase Cre insérée dans le locus *Cyp11b2* au niveau de l'exon 2, induisant une perte d'expression de Cyp11b2 ; les souris hétérozygotes présentent donc haplo-insuffisantes pour Cyp11b2. Comme nous nous intéressons à la production d'aldostérone à partir du cortex surrénalien, le maintien de l'expression de Cyp11b2 était essentiel pour notre projet. Nous avons donc fait le choix d'insérer la recombinase Cre en aval du codon stop de *Cyp11b2,* au niveau de l'exon 9, dans la région 3' non traduite du gène après une séquence IRES (internal ribosome entry site). L'expression de Cyp11b2 étant normalement maintenue dans les cellules de la ZG, le maintien de la lignée et les études peuvent être réalisées sur des souris Cre hétérozygotes ou homozygotes. L'inclusion d'un IRES entre la séquence de *Cyp11b2* et celle de la Cre recombinase permet la production d'un seul ARNm mais l'expression des deux protéines de façon indépendante. Ce modèle de souris a été croisé avec des souris rapportrices mTmG fournies par l'équipe 9 dirigée par Anne Eichmann dans notre centre de recherche. Les souris ainsi générées seront appelées Cyp11b2-Cre::mTmG (Figure 30).

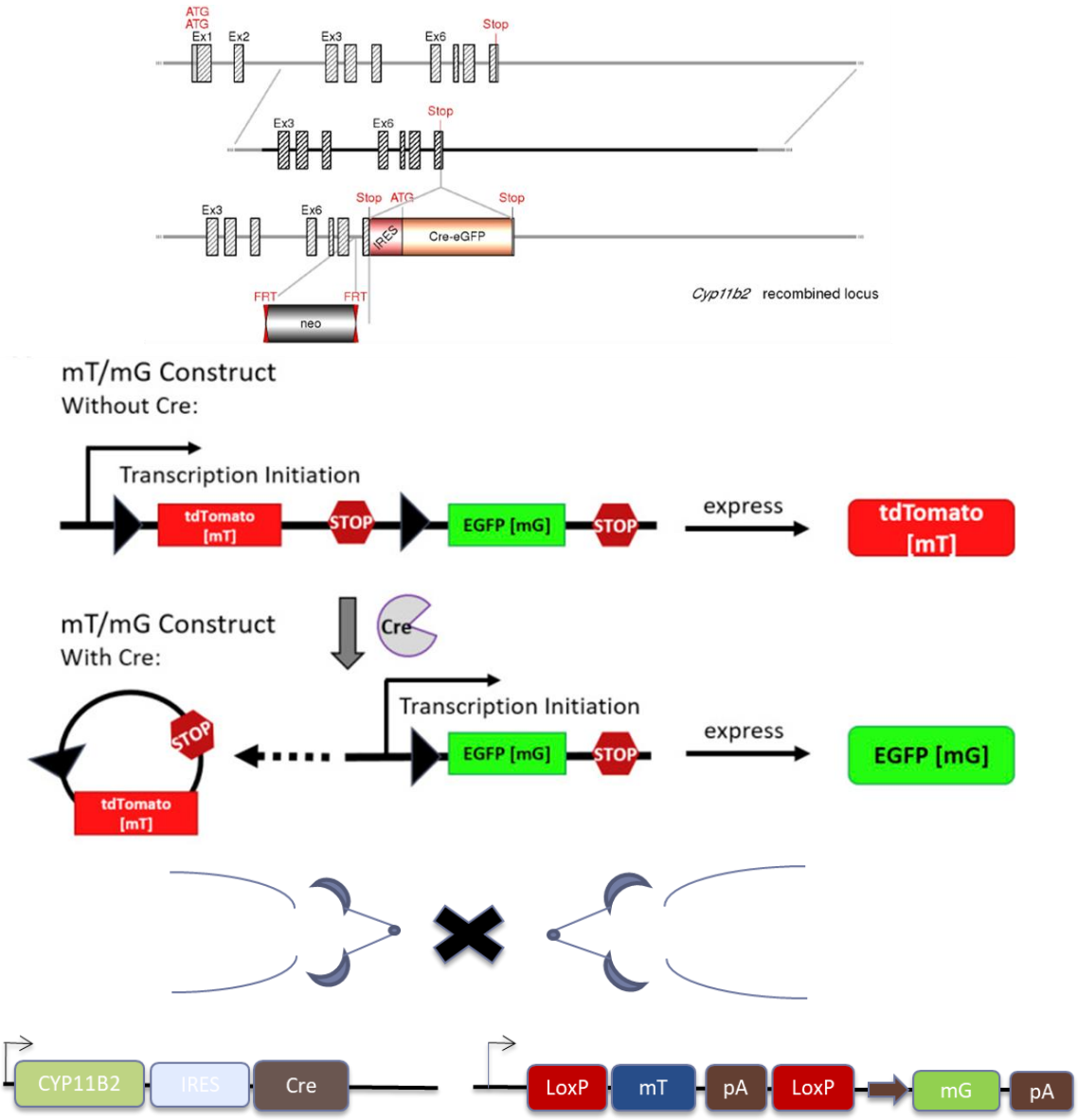


Figure 30. Construction du modèle de souris. La recombinase Cre a été insérée en aval du codon stop de *Cyp11b2* dans la région 3' non traduite du gène après une séquence IRES (internal ribosome entry site). Ce modèle de souris a été croisé avec des souris rapportrices mTmG où l'expression de la Cre induit une suppression de l'expression de la protéine tomato en clivant les régions lox entre le gène tomato et favorise l'expression de la protéine GFP.

7.1.2.3 *Génotypage*

L'ADN génomique a été extrait à partir de l'extrémité de la queue des souris. Les échantillons ont été lysés dans un tampon de lyse (NaCl, Tris pH 8,5, EDTA, SDS et protéinase K) toute la nuit à 37°C. L'ADN a ensuite été précipité avec de l'isopropanol et lavé avec de l'éthanol à 70 % avant d'être resuspendu dans de l'eau. L'ADN a été utilisé pour le génotypage par PCR. Les amorces suivantes ont été utilisées pour le génotypage : $Cyp11b2^{CRE/WT}$ F: 5'-GCT CCT GCT TCAC CAT GTG AGC AG-3', et pour $Cyp11b2^{CRE/WT}$ R: 5'-GGA CCA GCT ATA GAG ACC TCA CCA AAC AC-3'. Amorces pour mTmG : mTmG FWT : 5'- CTC TGC

TGC CTC CTG GCT TCT-3' ; mTmG RWT : 5'- CGA GGC GGA TCA CAA GCA ATA-3' ; mTmG RMut : 5'- TCA ATG GGC GGG GGT CGT T-3'.

Les produits PCR ont été visualisés sur des gels d'agarose à 2%.

7.1.2.4 *Traitement à la Dexaméthasone*

Les animaux, âgés de 4 semaines ont été soumis pendant deux semaines à un traitement à base de dexaméthasone (1mg/ml) dans l'eau de boisson ou par gavage, entrainant la régression du cortex surrénalien. Au terme de cette période le traitement est interrompu pendant 3 semaines, permettant la régénération du cortex surrénalien.

La durée totale du protocole est donc de 5 semaines. Des groupes d'animaux sont sacrifiés au début du traitement puis en semaine 2 et 5 Le nombre de souris traitées a été de 6 à 8 par groupe.

7.1.2.5 *Régime alimentaire*

Les animaux, âgés de 4 semaines ont été soumis pendant deux semaines à des régimes standard pour le groupe contrôle, ou à des régimes riche et pauvre en sodium (Fournisseur : Sniff). Le nombre de souris soumises à ces régimes a été de 6 à 8 par groupe.

- Un régime standard (0,3% Na^+ ; 0,8% K^+)
- Un régime pauvre en Na^+ (0,05% Na^+ ; 0,8% K^+)
- Un régime riche en Na^+ (3.2% Na^+ ; 0,8% K^+)

7.1.2.6 *Histologie*

Préparation des tissus

Différents organes ont été prélevés : les glandes surrénales, les reins, le cœur, le cerveau, le tissu adipeux sous cutané et viscéral, l'aorte et les vaisseaux mésentériques. Les organes prélevés ont été soit cryoconservés soit inclus en paraffine.

Pour les tissus cryoconservés, ils ont été tout d'abord fixés dans de la paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 24h, puis lavés avec du PBS1X pendant 24h. Une étape de cryoconservation des tissus par un gradient de sucrose de 10% à 30% était nécessaire afin d'empêcher la formation de cristaux de glace dans les tissus lorsque l'eau gèle et se dilate. Les cristaux de glace brisent les membranes cellulaires et produisent des trous à l'intérieur des cellules et sont responsables d'un relâchement de la matrice extracellulaire. Les tissus ont été fixés avec de l'OCT avant d'être coupés. Pour cela, de l'OCT est mis dans un cryomoule en plastique, le tissu est placé sur le dessus dans l'orientation correcte pour la coupe, de l'OCT est ensuite versé sur le tissu, en veillant à éviter les bulles, jusqu'à ce que le tissu ne

soit plus exposé. Le moule est alors placé dans de l'isopentane refroidie avec de l'azote liquide jusqu'à ce que l'OCT se solidifie. Les échantillons sont conservés à -80°C avant d'être coupés au cryostat. Les coupes de cerveau ont été réalisées en utilisant un vibratome.

Pour les tissus inclus en paraffine, ils ont été fixées en PFA 4% pendant 24h avant d'être placé dans un bain d'éthanol 70%. Les tissus sont ensuite déshydratés par des bains successifs d'éthanol 100% et de xylène par un automate avant d'être inclus en paraffine. Les blocs ont été coupées en sections de 6 µm avec un microtome.

Pour les immunofluorescences réalisées sur des coupes inclus en paraffine, les tissus sont déparaffinés par des bains successifs de xylène, puis réhydratés par des bains successifs d'éthanol allant de 100% à 30%, puis dans l'eau. Le démasquage de l'antigène a été effectué avec une solution de démasquage de l'antigène à base d'acide citrique (H-3300, Vector Laboratory) pendant 30 minutes à 98°C.

Pour les immunofluorescences Cyp11b1 et Cyp11b2, le blocage des sites non-spécifiques est réalisé avec du normal donkey serum à 10 %, dilué dans une solution TBS 1X contenant 0,1 % de triton X100 ; les anticorps ont été dilués dans une solution de TBS 1X contenant 0,1 % de Triton X100, 10% de normal donkey Serum et 5 % de normal rat serum. Les anticorps Cyp11b1 et Cyp11b2 ont été dilués au 1/50 et 1/100 respectivement dans du TBS 1X contenant 0,1% de triton X100, 10% NRS et 5% NDS et incubés pendant une nuit à 4°C dans une chambre humide. Les anticorps secondaires utilisés étaient un anticorps donkey anti-sheep Alexa 488 (Thermo-Fischer, A11015) dilué au 1/400 dans du TBS 1X, 0,1% de triton X100, 10% NRS et 5% NDS pour Cyp11b1, et un anticorps donkey anti-rabbit Alexa 594 (ThermoFischer, A21207) dilué au 1/400 dans du TBS 1X 0,1% de triton X100, 10% NRS et 5% NDS pour Cyp11b2. Les anticorps secondaires ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante. Les lavages entre les incubations avec les anticorps primaires et secondaires ont été réalisées avec du TBS 1X – 0,1% Triton X100. Les anticorps Cyp11b1 et Cyp11b2 nous ont été généreusement donné par le Dr Celso E Gomez-Sanchez.

Pour les immunofluorescences Dab-2, la liaison non spécifique a été bloquée avec une solution de TBS 1X + 5% BSA. L'anticorps de lapin anti-Dab2 (Santa-Cruz Biotechnology, sc13982) a été dilué à 1/100 dans du TBS 1X + 3% de BSA et incubé 45 min à température ambiante. Un anticorps de lapin Alexa 594 dilué au 1/400 dans du TBS a été utilisé pour détecter l'anticorps primaire avec une incubation de 1 heure à température ambiante. Les lavages entre les incubations avec les anticorps primaires et secondaires ont été réalisées avec du TBS 1X – 0,1% Triton X100.

Pour les immunofluorescences podocalyxine, les tissus cryoconservés ont été fixés en PFA 4% pendant 15 min. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués pendant 1h dans une solution de TBS 1X +

5% BSA, l'anticorps primaire goat anti-Podocalyxine (1/100, AF1556, R&D Systems) a été dilué dans du TBS 1X + 3% BSA et incubé 1h à température ambiante. L'anticorps secondaire Donkey anti-Goat (ThermoFischer, A32849) a été dilué au 1/400 dans du TBS 1X + 3% BSA et incubés pendant 1h à température ambiante.

Pour toutes les immunofluorescences, les noyaux sont ensuite marqués avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Roche diagnostics, GmBH, 10 236 276 001) dilué à 1/5000 dans du TBS.

Les acquisitions ont été faites en utilisant les objectifs x10 et x20 sur un système VectraTM (Perkin Elmer). Les images multispectrales ont été acquises en utilisant un système d'imagerie automatisé Vectra et quantifiées avec le logiciel InForm (Perkin Elmer).

Coloration à l'hemalun-Eosine-Safran (HES)

Le marquage HES a été réalisé sur les coupes cryoconservées en utilisant le kit RAPID FROZEN SECTIONS H&E staining kit de Bio-optica (ref : 04-061010).

Les coupes sont incubées avec le RÉACTIF A pendant 45 à 60 secondes puis lavées avec de l'eau du robinet, incubées dans la solution tampon du kit de buffer à raison de 5 immersions successives, lavées avec de l'eau du robinet puis incubées avec le RÉACTIF C pendant 30 secondes et enfin lavées à l'Éthanol à 95% à raison de 5 immersions puis à l'éthanol absolu et au xylène avant d'être montées.

Les lames ont été scannées avec le scanner de lames Olympus (VS200), disponible sur la platefome d'histologie du centre, à un grossissement X20 et les images analysées à l'aide du logiciel OlyVIA.

7.1.2.7 *Hybridation in situ par RNA-scope*

Les marquages RNAscope ont été réalisés en suivant le protocole du fournisseur (ACD Biotechne). Les lames sont lavées avec du PBS 1X dans un portoir à lames Tissue-Tek® pendant 5 min tout en déplaçant le portoir de haut en bas pour éliminer l'OCT. Puis les lames sont chauffées pendant 30 min à 60°C et ensuite postfixées en les immergeant dans du PFA à 4% dans du PBS 1X pendant 15 min à 4°C. Les tissus sont déshydratés en les immergeant dans de l'éthanol à 50 %, 70 % et 100% pendant 5 min chacun puis séchés à l'air libre pendant 5 min à température ambiante. L'activité des péroxydases est bloquée par le peroxyde d'hydrogène RNAscope®. La solution RNAscope® Target Retrieval est utilisé pour casser les liaisons ARN/tissus qui ont pu se former lors de la fixation de l'échantillon. La solution Target Retrieval 1X est chauffée entre 98 et 102°C. Avec une paire de pinces, un support de lames contenant les lames est immergé très lentement dans la solution préparée et maintenu dans la solution pendant 5 min. Le porte-lames chaud est transféré immédiatement dans un plat de coloration

contenant de l'eau distillée. Les lames sont rincées dans de l'éthanol 100% frais en déplaçant les lames de haut en bas 3 à 5 fois puis séchées à l'air libre.

La solution RNAscope® Protease Plus est appliquée aux lames placées dans le plateau à lames ACD EZ-Batch™. Le plateau à lames est ensuite placé dans le plateau de contrôle de l'humidité Hybez™ préchauffé, replacé dans le four HybEZ™ et incubé pendant 30 mins à 40°C.

Le mélange de sondes d'hybridation (Cyp11b1 et Cyp11b2) est ajouté aux coupes puis les coupes sont mises dans le four HybEZ™ pendant 2 h à 40°C puis lavées dans un bain Buffer 1X pendant 2min à température ambiante. Pour l'amplification, La solution AMP 1 est ajoutée pour recouvrir entièrement chaque lame, puis le plateau des lames est inséré dans le four HybEZ™ pendant 30 min à 40°C. Les mêmes étapes sont répétées pour l'amplification 2, 3, 4, 5 et 6. Une étape de détection de signal est réalisée en ajoutant du substrat Fast-RED/lame pendant 10 min à température ambiante dans le noir. Les étapes d'hybridation de l'AMP 7, 8, 9 et 10 sont répétées pour la deuxième sonde suivie d'une étape de détection de signal vert en ajoutant du substrat Green pendant 10min à TA dans le noir. Les lames sont contre colorées par 50% d'hématoxyline pendant 2 min à température ambiante et puis montées.

7.1.2.8 *RT-qPCR*

Extraction de l'ARN et analyse RT-qPCR.

Les tissus ont été broyés à l'aide de l'appareil Ultra-Turrax T25 de Janke et Kunkel (IKA technologies, Staufen DE) et l'ARN total a été extrait avec du réactif Trizol (Ambion Life Technologies, Carlsbad CA) selon les recommandations du fabricant. Après traitement à la désoxyribonucléase I (Life Technologies, Calsbad CA), 500ng d'ARN total ont été rétro-transcrits (iScript reverse transcriptase, Biorad, Hercules, CA). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le SYBRgreen (Sso advanced universal SyBr Green Supermix, Biorad, Hercules, CA) sur un thermocycleur C1000 touch de Biorad (CFX96 Real Time System) selon les instructions du fabricant. Des contrôles sans matrice ont été inclus pour vérifier que la fuorescence n'était pas surestimée en raison de la formation de dimères d'amorces ou de contaminations de la PCR. Les produits RT-qPCR ont été analysés dans une courbe de fusion post-amplification pour s'assurer qu'un seul amplicon a été obtenu. La normalisation de la quantité d'ARN et de l'efficacité de la transcriptase inverse a été effectuée par rapport à trois gènes de référence (moyenne géométrique de l'expression de l'ARN 18S ribosomal, β2-microglobuline et Ubiquitine C pour les échantillons de souris conformément aux recommandations MIQE (Bustin et al. 2009). La quantification a été effectuée en utilisant la méthode de la courbe standard. Les courbes standard ont

été générées en utilisant des dilutions en série à partir d'un pool d'ADNc de tous les échantillons. Les amorces suivantes ont été utilisées :

Gène	**Amorces**
18S	5'-CCCTGCCCTTTGTACACC-3' 5'-CGATCCGAGGGCCTCACTA-3'
mβ2-microglobuline	5'-ATTCACCCCCACTGAGACTG-3' 5'-TGCTATTTCTTTCTGCGTGC-3'
mUbiquitinC	5'-AGCCCAGTGTTACCACCAAG-3' 5'-ACCCAAGAACAAGCACAAG-3'
mCyp11b1	5'-TGTATCGAGAGCTGGCAGAG-3' 5'-CCTGGATGGCATCCATTGAC-3'
mCyp11b2	5'-ACCTACAGTGGCATTGTG-3' 5'-GATTGCTGTCGTGTCAAC-3'
mWnt4	5'-CCCTGTCTTTGGGAAGGTGGTG-3' 5'-CCCTGTCTTTGGGAAGGTGGTG-3'
mTcf3	5'-CAGATGGTGGCCTGGATACT-3' 5'-CATCCCTGCTGTAGCTGTCA-3'
mLef1	5'-AAATGGGTCCCTTTCTCCAC-3' 5'-AAATGGGTCCCTTTCTCCAC-3'
mVegfa	5'-CCTGGTGGACATCTTCCAGGAGTACC-3' 5'-GAAGCTCATCTCTCCTATGTGCTGGC-3'
mFLT1 (VEGFR1)	5'- CTCAACTGCACCGCCACC -3' 5'- GGTCAATCCGCTGCCTTA -3'
mVEGFR2 (KDR)	5'- GATACTGGAGCCTACAAGTGC-3' 5'- AGAGGCGATGAATGGTGATCT-3'
mFN1	5'- AAGGCTGGATGATGGTGGAC-3' 5'- GGATGTCCGGGTGTCCTG-3'
mBcl2	5'-GCCCTGTGGATGACTGAGTA-3' 5'-GCTGGGGCCATATAGTTCCA-3'
mP53	5'-ATTTCACCCTCAAGATCCGC-3' 5'-AACTCTAAGGCCTCATTCAGCT-3'
mCasp3	5'-TGGAGAACAACAAAACCTCAGT-3' 5'-TCCACTGACTTGCTCCCATG-3'

7.1.2.9 Dosage des hormones stéroïdiennes

Le dosage de l'aldostérone et de la corticostérone a été réalisé sur les plasmas des souris par spectrométrie de masse dans le laboratoire Attoquant Diagnostic Gmbh.

7.1.2.10 *Implantation d'une fenêtre d'imagerie abdominale*

1. Préparation de la fenêtre d'imagerie abdominale (AIW)

Une fine couche de colle à verre à base de cyanoacrylate est appliquée sur la bague supérieure en titane de l'AIW, de sorte que toute la surface qui sera en contact avec la lamelle soit couvert. Une lamelle de verre de 12 mm est placée sur l'anneau en titane recouvert de colle à l'aide d'une pince, et puis on applique une légère pression pendant 1 min à l'aide d'un coton-tige. On Laisse sécher la colle pendant 1 h. l'AIW est stérilisé par incubation dans une solution d'Acryl pendant 30 min.

2. Préparation à la chirurgie

Vingt minutes avant la chirurgie est injecté en sous-cutané un mélange de méloxicam 5mg/kg (Métacam solution de 5 mg/mL) et de buprénorphine 0,1mg/kg (Buprécare solution de 0,3 mg/mL) en injection SC unique. Pour le post-opératoire, une injection sous-cutanée de meloxicam matin et soir pendant 3 jours est réalisée. Pour la chirurgie, la souris est anesthésiée avec un mélange isoflurane – oxygène (induction 4 % et maintien à 1,5%) qui est délivré par un masque nasal. Une fois que la souris ne répond plus à la compression des pattes le flanc gauche sera préparé par rasage et désinfection à la Vétadine. Du gel ophtalmique (Lubrithal) sera appliqué pour prévenir les sécheresses oculaires pendant la chirurgie.

3. Implantation chirurgicale AIW

L'animal est placé sur le côté, sur une table d'opération avec une plaque chauffante. La peau est incisée sur 1 cm parallèlement à la colonne vertébrale, juste en dessous de la dernière côte et au-dessus du muscle dorsal. Les ciseaux à bout rond sont glissés entre les fibres musculaires. De la lidocaïne 2% diluée au ¼ sera mise sur les muscles du site chirurgical pour fournir un traitement anesthésique local. A l'aide de système d'écarteur magnétique (Fine science tools) la surrénale est dégagée. Elle est ensuite tirée à l'aide de pinces fines par sa partie graisseuse permettant ainsi de la positionner. La surrénale est prise par le dessous avec une pince fine et soulevée, Ensuite, on utilise une pointe de cône pour appliquer avec précision une bonne goutte de glue Histoacryl (Bbraun) et on positionne la

fenêtre. La colle va s'étaler. On appuie sur la fenêtre pendant environ 5 min afin qu'elle colle bien à la surrénale. Après avoir glissé le muscle dans la fente de la fenêtre, il est recousu en surjet avec du proléne 7/0 non résorbable puis la peau avec du proléne 7/0 non résorbable. Du sérum physiologique 0,9 % injectable à 37°C est injecté juste après la chirurgie en sous cutanée à raison de 1ml /100 g. La souris est placée dans une cage séparée sur un tapis chauffant jusqu'à son réveil complet puis est remise avec ses congénères.

7.1.2.11 *Statistiques*

Les données sont indiquées en moyenne ± SEM. La significativité statistique a été évaluée entre les groupes au moyen de t-test non apparié ou de test de Mann-Whitney (Prism, GraphPad Sofware, USA) ; des test d'ANOVA ou Kruskall Wallis ont été utilisée par les comparaisons de 3 conditions ou plus, suivis par un test de Sidak ou de Dunn pour des comparaisons multiples. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

7.1.3 Résultats

7.1.3.1 Caractérisation des souris CYP11B2-Cre

Dans notre modèle de souris la recombinase Cre a été insérée en aval du codon stop de *Cyp11b2* dans la région 3' non traduite du gène après une cassette IRES (internal ribosomal entry site). Afin de vérifier la spécificité du modèle et le maintien de la production d'aldostérone chez les souris homozygotes et hétérozygotes, j'ai tout d'abord caractérisé ce modèle en vérifiant l'expression spécifique de la Cre dans la ZG de la surrénale mais en analysant également d'autres tissus comme le cerveau, le cœur, les reins, l'aorte, les vaisseaux mésentériques, le tissu adipeux viscéral et sous-cutané. Pour cela, j'ai croisé les souris Cyp11b2_Cre^{Ad} avec des souris rapportrice mTmG, chez lesquelles l'activation de la Cre recombinase induit l'expression de la GFP sur un fond Tomato. Ces analyses ont confirmé l'absence de fuite du système, l'expression de la Cre (présence de cellules GFP^{+}) étant retrouvé uniquement dans le cortex surrénalien ; aucune expression de la Cre et donc de *Cyp11b2* n'a été identifiée en dehors de la surrénale (Figure 31- A). La quantification des cellules GFP^{+} chez des souris âgées de 8 semaines n'a montré aucune différence d'efficacité de recombinaison entre les souris homozygotes et hétérozygotes pour la Cre (Figure 31-B). L'analyse de la production d'aldostérone et de corticostérone dans les plasmas des souris wild-type, homozygotes et hétérozygotes montre également que le modèle maintien une biosynthèse d'aldostérone normale pour les trois groupes ; de façon similaire, la production de corticostérone ne varie pas avec l'insertion de la Cre (Figure 31-C).

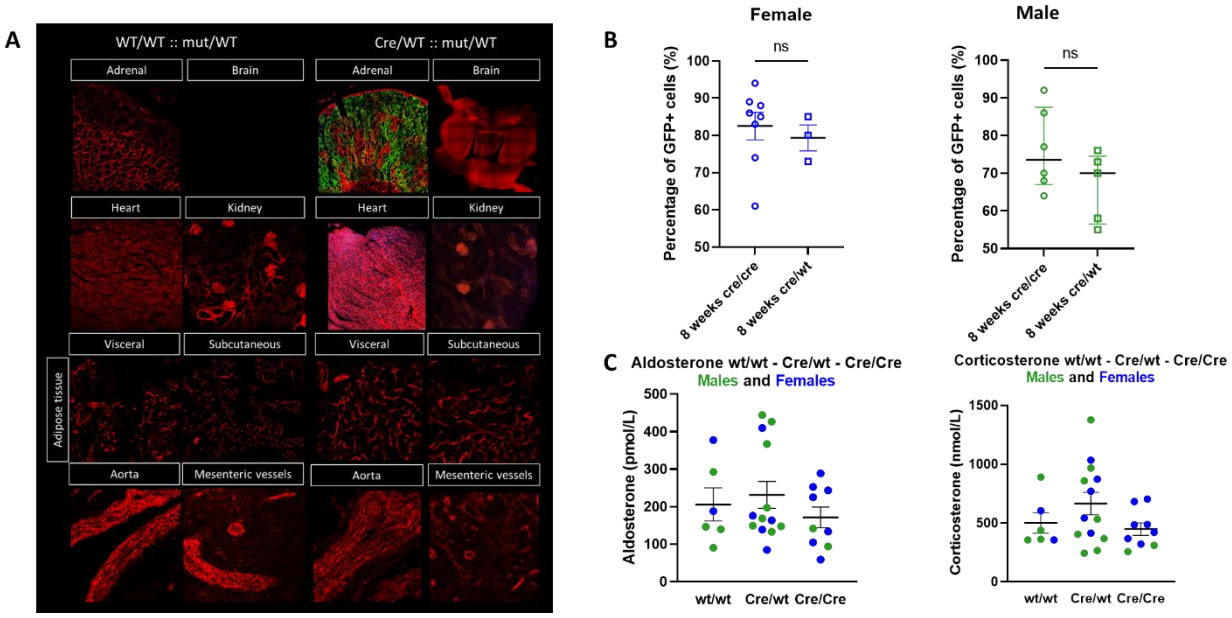


Figure 31. Caractérisation des souris CYP11B2-Cre::mTmG. A. Expression de la GFP (vert) chez les souris âgées de 5 semaines wild type pour la Cre (WT/WT::mut/WT) et hétérozygote pour la Cre (Cre/WT::mut/WT). Les organes analysés sont la surrénale, le cerveau, les reins, le cœur, le tissu adipeux viscéral et sous cutanés, l'aorte et les vaisseaux mésentériques. Les images ont été acquises en microscopie confocale. **B**. Quantification des cellules GFP+ chez des souris mâles et femelles homozygotes et hétérozygotes pour la Cre âgées de 8 semaines. **C**. Dosage de l'aldostérone et de la corticostérone plasmatique par spectrométrie de masse chez 3 à 8 souris wt, homozygotes et hétérozygotes pour la Cre agées de 5 semaines. Grossissement x20. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un Multiple comparison Anova test ou un t-test.

7.1.3.2 Lignage cellulaire du cortex surrénalien

J'ai ensuite utilisé le modèle Cyp11b2-Cre::mTmG pour suivre le développement du cortex surrénalien et notamment la transdifférenciation des cellules de la ZG vers la zone fasciculée (ZF) et la zone-X (ZX) chez des souris mâles et femelles âgées de 1 jour, 2, 5, 8 et 12 semaines. Dès le jour 1, quelques cellules GFP^+ sont présentes dans la ZG et en quelques jours, toutes les cellules de la ZG expriment la GFP. Progressivement, ces cellules GFP^+ migrent d'une façon asynchrone pour coloniser toute la ZF. De façon remarquable, la migration est plus rapide chez les femelles que chez les mâles à 2 semaines, ce qui confirme le dimorphisme sexuel de la surrénale mais ce dimorphisme n'est plus observable à partir de 5 semaines (Figure 32-A). À tous les âges, le poids des glandes surrénales des souris femelles était plus élevé que celles de leurs homologues mâles, avec un maximum à la 8ème semaine (Figure 32- B)

Chez les souris mâles et femelles, le poids des glandes surrénales augment régulièrement jusqu'à l'âge de 6 semaines. Le poids des glandes surrénales des souris femelles reste ensuite inchangé jusqu'à la semaine 12, alors que chez les souris mâles, le poids des surrénales diminue entre les semaines 6 et 8. Entre 5 et 12 semaines, j'ai quantifié le pourcentage de cellules positives pour la GFP dans le cortex surrénalien. Le pourcentage de cellules GFP^+ ne varie pas avec l'âge des souris, indiquant que la transdifférentiation des cellules de la ZG vers la ZF ne varie pas. Elle est presque complète chez les

femelles à 8 semaines avec une tendance à diminuer à 12 semaines, tandis que chez les mâles, elle continue jusqu'à 12 semaines (Figure 32-C).

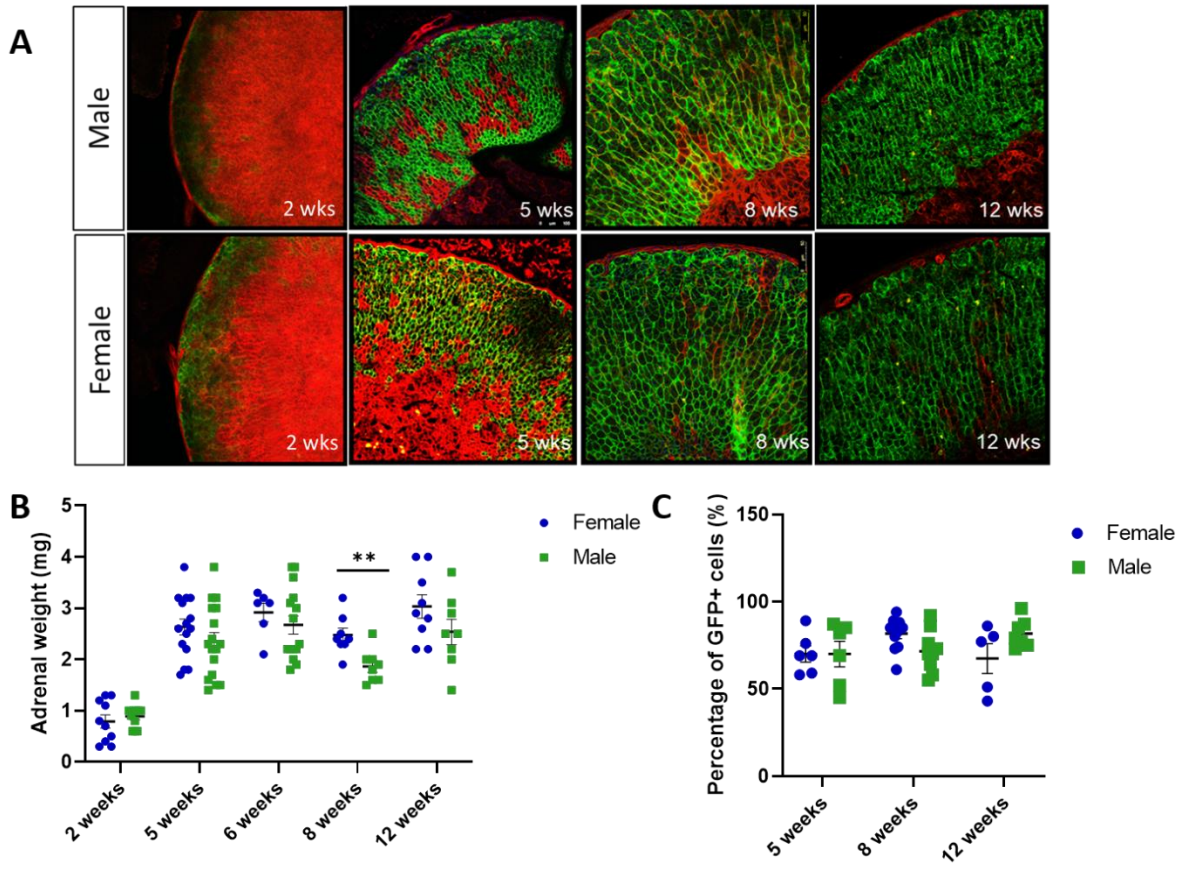


Figure 32. Lignage cellulaire du cortex surrénalien des souris CYP11B2-Cre::mTmG. A. Suivi du lignage cellulaire chez les souris mâles et femelles âgées de 2, 5,8 et 12 semaines. A. Images de surrénales prises en microscopie confocale B. Taille des surrénales mâles et femelles entre 2 et 12 semaines (n entre 8 et 16). C. Quantification du pourcentage des cellules GFP^{+} dans le cortex surrénalien de 5 à 10 souris mâles et femelles âgées de 5,8 et 12 semaines. Le nombre des cellules exprimant la GFP dans le cortex a été déterminé à l'aide d'une plateforme d'imagerie moléculaire automatisée (Vectra, Perkin Elmer). Grossissement x20. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un Multiple comparison Anova test. **p<0.01.

Les analyses de l'expression des gènes de la stéroïdogenèse *cyp11b1* et *cyp11b2* par RT-qPCR ont montré que l'expression de ces gènes ne varie pas entre 5 et 12 semaines chez les femelles tandis que chez les mâles, l'expression de *cyp11b1* augmente jusqu'à 8 semaines (Figure 33).

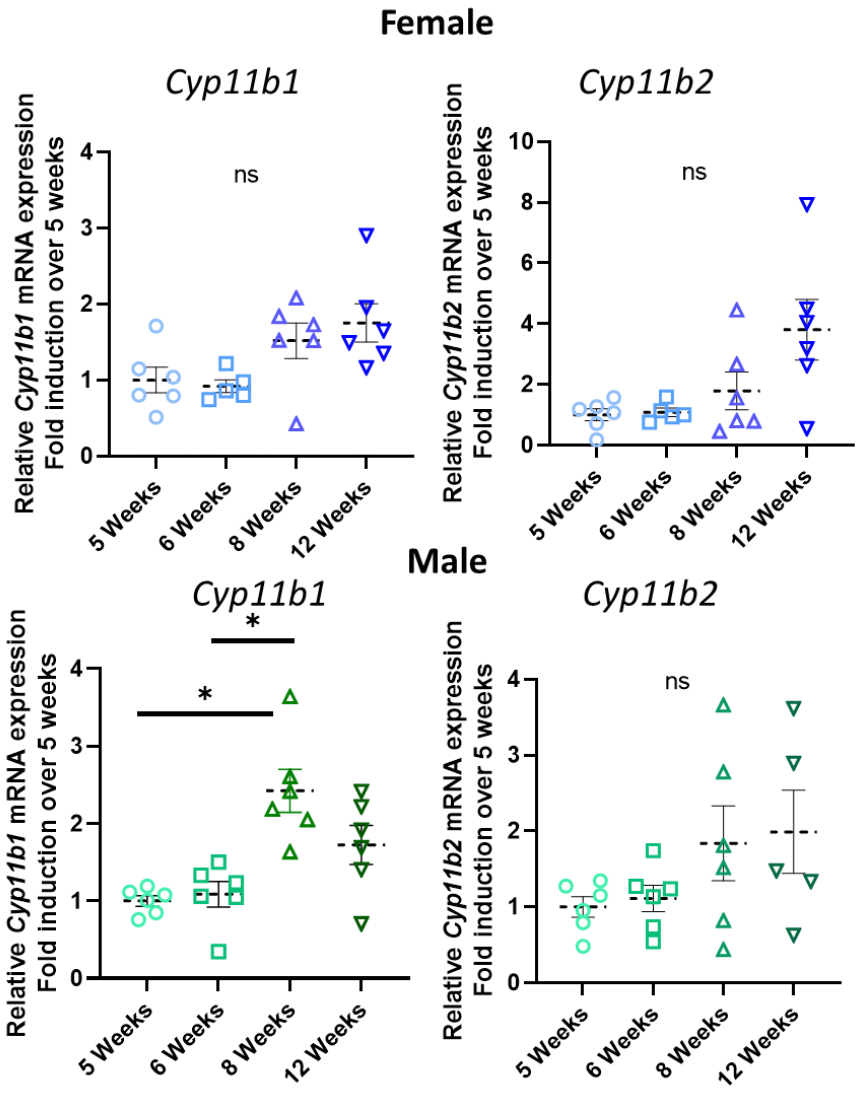


Figure 33. Expression des gènes de la stéroïdogenèse (*cyp11B1* et *cyp11b2*) chez les souris femelles et mâles âgées entre 5 et 12 semaines. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un Multiple comparison Anova test. N compris entre 5 et 6 pour chaque groupe. *p<0.05

7.1.3.3 La signalisation Wnt/β-caténine entre 5 et 12 semaines

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le lignage et l'évolution de la surrénale avec le temps, nous avons étudié l'expression, par RT-qPCR, des composantes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (*Wnt4*, *Lef1*, *Axin2*), qui est un régulateur clé du maintien et de la fonction de la ZG. Un dimorphisme sexuel est observé dans l'expression de ces gènes entre 5 et 12 semaines. Chez les femelles, entre 6 et 8 semaines, on observe une augmentation de l'expression d'*Axin2*, un gène cible de la voie canonique Wnt/β-caténine, alors que l'expression de *Wnt4* et *Lef1*, des effecteurs et des cibles de la signalisation Wnt non canonique, ne montre qu'une tendance à l'augmentation non significative. Par contre, entre 8 et 12 semaines, l'expression de *Lef1* diminue significativement, alors que l'on observe une tendance non significative à la diminution de *Wnt4* et d'*Axin*2 durant cette même période pour revenir à des valeurs comparables à celles observées à 5 semaines. Chez les mâles, une augmentation significative de l'expression de ces 3 gènes est observée entre 5 et 8 semaines (Figure 34).

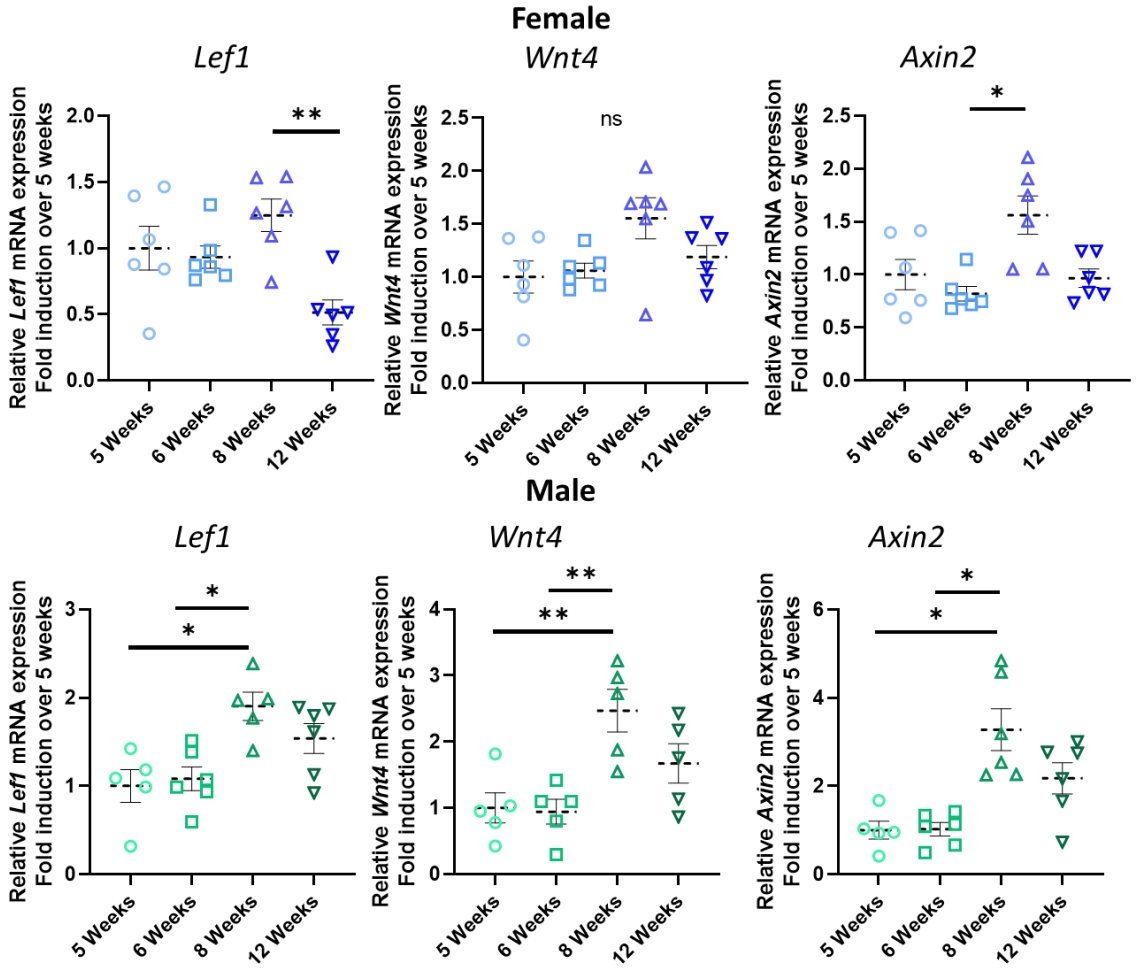


Figure 34. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant Multiple comparison Anova test. N compris entre 5 et 6 par groupe. *p<0.05 **p<0.01.

7.1.3.4 La vascularisation entre 5 et 12 semaines

Pour étudier les changements de l'organisation de la vascularisation avec l'âge, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents de la podocalyxine, un marqueur des cellules endothéliales. On observe que Les artérioles corticales qui naissent directement de la capsule forment un réseau anastomotique autour des cellules de la zone glomérulée, puis se poursuivent sous forme de capillaires centripètes entre les colonnes de cellules fasciculées (Figure 35-A), confirmant que l'architecture vasculaire est similaire à l'architecture surrénalienne. De plus l'analyse par qPCR de l'expression de *Vegfa* et de ses récepteurs Vegfr1 codé par *Flt1* et Vegfr2 codé par *Kdr* montre une augmentation de l'expression uniquement des récepteurs *Flt1* et *Kdr* entre 5 et 8 semaines chez les souris mâles et femelles, tandis que l'expression de *Vegfa* ne varie pas avec l'âge chez les deux sexes. D'une manière intéressante, l'expression de *Fn1* qui code pour la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire et qui joue un rôle important dans la vasculogenèse et l'angiogenèse dans les organes en développement et les tumeurs, diminue entre 5 et 12 semaines chez les femelles et entre 6 et 12 semaines chez les mâles (Figure 35-B,C).

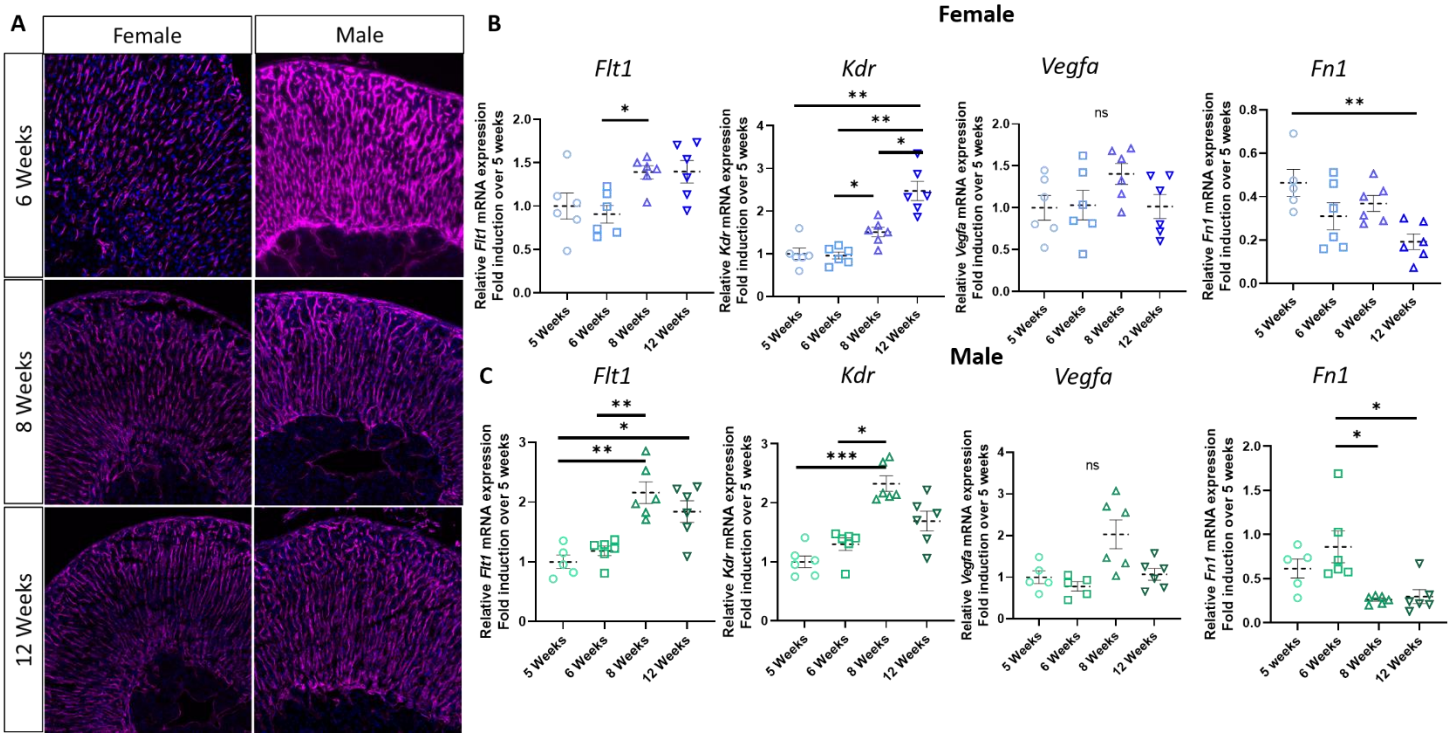


Figure 35. Expression des gènes de la vascularisation dans la surrénale des souris mâles et femelles âgées entre 5 et 12 semaines. A. Immunofluerescence de la podocalyxine (marqueur des cellules endothéliales) pour visualiser les vaisseaux dans le cortex surrénalien entre 6 et 12 semaines. B. Expression par RT-qPCR des gènes de la vascularisation (*flt1, kdr, vegfa, fn1*) chez les souris femelles entre 5 et 12 semaines. C. Expression par RT-qPCR des gènes de la vascularisation (*flt1, kdr, vegfa, fn1*) chez les souris males entre 5 et 12 semaines. Grossissement x20. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant Multiple comparison Anova test. N compris entre 5 et 6 par groupe. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001

7.1.3.5 Plasticité et dynamique du cortex surrénalien

Le cortex de la surrénale est un organe extrêmement plastique, capable de s'adapter à de nombreuses situations physiopathologiques avec un remodelage de ses zones fonctionnelles. Ainsi, il évolue de façon majeure à la puberté chez le mâle et à la première gestation chez la femelle, avec la régression de la zone la plus interne, la zone X. De façon similaire, le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes exogènes sur la sécrétion d'ACTH conduit à une régression importante de la zone fasciculée, alors qu'un régime pauvre en sel stimulera, via le système rénine angiotensine, l'expansion de la zone glomérulée. Toutes ces modifications s'accompagnent de modifications parallèles de la vascularisation. Afin d'identifier les mécanismes responsables de la plasticité du cortex surrénalien et d'explorer l'influence hormonale sur la dynamique de l'interaction cellule endocrine-vaisseaux, j'ai mis au point différents protocoles expérimentaux chez la souris, visant à étudier l'impact de différents traitements sur le développement, le renouvellement et la transdifférenciation des cellules du cortex surrénalien, ainsi que d'évaluer l'influence hormonale sur la dynamique de l'interaction cellule endocrine-vaisseaux dans ces processus. Ainsi j'ai caractérisé deux modèles d'études : l'effet d'un traitement à la dexaméthasone et celui d'un régime riche ou pauvre en sel.

7.1.3.5.1 Remodelage surrénalien sous traitement à la dexaméthasone

Des souris âgées de 4 semaines ont été traitées pendant 2 semaines avec de la dexaméthasone 1mg/ml (phase de suppression) suivi d'une phase de régénération de 3 semaines où l'apport en dexaméthasone est supprimé. L'analyse de la structure et de la fonction des surrénales de souris mâles et femelles a montré une désorganisation de toute la ZF chez les souris Cyp11b2-Cre::mTmG (Figure 34-A). Au cours de la phase de suppression on peut observer une réduction de la taille de la surrénale mais cette réduction est significative uniquement chez les mâles (Figure 36-B). De plus, on observe une réduction marquée de la taille de la ZF, une inhibition de l'expression du *Cyp11b1* et une diminution de l'expression du *Cyp11b2* détectées par RNAscope (Figure 36-A) ; ces modifications se traduisent par une forte inhibition de la production de la corticostérone plasmatique, et une diminution de la production d'aldostérone mesurée par spectrométrie de masse (Figure 36-C).

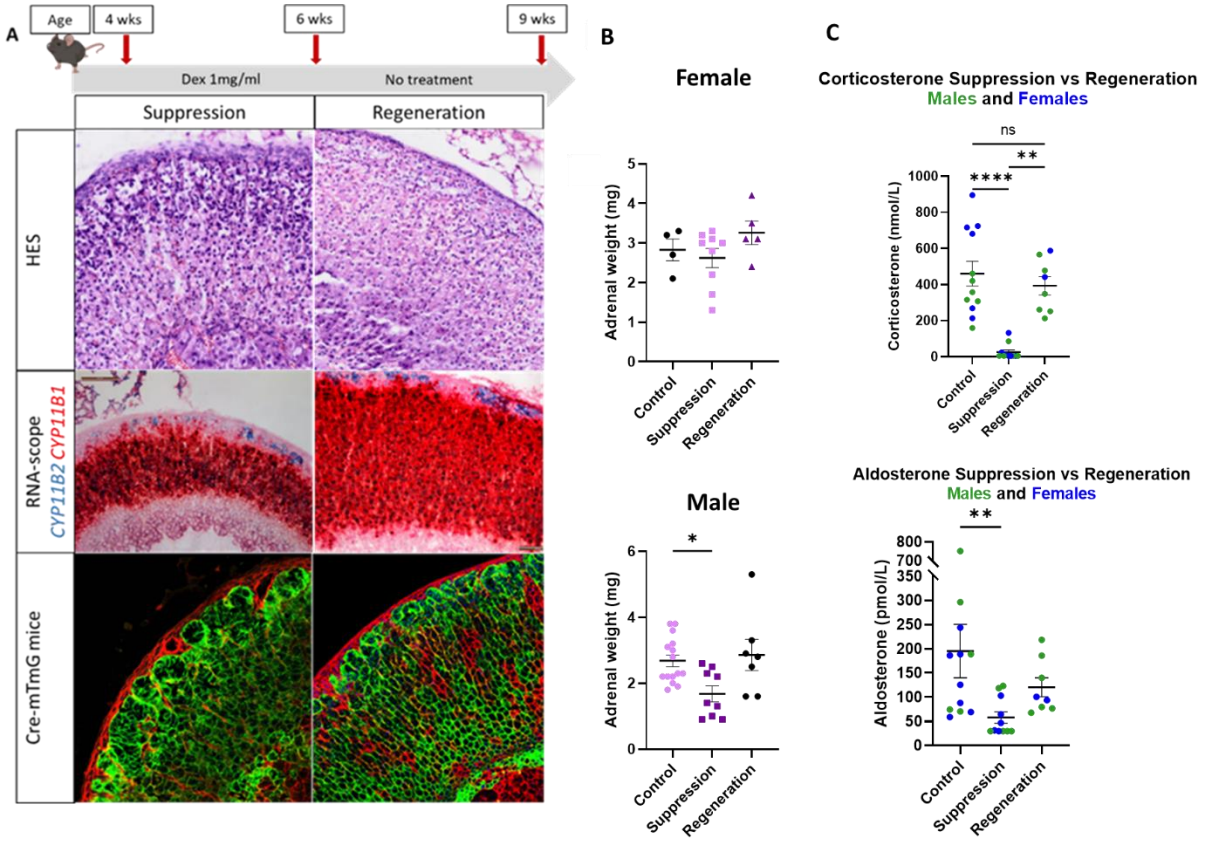


Figure 36. Plasticité et dynamique du cortex surrénalien. Etude de l'effet de l'apport de la dexaméthasone pendant 2 semaines (suppression) et de l'arrêt de traitement pendant 3 semaines (régénération). **A.** Analyse histologique des surrénales des souris femelles pendant la suppression et la régénération : HES sur les surrénales coupées en cryostats des souris pendant la suppression et la régénération, RNAscope de *cyp11b1* (rouge) et *cyp11b2* (Bleu), analyse de l'organisation du cortex des souris Cre-mTmG par microscopie confocale. **B.** Mesure de la taille des surrénales gauches chez les souris mâles et femelles sous suppression et régénération **C.** Dosage de la corticostérone et de l'aldostérone plasmatique mesurée par spectrométrie de masse chez les souris contrôles, après 2 semaines de Dex (Suppression) et pendant la régénération. Grossissement x20. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; les valeurs p ont été calculées à l'aide de t-test et de one way anova test. *p<0,05 **p<0,01 **** p<0,0001.

7.1.3.5.2 Stéroïdogenèse sous traitement à la dexaméthasone

Nous avons mesuré l'expression des gènes *Cyp11b1* et *Cyp11b2* chez les souris mâles et femelles pendant la phase de suppression et la phase de régénération. D'une manière similaire aux mesures de la corticostérone plasmatique, le niveau d'ARNm de *Cyp11b1* diminue chez les femelles significativement pendant la phase de suppression en comparaison avec les contrôles et ce niveau est rétabli après régénération (Figure 37). La diminution de l'expression de *Cyp11b1* n'est pas significative chez les mâles en comparaison aux contrôles, mais on observe une augmentation significative après la phase de régénération. De façon surprenante, l'expression de *Cyp11b2* augmente de façon significative pendant la phase de suppression et reste à un niveau élevé après la phase de régénération chez les mâles et les femelles, alors que les concentrations d'aldostérone plasmatique sont diminuées pendant

la phase de suppression et reste basses après la phase de régénération. Cette décorrélation entre les concentrations plasmatiques d'aldostérone et l'expression de Cyp11b2 pourrait être due à une forte diminution des précurseurs de la biosynthèse de corticostérone et d'aldostérone due au rétrocontrôle exercé par l'ACTH, bloquant la biosynthèse d'aldostérone malgré la mise en place de mécanismes compensateurs et l'augmentation de l'expression de *Cyp11b2*.

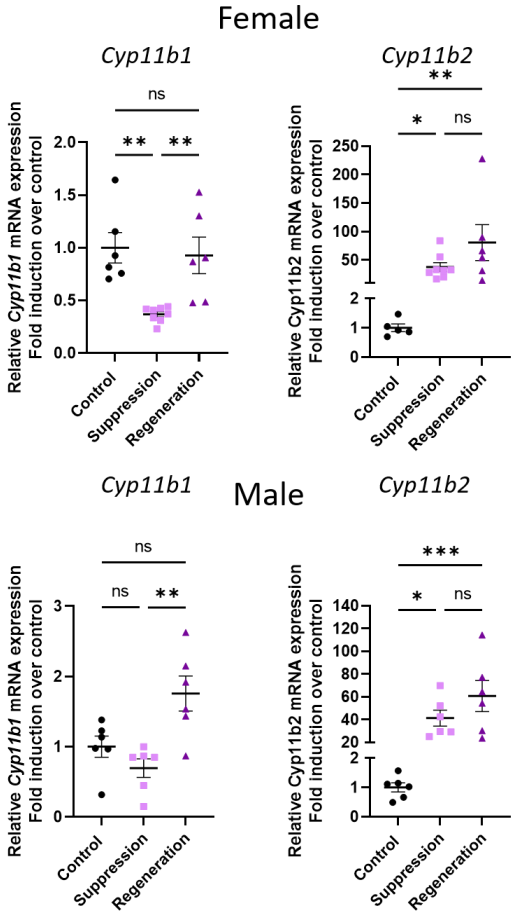


Figure 37. Expression des gènes de la stéroidogenèse (CYP11B1 et cyp11b2) chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; les valeurs p ont été calculées à l'aide d'un test Anova suivi d'un test Sidak. N compris entre 6 et 8 par groupe. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

7.1.3.5.3 La voie de la signalisation Wnt/β-caténine sous traitement à la dexaméthasone

Pour mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans la dynamique d'adaptation de la corticosurrénale, on a examiné l'expression des composantes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine. Ces analyses montrent qu'uniquement chez les mâles, l'expression de *Wnt4* (ligand impliqué dans la signalisation Wnt non canonique, et des gènes cibles de la voie canonique *Axin 2* et *Lef1*

augmente pendant la phase de suppression mais que ces expressions ne reviennent pas à la normale pendant la phase de régénération.

Chez les femelles, on observe une augmentation de l'expression de *Wnt4* et de *Tcf3*, qui est un facteur de transcription qui peut agir comme répresseur transcriptionnel indépendamment de la liaison de la β-caténine, pendant la suppression. Le niveau d'expression d'ARNm de *Tcf3* revient à la normale pendant la phase de régénération (Figure 38).

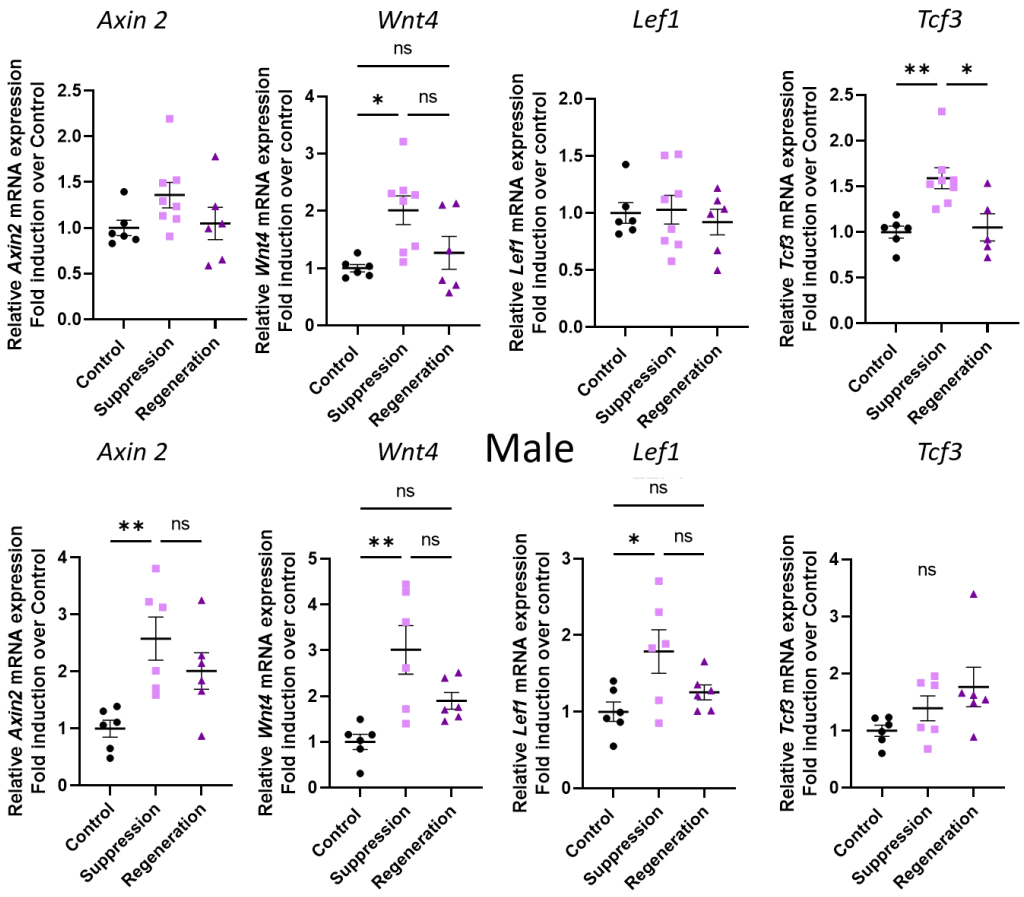


Figure 38. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks). Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant d'un test Anova suivi d'un test Sidak. N compris entre 6 et 8 par groupe**.** *p<0.05 **p<0.01.

7.1.3.5.4 L’apoptose sous traitement à la dexaméthasone

L'apoptose est essentiellement médiée par une famille de protéases à cystéine, appelées caspases, qui peuvent être regroupées en caspases initiatrices et caspases effectrices. Les caspases initiatrices, telles que la caspase-8 ou la caspase-9, exercent des rôles régulateurs en activant les caspases effectrices en aval, telles que la caspase-3, la caspase-6 ou la caspase-7, qui clivent divers substrats cellulaires. La caspase-3 est considérée comme une enzyme exécutrice car elle peut être activée par plusieurs autres caspases actives, et parce qu'elle présente une spécificité catalytique pour un nombre pertinent de substrats cellulaires critiques. En fait, la présence de cellules positives pour la caspase-3 active est considérée comme un signe distinctif de l'activation de l'apoptose (Thornberry 1998; Krajewska et al. 1997).

En plus de la caspase 3, p53 et Bcl-2 jouent aussi un rôle régulateur fondamental dans l'apoptose. Bcl-2 est un membre d'une famille de protéines anti-apoptotiques qui peuvent prévenir ou réduire la mort cellulaire. La voie de mort intrinsèque est initiée par la libération mitochondriale de cytochrome c, un processus qui est inhibé par la protéine anti-apoptotique Bcl-2. À l'inverse, p53 est le produit protéique d'un gène suppresseur de tumeur, et l'expression de p53 peut induire l'apoptose. Cette protéine induit l'apoptose dans les cellules hautement différenciées (Vaux, Cory, and Adams 1988; Lane et al. 1994).

Les résultats des qPCR que nous avons réalisé ont montré que le niveau d'expression de l'ARNm de la caspase-3 était significativement plus élevé chez les souris mâles et femelles pendant la période de traitement à la dexaméthasone (suppression) en comparaison avec le groupe control et revient au niveau basal après l’arrêt du traitement (Figure 39). Des résultats différents sont obtenus pour l'expression de l'ARNm de *Bcl2* et de *P53*. D’une manière intéressante, alors que le niveau d’ARNm de *Bcl2* augmente pendant la phase de suppression et reste élevé après l’arrêt du traitement (régénération) chez les souris mâles et femelles, l’expression de *P53* suit le pattern d’expression de *Bcl2*, augmentant pendant la phase de suppression et restant élevé, uniquement chez les souris mâles ; chez les souris femelles cette expression est augmentée uniquement pendant la phase de suppression (Figure 39).

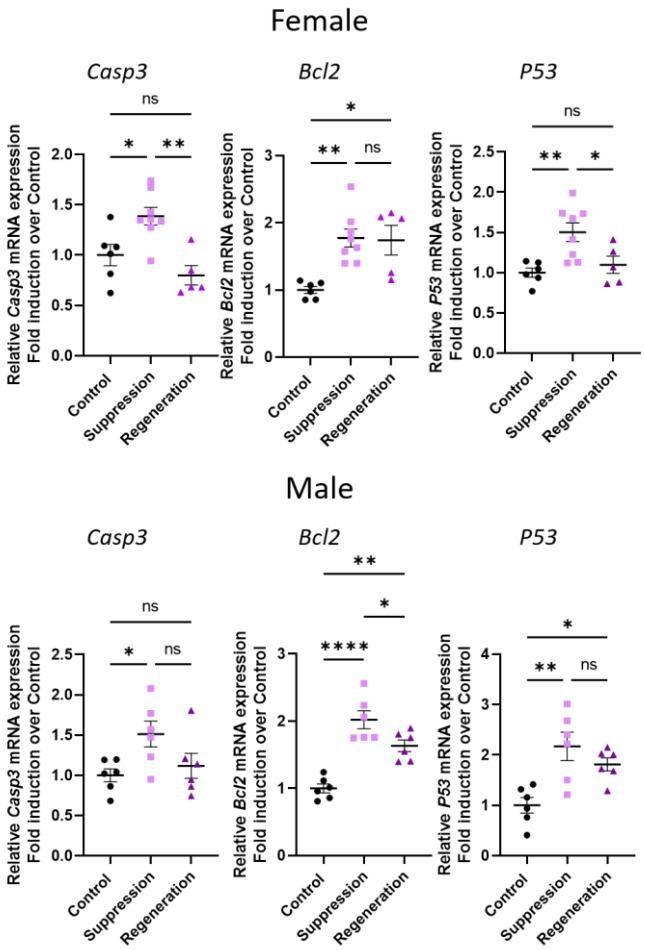


Figure 39. Expression de gènes de l'apoptose par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks). Casp3 code pour caspase 3, Bcl2 code pour BCL2 (BCL2 Apoptosis Regulator) et P53 code pour P53. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un one way anova test. N compris entre 6 et 8 par groupe. *p<0.05 **p<0.01 **** p<0,0001.

7.1.3.5.5 Vascularisation sous traitement à la dexaméthasone

Afin d'étudier les modifications vasculaires en parallèle des modification structurales et fonctionnelles de la corticosurrénale, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans la vascularisation : le facteur angiogénique *Vegfa* et ses récepteurs *Flt1* et *Kdr* ainsi que la protéine de la matrice extracellulaire fibronectine codée par *Fn1*. L'expression de *Vegfa* diminue d'une manière significative uniquement chez les mâles pendant la suppression et cette expression est rétablie pendant la régénération. Chez les femelles, on observe une tendance à la diminution pendant la suppression mais ces résultats ne sont pas significatifs.

Chez les souris mâles, l'expression du récepteur *Flt1* est également diminué pendant la suppression et rétablie pendant la régénération. Aucune différence n'est observée pour l'expression de *Kdr* et *Fn1* entre les phases de suppression et de régénération chez les souris mâles et femelles (Figure 40). Enfin l'étude du réseau vasculaire par immunofluorescence de la podocalyxine a révélé sa désorganisation et sa raréfaction au cours de la phase de suppression surtout chez les mâles (Figure 35). Alors que chez les femelles la quantification de l'aire vasculaire ne montre pas de différences entre suppression et régénération, l'aire vasculaire est significativement plus importante en phase de régénération qu'en phase de suppression chez les mâles (Figure 41). Après trois semaines d'arrêt de traitement, la régénération de la ZF est complète, l'organisation et la surface vasculaire est rétablie ainsi que la production de corticostérone et d'aldostérone (Figure 36-41).

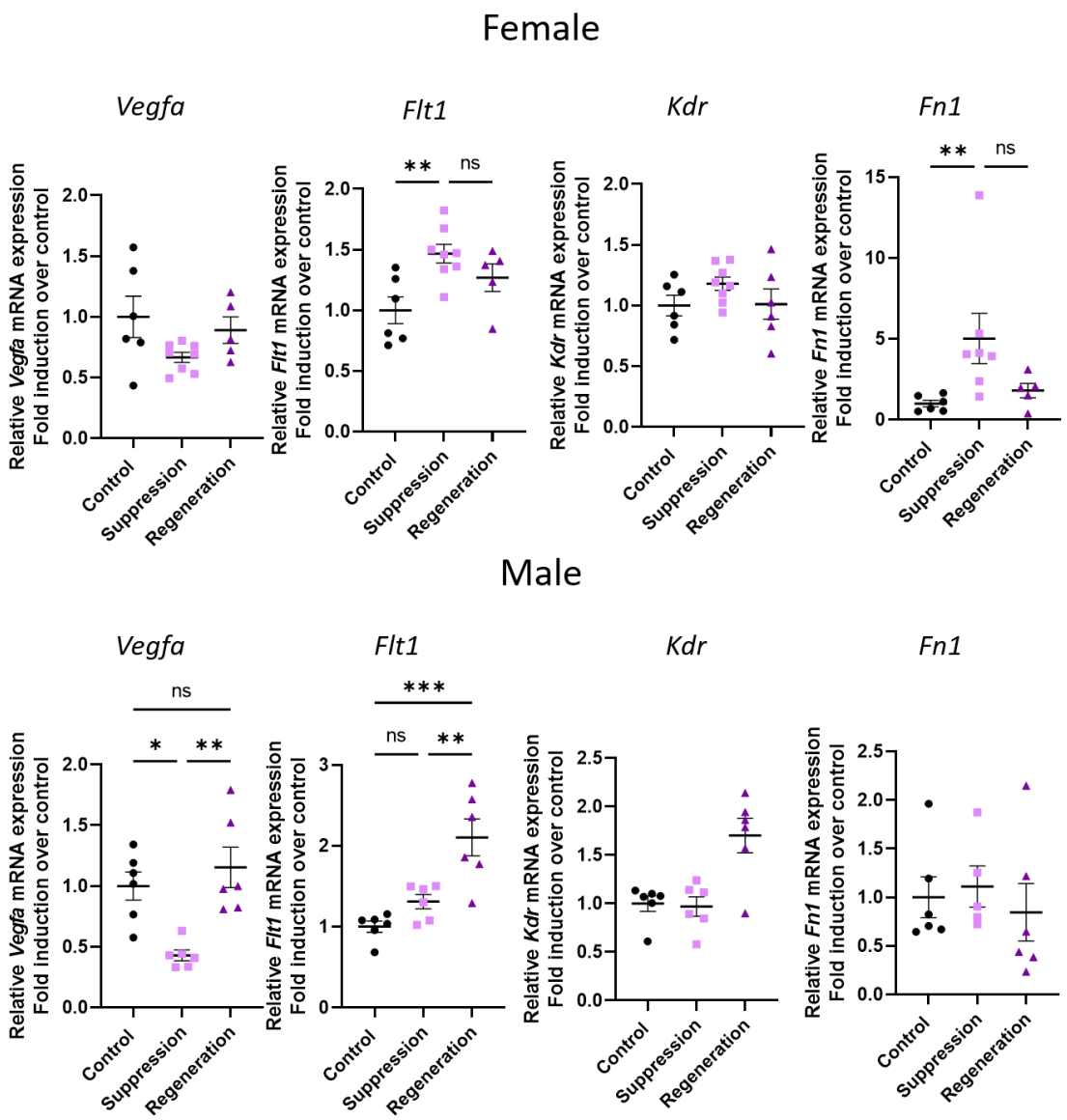


Figure 40. Expression de gènes de la vascularisation par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles contrôles (Age 6 weeks), sous suppression (Age 6 weeks) et après régénération (Age 9 weeks). Expression par RT-qPCR des gènes de la vascularisation (flt1, kdr, vegfa, fn1). Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un one way anova test. N compris entre 6 et 8 par groupe. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

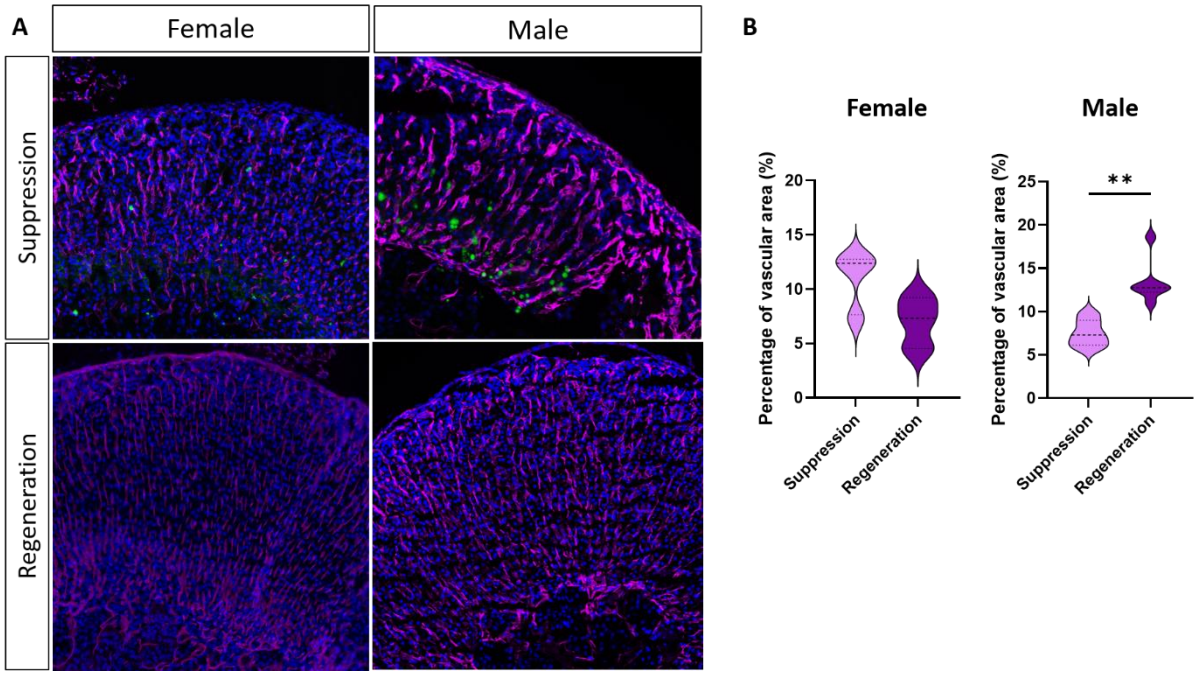


Figure 41. Vascularisation chez les souris mâles et femelles pendant la suppression et la régénération. A. Immunofluorescence des vaisseaux (podocalyxine). **B.** Quantification de la surface vasculaire chez les souris mâles et femelles pendant la suppression et régénération. La surface des vaisseaux dans le cortex a été déterminé à l'aide d'une plateforme d'imagerie moléculaire automatisée (Vectra, Perkin Elmer). Grossissement x20. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; les valeurs p ont été calculées à l'aide d'un t-test. **p<0,01.

7.1.3.6 Remodelage surrénalien en régime pauvre et riche en sel

Afin d'étudier les effets d'une modification du régime sodique sur la zonation surrénale et les interactions cellules endocrines - cellules endothéliales, des souris Cyp11b2-Cre::mTmG âgées de 4 semaines ont été soumises à un régime pauvre en sel (0,05 % de sodium), un régime standard (0,3% de sodium) ou un régime riche en sel (3.2% sodium) pendant 2 semaines. Il a déjà été montré qu'un régime pauvre en sel va stimuler, via le système rénine angiotensine, l'expansion de la zone glomérulée, un effet inverse est provoqué par un régime riche en sel.

L'efficacité des régimes a été confirmée par le dosage de l'aldostérone et de la corticostérone des plasmas des souris (Figure 42-C). La production d'aldostérone augmente de 100 fois sous un régime pauvre en sel et diminue de 40 fois sous un régime riche en sel, tandis que la corticostérone ne varie pas avec la variation de l'apport en sel. La visualisation de l'expression de *Cyp11b1* (en rouge) et de *Cyp11b2* (en bleu), par RNAscope, chez des souris Cyp11b2-Cre::mTmG mâles et femelles confirme cette expansion et cette diminution de l'expression de CYP11B2, responsable de la biosynthèse d'aldostérone (Figure 42-A). De façon remarquable, ces modifications sont moins visibles chez les souris femelles. La mesure de la surface de la ZG en utilisant le marquage Dab2 n'a pas montré de différence significative, très probablement à cause d'une grande variabilité entre les animaux et une interférence avec le signal de la Tomato chez certains des animaux mTmG (Figure 43). Les études de

lignage cellulaire chez ces souris ont montré que les changements de la structure et la fonction de la ZG n'affectent pas la transdifférentiation de ces cellules vers la ZF. La quantification automatique du pourcentage de cellules GFP^{+} dans le cortex surrénalien des souris mâles et femelles ne montre aucune différence entre les régimes (Figure 42).

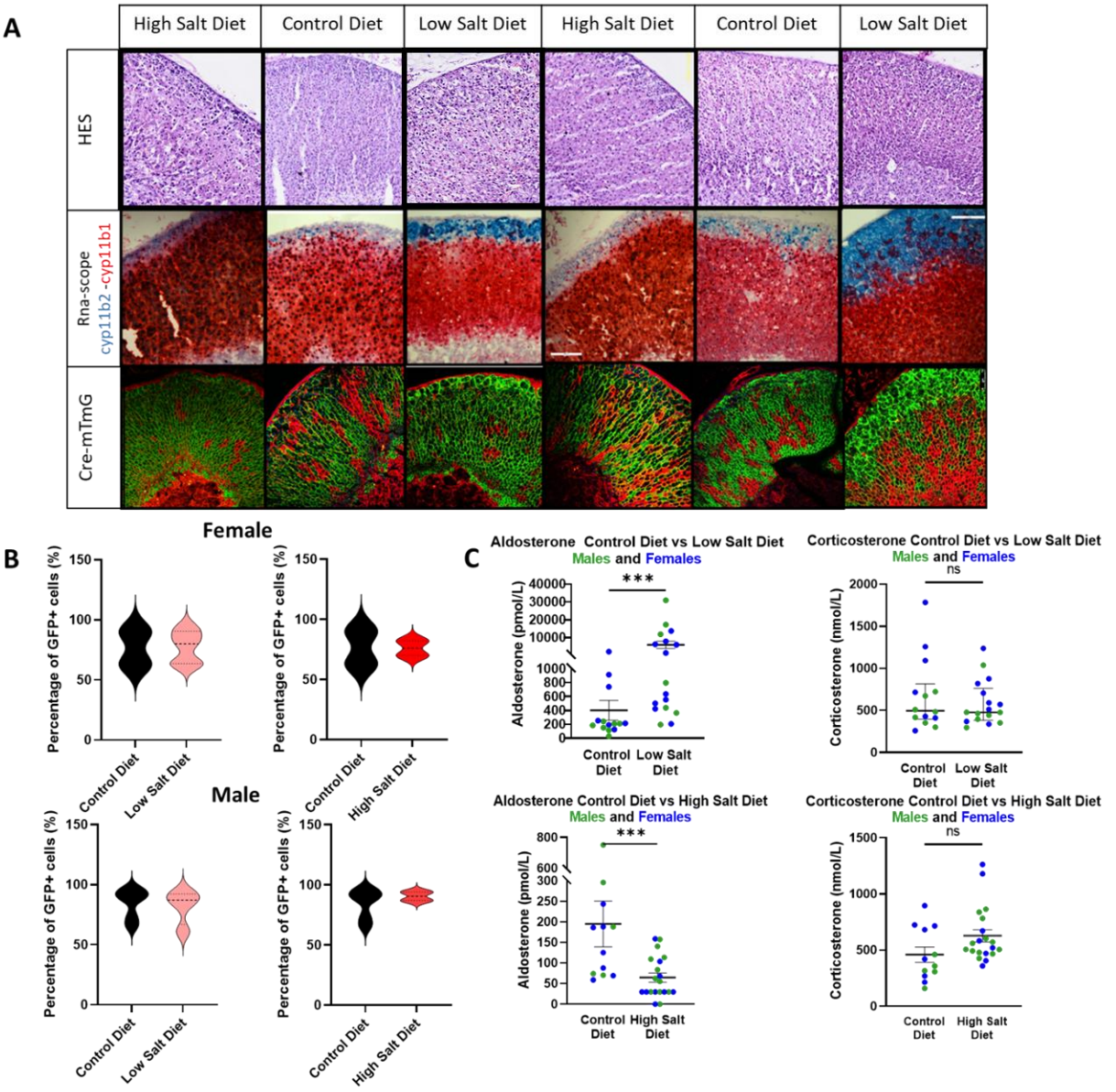


Figure 42. Plasticité et dynamique du cortex surrénalien. Effets des changements de l'apport en sel dans l'alimentation pendant deux semaines sur le cortex surrénalien. A. Analyse histologique des surrénales sous régime riche, control et pauvre en sel. Marquage HES, des expériences de RNAsope contre CYP11B1 (rouge) et CYP11B2 (bleu). Analyse du lignage cellulaire dans le cortex surrénalien des souris sous un régime riche en sel, pauvre en sel et contrôles. **B.** Quantification du pourcentage des cellules GFP+. Le nombre des cellules exprimant la GFP dans le cortex a été déterminé à l'aide d'une plateforme d'imagerie moléculaire automatisée (Vectra, Perkin Elmer). **C.** Dosage de l'aldostérone de la corticostérone plasmatique en spectrométrie de masse des souris en régime pauvre et riche en sel. Grossissement x20. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; les valeurs p ont été calculées à l'aide d'un t-test. ***p<0.001.

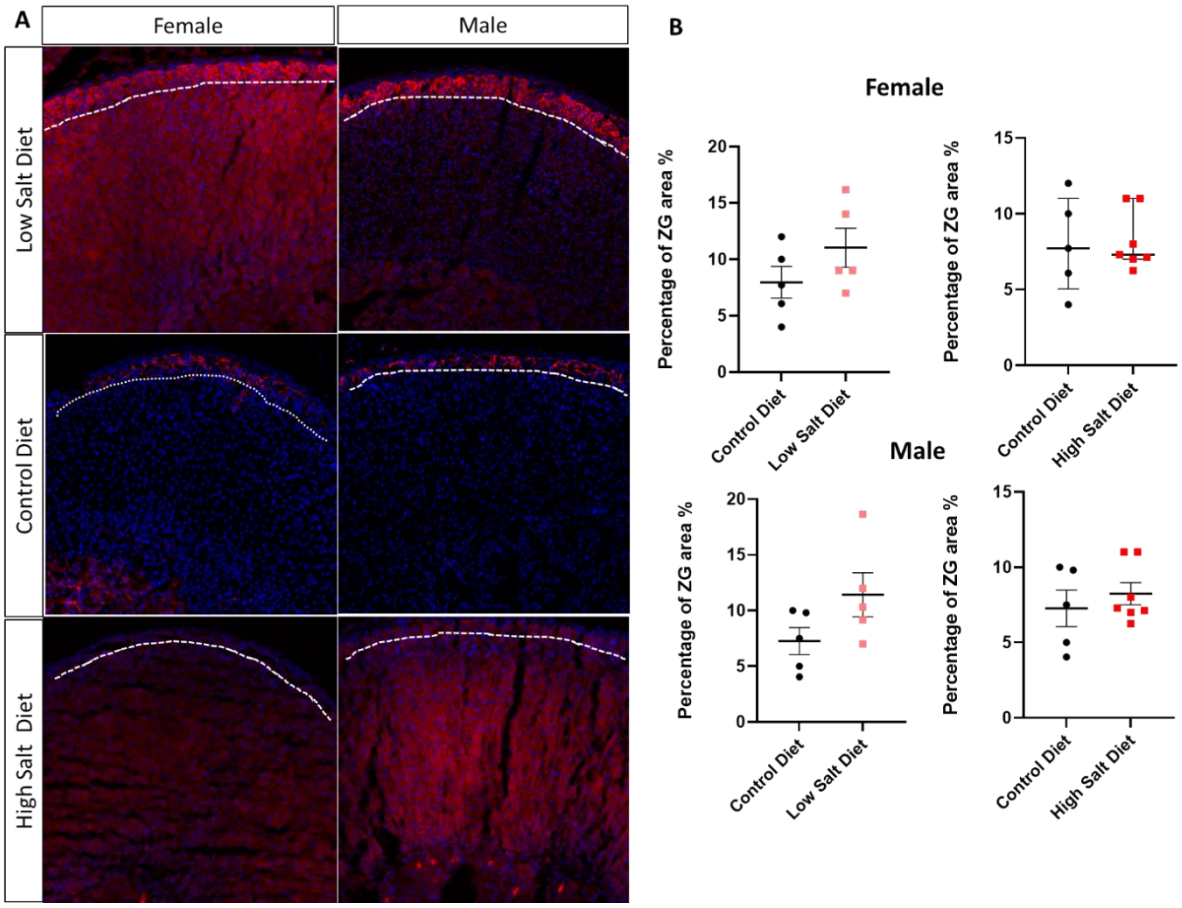


Figure 43. Mesure de la surface de la ZG. Immunofluorescence contre la Dab2, marqueur de la ZG. Mesure de la surface de la ZG en utilisant Dab2 comme marquage en immunofluoerescence. La surface de la ZG dans le cortex a été déterminée à l'aide d'une plateforme d'imagerie moléculaire automatisée (Vectra, Perkin Elmer). Le bruit de fond observé est à cause de la présence de tomato chez les souris. Grossissement x20. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; les valeurs p ont été calculées à l'aide d'un t-test.

7.1.3.6.1 Stéroidogenèse sous les régimes pauvre et riche en sel

Au niveau de l'expression des gènes jouant un rôle dans la biosynthèse d'aldostérone et de corticostérone, on retrouve une augmentation de l'expression de *Cyp11b2* dans les surrénales des animaux sous régime pauvre en sel et une diminution de cette expression chez les animaux sous régime riche en sel significativement chez les souris femelles (Figure 38), alors que l'augmentation de l'expression de *Cyp11b2* n'est pas significative chez les mâles, avec une grande hétérogénéité entre les

animaux. Les résultats de qPCR montrent également une augmentation de l'expression de *Cyp11b1* chez les souris mâles et femelles sous régimes pauvre et riche en sel (Figure 44).

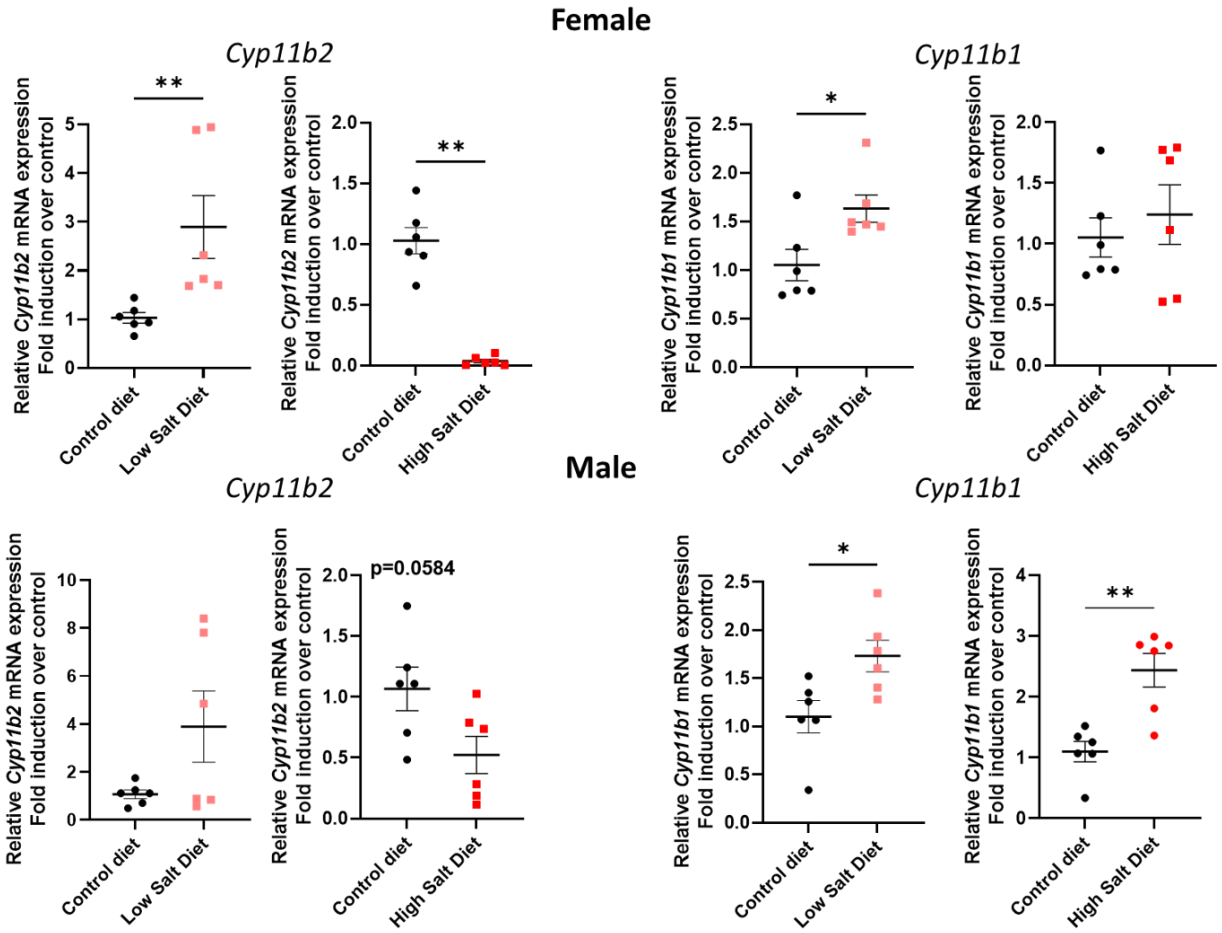


Figure 44. Expression des gènes de la stéroidogenèse (*CYP11B1* et *cyp11b2*) chez les souris mâles et femelles sous régime contrôles, pauvre et riche en sel. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; Les analyses statistiques ont été réalisés sur les valeurs de ΔΔCt. Les valeurs p ont été calculées à l'aide d'un t-test. *p<0,05 **p<0,01.

7.1.3.6.2 La signalisation Wnt/β-caténine sous les régimes pauvre et riche en sel

Pour mieux comprendre les voies de signalisation impliquées dans la dynamique d'adaptation de la corticosurrénale, nous avons examiné l'expression des composants de la voie de signalisation Wnt/β-caténine. Ces analyses ont montré qu'uniquement chez les mâles, l'expression de *Wnt4* augmente sous régime pauvre et riche en sel en comparaison aux souris contrôles (Figure 45-46), l'expression de *Tcf3* augmente uniquement sous un régime riche en sel (Figure 44), enfin l'expression de l'*Axin 2* et de *Lef1* ne varie pas avec la variation de l'apport en sel chez les souris males (Figure 45-46). Chez les souris femelles, l'expression de *Wnt4* et de *Tcf3* est inchangée quel que soit le régime (Figure 45-46) de même que l'expression de l'*Axin2* et de *Lef1* en régime pauvre en sel (Figure 43) alors qu'un régime riche en

sel induit une diminution significative de l'expression de *Lef1* et une tendance à la diminution de l'expression de l'*Axin2*.

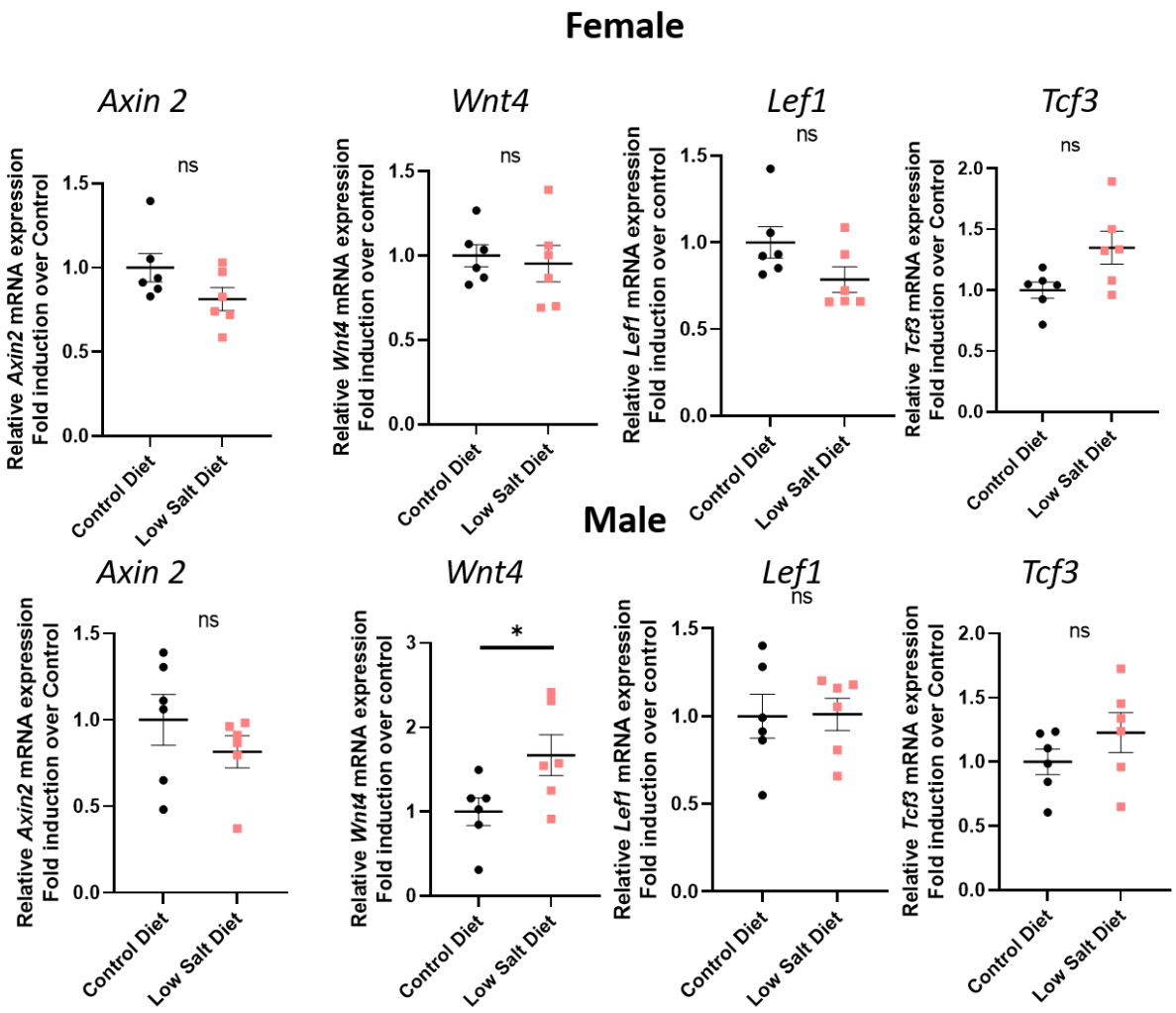


Figure 45. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles sous régimes contrôles, et pauvre en sel. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un t-test. N compris entre 5 et 6 par groupe. *p<0,05

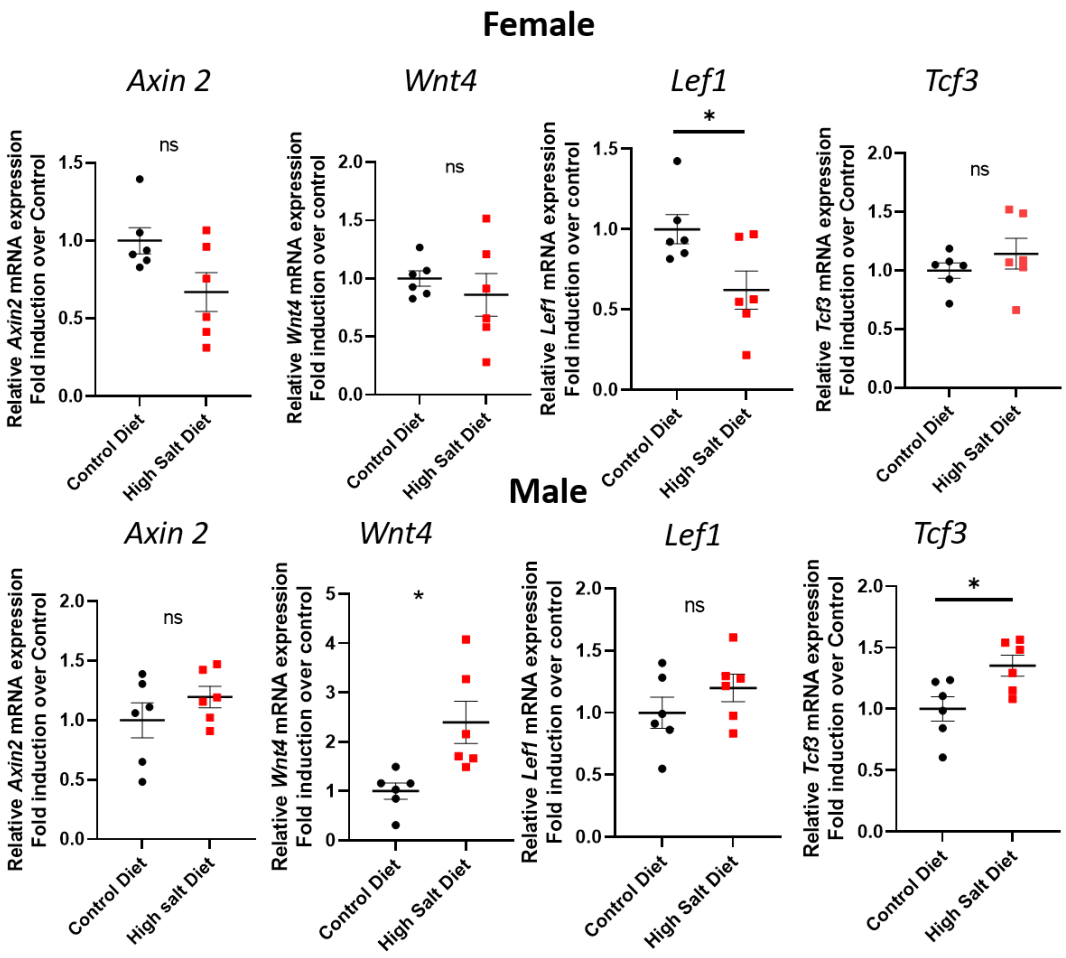


Figure 46. Expression de gènes de la voie de signalisation Wnt/β-caténine par RT-qPCR chez les souris mâles et femelles sous régimes contrôles, et riche en sel. Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant t-test. N compris entre 5 et 6 par groupe. *p<0,05.

7.1.3.6.3 La vascularisation sous les régimes pauvre et riche en sel

Afin d'étudier l'interaction hormonale et vasculaire dans la surrénale, j'ai analysé les changements vasculaires qui accompagnent les changements physiologiques de la surrénale avec la variation de l'apport en sel. Le marquage de la podocalyxine montre que le réseau vasculaire garde son organisation avec les changements de la ZG (Figure 45), tandis que la surface vasculaire augmente chez les femelles sous le régime pauvre en sel et diminue chez les mâles sous le régime riche en sel (Figure 47-B).

Au niveau de l'expression génique du facteur angiogénique *Vegfa* et de ses récepteurs *Flt1* et *Kdr*, on observe une augmentation de l'expression des récepteurs *Flt1* et *Kdr* chez les souris mâles et femelles sous les régimes pauvre (Figure 48) et riche (Figure 49) en sel comparés aux contrôles. D'une manière

intéressante, l'expression de *fn1* diminue uniquement chez les souris mâles sous régime pauvre en sel (Figure 47-49).

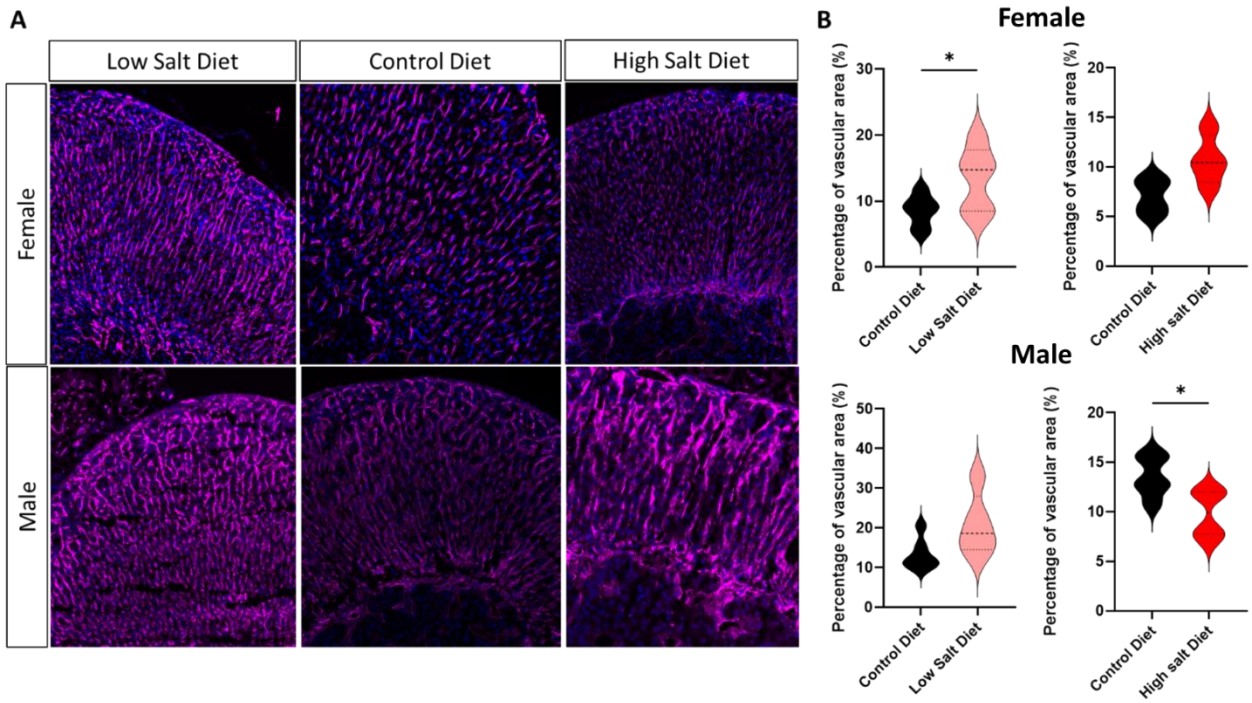


Figure 47. Vascularisation chez les souris mâles et femelles sous les régimes contrôles, pauvre et riche en sel. A. Immunofluorescence des vaisseaux (podocalyxine). **B.** Quantification de la surface vasculaire chez les souris mâles et femelles sous les différents régimes. La surface des vaisseaux dans le cortex a été déterminé à l'aide d'une plateforme d'imagerie moléculaire automatisée (Vectra, Perkin Elmer). Grossissement x20. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± SEM ; les valeurs p ont été calculées à l'aide d'un t-test. *p<0,05.

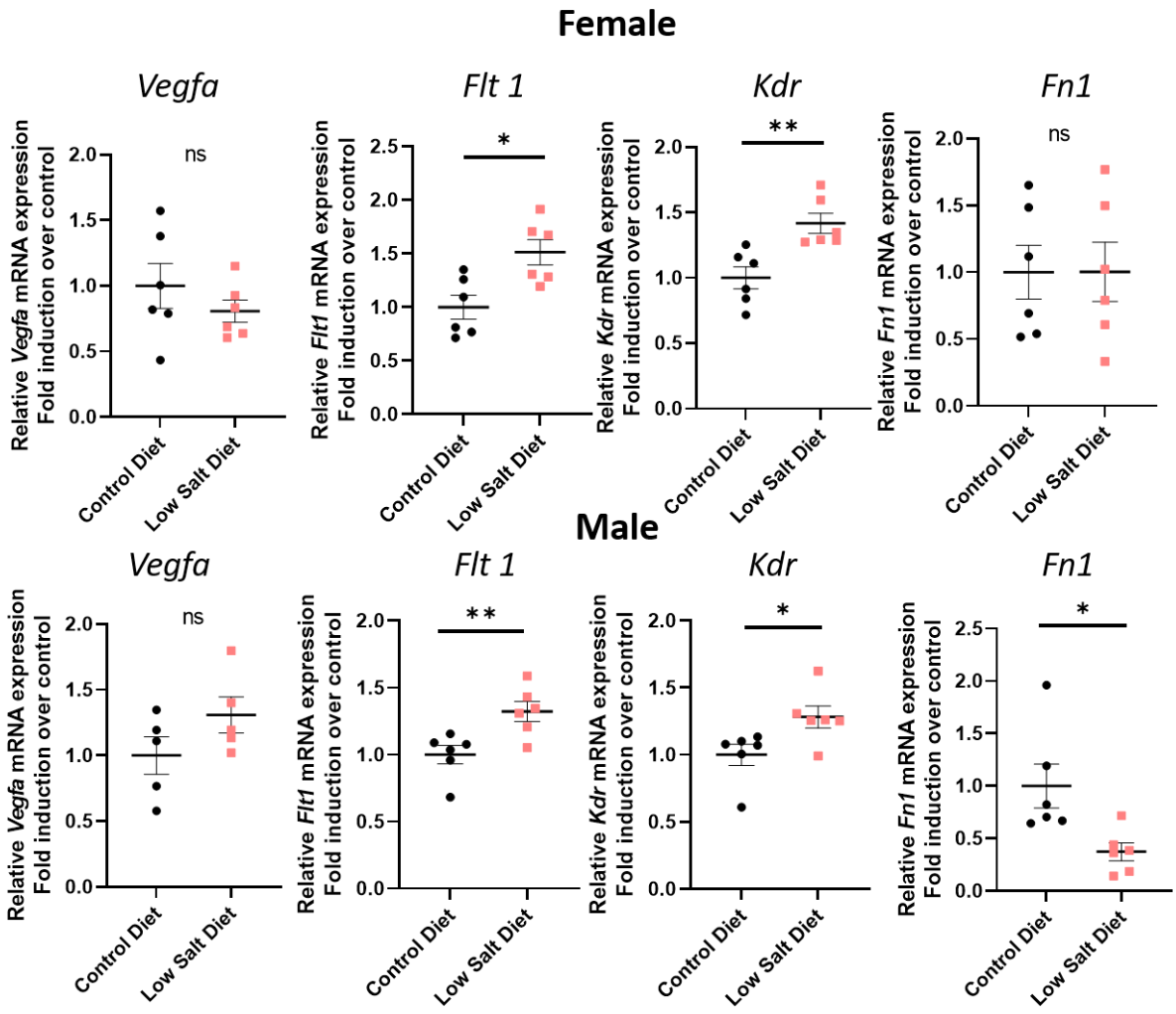


Figure 48. **Expression des gènes de la vascularisation dans la surrénale des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines sous régime contrôles et pauvre en sel**. Expression par RT-qPCR des gènes de la vascularisation (*Flt1, Kdr, Vegfa, Fn1*). Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant t-test. N compris entre 5 et 6 par groupe. *p<0,05 **p<0,01.

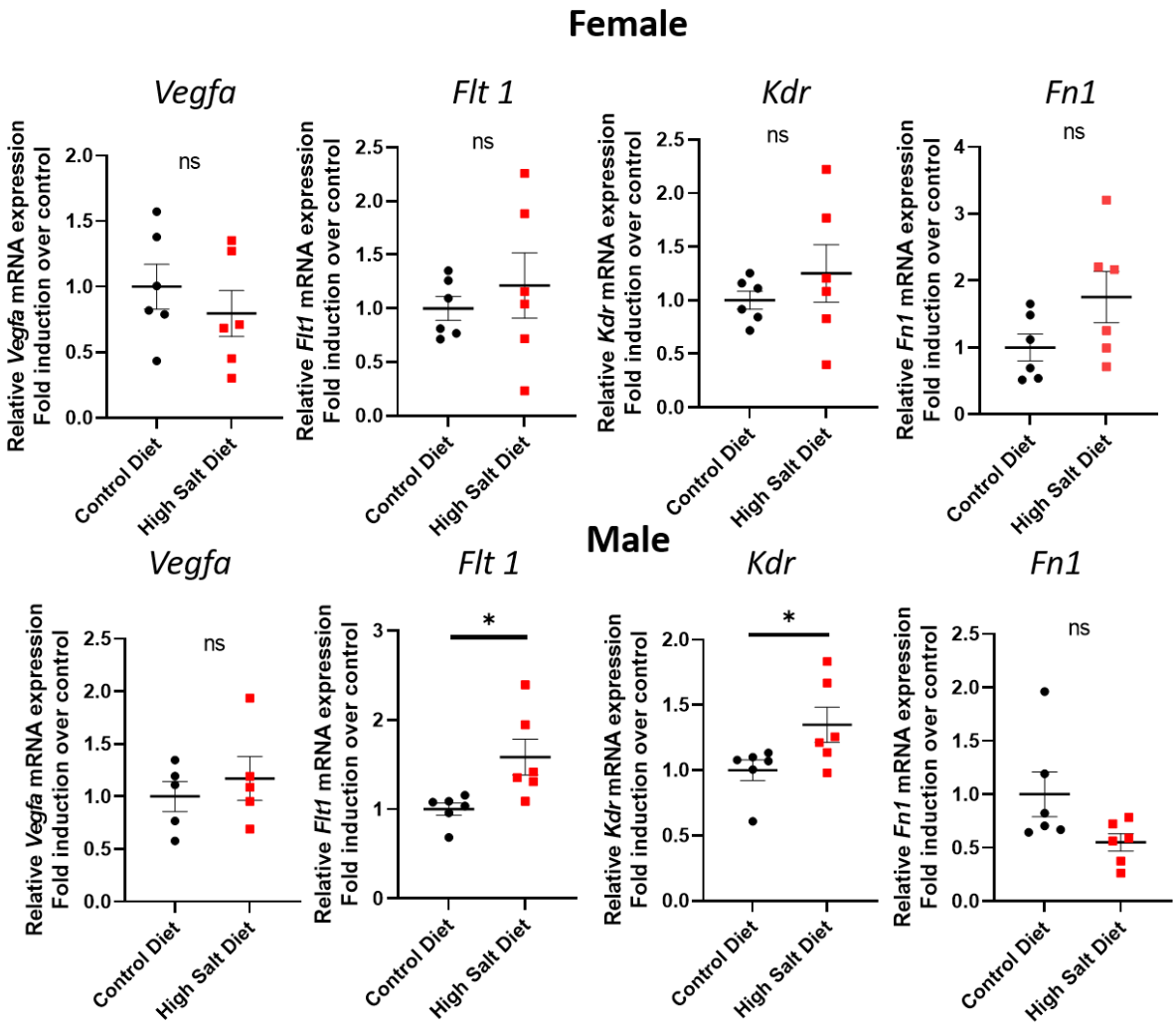


Figure 49. Expression des gènes de la vascularisation dans la surrénale des souris mâles et femelles âgées de 6 semaines sous régime contrôles et riche en sel. Expression par RT-qPCR des gènes de la vascularisation (flt1, kdr, vegfa, fn1). Les valeurs sont présentées en mean ± SEM. Les valeurs de p sont calculées en utilisant un t-test. N compris entre 5 et 6 par groupe. *p<0,05.

7.2 Discussion

Dans cette étude, nous avons créé un modèle murin qui permet d'étudier la plasticité du cortex surrénalien et d'aborder ainsi la question du rôle des interactions hormonales et vasculaires dans les processus d'adaptation physiopathologique et qui permettra de mieux comprendre les mécanismes de développement des APA.

La création d'un modèle animal qui permet de mieux étudier le développement et le suivi des modifications de la corticosurrénale était essentiel. Un premier modèle de souris CYP11B2-Cre a été créé par Freedman et al (Freedman et al. 2013). Les auteurs ont généré des souris AS-Cre en introduisant la recombinase Cre dans l'exon 2 du gène *Cyp11b2* (AS, aldosterone synthase, la protéine codée par *Cyp11b2*) par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires. Dans ce modèle, les souris homozygotes AS Cre/Cre n'expriment pas *Cyp11b2* et présentent une stimulation du système rénine angiotensine, alors que les souris AS+/Cre présentent une haploinsuffisance. Cette haploinsuffisance n'entraine cependant pas de modification des taux d'aldostérone ceci étant dû à une stimulation compensatrice chronique du système rénine angiotensine. Par conséquent, seules les souris AS+/Cre peuvent être utilisées pour étudier le rôle des cellules de la ZG dans la zonation surrénalienne dans des conditions physiologiques. L'avantage de notre modèle est que la Cre a été insérée en aval du codon stop de *Cyp11b2* dans la région 3' non traduite du gène après une cassette IRES et par conséquent, cette insertion ne modifie pas l'expression de *Cyp11b2* ni à l'état homozygote ni à l'état hétérozygote. De plus, nos études ont montré qu'il n'y a pas de différence au niveau de la production de l'aldostérone et du lignage cellulaire entre les souris homozygotes et hétérozygotes pour la Cre et donc les deux génotypes peuvent être utilisés pour les études. Ce modèle a permis de suivre la localisation de l'expression de *Cyp11b2* qui est restreinte à la zone glomérulée du cortex surrénalien. Contrairement à d'autres études qui montrent que *Cyp11b2* est exprimé dans les adipocytes pouvant permettre une synthèse locale d'aldostérone (Briones et al. 2012), nous n'avons pas mis en évidence d'expression de *Cyp11b2* dans les tissus adipeux sous-cutanés et mésentériques dans notre modèle. Une autre étude a montré que les tissus de l'endomyocarde des patients avec une insuffisance cardiaque chronique expriment *CYP11B2* et une faible quantité de *CYP11B1* (Satoh et al. 2002). Dans notre modèle le tissu cardiaque de la souris n'exprime pas *Cyp11b2*. Nos résultats confirment donc les résultats de MacKenzie et al, montrant que *CYP11B2* est exprimé exclusivement dans la surrénale (S. MacKenzie et al. 2000; S. M. MacKenzie, Connell, and Davies 2012; Ye et al. 2003) et certaines zones du cerveau.

Dans notre modèle, des cellules GFP$^+$ apparaissent dès J1 de vie et à 2 semaines toutes les cellules de la ZG sont GFP$^+$. Les études de lignage cellulaire et la quantification des cellules GFP$^+$ n'a pas montré de différence significative entre 5 et 12 semaines. Cependant, un dimorphisme sexuel a été observé avec une migration plus rapide chez les femelles, et on observe que la transdifférentiation est presque achevée à 5 semaines chez les femelles alors qu'elle se poursuit jusqu'à 12 semaines chez les mâles. Une tendance à la réduction de la transdifférentiation des cellules de la ZG a été observée à 12 semaines chez les femelles. Cet effet peut être expliqué par un switch de contribution des cellules de la ZG à la formation des cellules de la ZF à l'âge adulte. Des expériences sur des souris plus âgées pourraient confirmer ce switch. Ce modèle a permis aussi d'étudier l'origine des cellules de la zone X. Le cortex surrénalien de la souris développe une couche unique de cellules éosinophiles, appelé zone X, après la naissance. Cette couche particulière disparaît pendant la puberté chez les souris mâles mais persiste chez les souris femelles jusqu'à la première gestation. La zone X correspond aux cellules surrénales fœtales accumulées dans la région juxtamedullaire après la naissance (Morohashi and Zubair 2011). Nous avons observé que la zone X est formée de deux types cellulaires : des cellules exprimant *cyp11b2* qui se sont transdifférenciées (cellules vertes) et des cellules dérivant directement de la capsule (cellules rouges). On peut donc conclure que les cellules de la zone X à l'âge adulte ont des origines diverses : une partie des cellules pourrait dériver directement de cellules souches alors que d'autres pourraient être issues de la ZF et de la ZG (Figure 50).

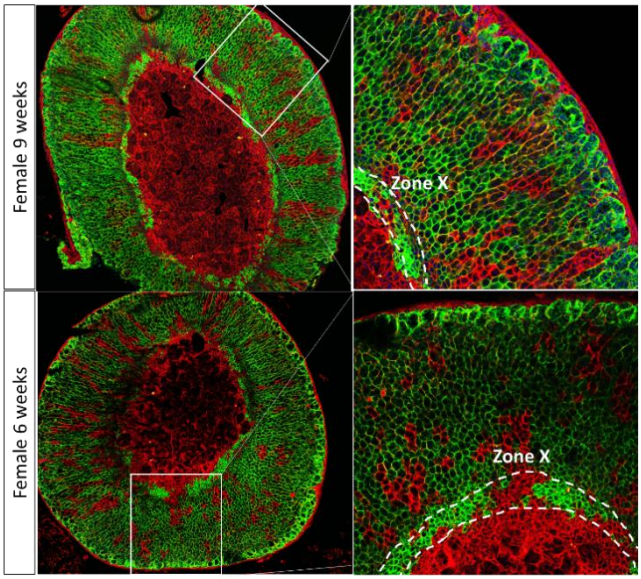


Figure 50. Origine cellulaire de la zone X. Image prises par microscopie confocale.

On a par ailleurs examiné les changements d'expression des gènes de structure et de fonction de la corticosurrénale (*cyp11b2* et *cyp11b1*) entre l'âge de 5 et 12 semaines chez les souris mâles et femelles. Ces études ont montré qu'il n'y a pas de changement de niveaux d'expression de *Cyp11b2*

entre 5 et 12 semaines chez les mâles et femelles. L'expression de *Cyp11b1* ne varie pas chez les femelles mais augmente entre 5 et 8 semaines chez les mâles. L'analyse de l'expression des effecteurs et des gènes cibles (*Axin2, Wnt4, Lef1*) de la voie de signalisation Wnt/β-caténine montre un dimorphisme sexuel entre 5 et 12 semaines chez les mâles et les femelles. Chez les souris femelles, on observe une diminution d'activité de cette voie entre 8 et 12 semaines, accompagnant la diminution de la transdifférentiation des cellules de la ZG. Par contre, cette signalisation est plus activée entre 5 et 8 semaines chez les mâles.

On a également étudié le réseau vasculaire et l'expression de *Vegfa* et de ses récepteurs (*Fdr* et *Flt1*) chez les souris mâles et femelles entre 5 et 12 semaines. L'expression de *Vegfa* ne varie pas entre 5 et 12 semaines dans les deux sexes mais, de façon intéressante, l'expression de ses récepteurs augmente dans les deux sexes pendant cette période. Ces résultats peuvent suggérer que la surrénale devient plus sensible au *Vegfa* avec l'âge. Cette augmentation de la signalisation de la voie de l'angiogenèse n'est pas liée à l'augmentation de la taille de la surrénale qui ne varie pas entre 5 et 12 semaines. Une autre explication pour l'absence de modifications au niveau de l'expression de *Vegfa* est que la glande surrénale exprime l'EG-VEGF, qui est un facteur angiogénique, capable de stimuler la prolifération, la migration et la fenestration des cellules endothéliales capillaires provenant sélectivement des glandes endocrines. Il a été montré que l'expression de l'ARN messager de l'EG-VEGF humain est limitée aux glandes stéroïdogènes (Hatano et al. 1996).

Afin d'identifier les mécanismes responsables de la plasticité du cortex surrénalien et d'explorer l'influence hormonale sur la dynamique de l'interaction cellule endocrine-vaisseaux, on a étudié l'effet de l'apport d'un glucocorticoïde exogène, la dexaméthasone qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH et par conséquent affecte le développement de la ZF et la production de corticostérone et d'aldostérone. Puisque l'ACTH stimule la production de corticostérone et d'aldostérone, une inhibition de sa sécrétion inhibe à son tour ses effet sur ces hormones. Le traitement par la dexaméthasone (suppression) entraine des changements majeurs des surrénales des souris, qui sont accompagnées par une diminution de l'expression de *Cyp11b1*, une augmentation de l'apoptose, une activation de la signalisation Wnt/β-caténine et une diminution de la vascularisation. Toutes ces modifications sont rétablies après l'arrêt de traitement (régénération).

Ces modifications présentent un dimorphisme sexuel, l'activation de la signalisation Wnt/β-caténine pendant la suppression n'est observée que chez les souris mâles. Cette activation peut être expliquée par l'absence de l'effet inhibiteur exercé par la signalisation ACTH/PKA. Suite à l'inhibition de la production d'ACTH en réponse au traitement à la dexaméthasone, les cellules de la ZF subissent une apoptose, responsable de la réduction de la taille de la zone. Ces surrénales sont caractérisées par une

augmentation de l'expression des gènes régulateurs de l'apoptose *P53* et *Casp3*. Mais, elles expriment également l'agent antiapoptotique *Bcl2*. Des résultats similaires ont été publiés par Almeida et al (Almeida, Matos, and Neves 2007) qui ont observé que certaines cellules coexpriment Bcl-2 et la caspase-3 activée dans la surrénale. Cela contraste avec le concept selon lequel l'activité de Bcl-2 précède l'activation de la caspase-3 dans la voie apoptotique mitochondriale, bien que l'on puisse supposer que la longue durée d'une expression intense de Bcl-2 soit le résultat de l'effort de la cellule pour empêcher sa propre mort. Dans notre étude, nous n'avons pas analysé histologiquement l'expression de *Casp3* et *Bcl-2*. Ces études seront nécessaires pour confirmer si les cellules en apoptose co-expriment *Bcl-2* et *Casp3* ou si Bcl-2 est exprimée par un autre type cellulaire en prolifération pour compenser la mort des cellules de la ZF.

Enfin, au niveau de l'interaction vascularisation et cellules stéroidogéniques, un dimorphisme sexuel est également présent avec une diminution de l'expression de *Vegfa* et de son récepteur *Flt1* uniquement chez les souris mâles en phase de suppression. Ces résultats sont concordants avec la diminution de la surface vasculaire observée uniquement chez les souris mâles en phase de suppression et qui est rétablie pendant la phase de régénération.

Les études de plasticité et d'adaptation de la corticosurrénale physiopathologique avec le changement d'apport en sel dans l'alimentation pendant 2 semaines ont montré que la surrénale a une capacité d'adaptation hormonale et pour la première fois, nous avons pu montrer que l'adaptation de la fonction hormonale de la surrénale est accompagnée par une adaptation de la surface vasculaire avec un dimorphisme sexuel, tandis qu'aucun effet sur le lignage cellulaire n'est observé. La production de l'aldostérone et l'expression de *Cyp11b2* augmente d'une manière significative chez les souris sous régime pauvre en sel et diminue en réponse à un régime riche en sel. De façon surprenante, on observe une augmentation de l'expression de *Cyp11b1* en qPCR, alors que les concentrations plasmatiques en corticostérone ne varie pas en réponse à des modifications de l'apport en sel et que l'expression de *Cyp11b1*, visualisée en RNAscope ne présente pas d'altération majeure. Ces résultats devront être confirmé avec un nombre d'animaux plus important afin de déterminer si ces variations de l'apport sodé induisent un stress chez l'animal.

Afin de confirmer, l'absence d'effet de l'apport en sel sur le lignage de la corticosurrénale, nous avons étudié l'expression des effecteurs et de gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/β-caténine qui joue un rôle dans la stabilisation et le maintien de l'identité des cellules de la ZG en inhibant la transdifférentiation de ces cellules (Pignatti et al. 2020). Nous avons mis en évidence que l'activation ou l'inhibition du SRAA par un régime pauvre ou riche en sel augmente, d'une manière significative

chez les souris mâles, l'expression du ligand *wnt4*, une cible et un effecteur de la signalisation Wnt canonique.

L'étude du réseau vasculaire et de la signalisation de l'angiogenèse montre qu'avec un régime pauvre en sel la surface vasculaire augmente uniquement chez les femelles, alors que sous un régime riche en sel, on observe une diminution de la surface vasculaire uniquement chez les mâles. Bien que l'expression de *vegfa* ne change pas quel que soit le régime en sel, une augmentation de l'expression de ces récepteurs (*flt1* et *kdr*) a été observée. Une étude de l'expression d'EG-VEGF serait intéressante pour mieux comprendre quelles voies de signalisation de l'angiogenèse sont actives dans la glande surrénale.

Il a déjà été démontré que l'aldostérone est capable de réguler la production de VEGF-A dans les cellules neutrophiles humaines (C. Walczak et al. 2011) mais dans notre étude, vu la grande variabilité entre les animaux, l'augmentation de la production d'aldostérone n'induit pas une augmentation de la production de *vegfa*.

Pour conclure, notre modèle permet donc d'étudier la plasticité du cortex surrénalien et d'aborder ainsi la question du rôle des interactions hormonales et vasculaires dans les processus d'adaptation physiopathologique et qui permettra de mieux comprendre les mécanismes de développement des APA.

En complément de ces études, et afin d'étudier la morphologie, la vascularisation et la zonation surrénalienne chez l'animal vivant et son évolution avec l'âge mais également en réponse à différents traitements, j'ai mis au point un modèle permettant des analyses en microscopie bi-photon (collaboration équipe d'A. Eichmann, PARCC, et avec Estelle Robidel, plateforme de chirurgie du petit animale du PARCC). La microscopie multiphotonique intravitale de la surrénale est une technique innovante qui nous permettra d'étudier les altérations de morphologie et de fonction tissulaire chez l'animal vivant en temps réel. Cette technique nécessite la mise en place d'une fenêtre au niveau de l'abdomen de l'animal, permettant de visualiser la surrénale (Figure 49). Pour cette partie, nous bénéficions de l'expertise de l'ingénieur de la plateforme de microscopie biphotonique du PARCC et de celle de l'assistante ingénieure de la plateforme de chirurgie du petit animal. Les résultats obtenus par cette approche permettant de suivre les mêmes régions de la surrénale sur plusieurs semaines seront complétés par des études histologiques *ex-vivo* pour suivre l'expression de biomarqueurs cellulaires. Ainsi, par cette approche de microscopie bi-photonique nous pourrons effectuer un traçage à long terme du destin cellulaire des mêmes cellules dans des conditions physiologiques et physiopathologiques, permettant ainsi de mettre en évidence l'adaptation cellulaire au fil du temps.

Nous pourrons ainsi suivre la migration et la prolifération des cellules surrénaliennes ainsi que leurs interactions avec les cellules endothéliales en réponse aux différents traitements que nous avons déjà effectués et avoir ainsi une image dynamique complétant les analyses réalisées à différents moments.

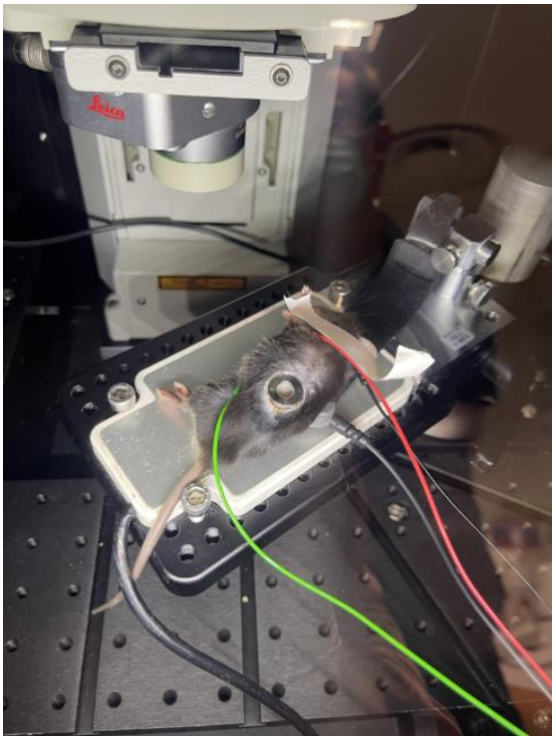


Figure 51. Installation de fenêtre abdominale chez la souris et dispositif permettant l'acquisition des images.

Les résultats obtenus devraient apporter des éléments nouveaux quant à la dynamique d'interaction cellules endocrines – cellules endothéliales dans la réponse adaptative de la surrénale.

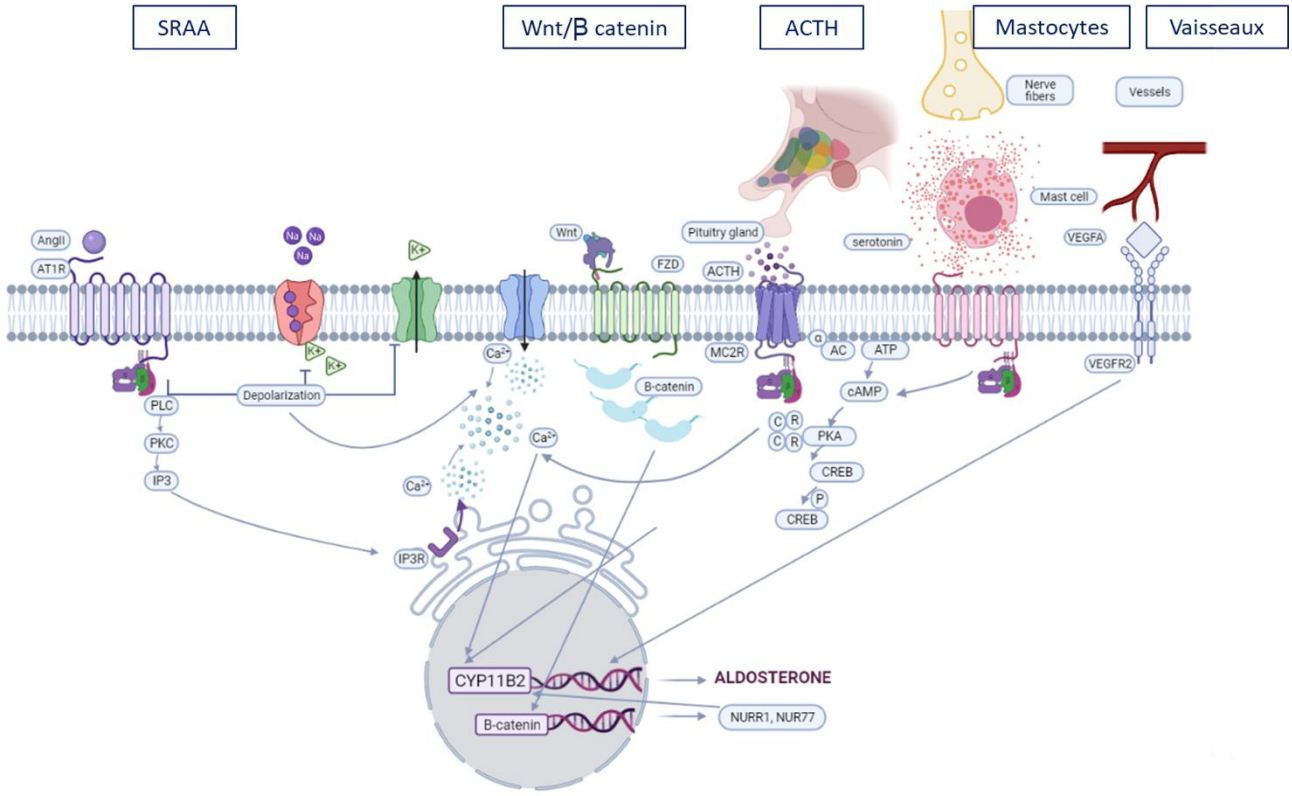
8. Partie 2 : Colocalisation des voies de signalisation wnt/β-caténine et ACTH et régulation paracrine dans les adénomes produisant de l'aldostérone

8.1 Littérature et objectif de l'étude

La production d'aldostérone dans la glande surrénale est régulée par le système rénine-angiotensine, les concentrations de potassium et, dans une moindre mesure, par l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). En se liant à son récepteur (récepteur de mélanocortine de type 2, MC2R), l'ACTH active l'adénylate cyclase (AC) et la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle CREB (cAMP response element binding protein). La voie Wnt/β-caténine joue un rôle dans l'identité et la fonction des cellules de la ZG. De plus, la régulation paracrine de la production d'aldostérone est médiée par des facteurs libérés par des composants du microenvironnement, à savoir les cellules chromaffines, les cellules endothéliales, les fibres nerveuses et les cellules immunitaires. La sérotonine (5-HT) libérée par les mastocytes périvasculaires est connue pour induire la production d'aldostérone. Différents signaux peuvent stimuler la dégranulation des mastocytes tels que les neuropeptides. Cependant, le contrôle de la dégranulation des mastocytes dans la glande surrénale n'est pas bien clarifié. Une particularité de la glande surrénale est également l'expression très élevée du VEGF. L'ACTH contrôle le développement coordonné des vaisseaux et des cellules endocrines. Dans ce contexte, le rôle du VEGFA, dont l'expression est contrôlée par l'ACTH, est de maintenir une forte densité de microvaisseaux fenêtrés stables.

Différentes mutations somatiques dans l'APA et des mutations germinales dans l'HAP familiale ont été découvertes en utilisant des approches de séquençage de l'exome entier. Ces mutations affectent des gènes codant pour des canaux ioniques (*KCNJ5*, *CACNA1D*, *CACNA1H*, *CLCN2*) ou des ATPases (*ATP1A1*, *ATP2B3*). Ils conduisent à une production autonome d'aldostérone en augmentant l'expression de *CYP11B2*, codant pour l'aldostérone synthase. Des approches de séquençage de nouvelle génération (NGS) guidé par l'immunohistochimie de CYP11B2 permet d'établir la prévalence des mutations somatiques entre 88 et 96%.

En plus des gènes codant pour les canaux ioniques et les pompes, des mutations dans les gènes liés au développement des surrénales, au maintien de la zone glomérulée (ZG) et à la stéroïdogenèse ont également été décrites dans l'APA. En particulier, des mutations somatiques dans *CTNNB1* codant pour la -caténine sont retrouvées dans 2% à 5% des cas. Plus récemment, dans certaines de ces tumeurs porteuses de mutations CTNNB1, des mutations des gènes GNAQ et GNA11, codant pour des petites protéines G, ont également été identifiés.



L'objectif de ce projet était d'étudier la relation entre les différentes voies de signalisation et les composants du microenvironnement des glandes surrénales avec APA afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine du développement des structures productrices d'aldostérone et de l'hétérogénéité intratumorale.

Les patients inclus dans cette étude ont subi une surrénalectomie entre 2013 et 2016 à l'Hôpital Européen Georges Pompidou. Seize glandes surrénales de patients atteints d'APA et deux blocs de surrénales d'un patient présentant une hyperplasie multinodulaire ont été étudiées pour un total de 18 échantillons provenant de 17 patients. Ces APA portent des mutations somatiques précédemment identifiées par séquençage de Sanger ou par NGS ciblé guidé par immunohistochimie de CYP11B2.

Nous avons effectué des investigations morphologiques détaillées de 11 glandes surrénales avec APA et d'une surrénale avec hyperplasie micronodulaire en utilisant une analyse d'image multispectrale par immunofluorescence multiplex. Les marquages par immunofluorescence multiplex ont été réalisée avec le kit Opal 7-color Manual IHC (PerkinElmer) dans deux séries d'expériences distinctes. Des images d'immunofluorescence et d'immunohistochimie multiplex ont été acquises à l'aide d'un système d'imagerie automatisé Vectra® et quantifiées automatiquement avec le logiciel d'analyse d'images InForm®. Les résultats ont été corrélés avec le statut mutationnel de l'APA. Ces analyses multiplex nous ont permis d'étudier l'environnement cellulaire et les voies Wnt/β-caténine et ACTH/cAMP/PKA

impliquées dans le maintien et la fonction du cortex surrénalien. En complément, des marqueurs de la régulation paracrine ont également été étudiés : les mastocytes ont été marqués par la tryptase, les cellules nerveuses par la protéine S100 et les cellules endothéliales vasculaires ont été marquées par CD34. Parmi ces APA 2 étaient porteurs d'une mutation *KCNJ5*, 3 d'une mutation *CACNA1D*, 3 d'une mutation *ATP1A1* et 3 d'une mutation *ATP2B3*.

8.2 Résultats

Article: Colocalization of Wnt/β-Catenin and ACTH Signaling Pathways and Paracrine Regulation in Aldosterone-Producing Adenoma

Kelly De Sousa[1,*], Alaa B. Abdellatif[1,*], Isabelle Giscos-Douriez[1], Tchao Meatchi[1,2], Laurence Amar[1,3], Fabio L. Fernandes-Rosa[1,†], Sheerazed Boulkroun[1,†], and Maria-Christina Zennaro[1,4]

[1]Université de Paris, PARCC, Inserm, 75015 Paris, France ;

[2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Anatomie Pathologique, 75015 Paris, France ;

[3]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité Hypertension artérielle, 75015 Paris, France ; and

[4]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service

de Génétique, 75015 Paris, France

*These authors contributed equally to this work

† These authors contributed equally to this work

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2022, Vol. 107, No. 2, 419–434
https://doi.org/10.1210/clinem/dgab707

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2022, Vol. 107, No. 2, 419–434
https://doi.org/10.1210/clinem/dgab707
Clinical Research Article

Clinical Research Article

Colocalization of Wnt/β-Catenin and ACTH Signaling Pathways and Paracrine Regulation in Aldosterone-Producing Adenoma

Kelly De Sousa,[1,*] Alaa B. Abdellatif,[1,*] Isabelle Giscos-Douriez,[1] Tchao Meatchi,[1,2] Laurence Amar,[1,3] Fabio L. Fernandes-Rosa,[1,†] Sheerazed Boulkroun,[1,†] and Maria-Christina Zennaro[1,4]

[1]Université de Paris, PARCC, Inserm, 75015 Paris, France; [2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service d'Anatomie Pathologique, 75015 Paris, France; [3]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Unité Hypertension artérielle, 75015 Paris, France; and [4]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, 75015 Paris, France

ORCiD numbers: 0000-0003-3942-4276 (L. Amar); 0000-0001-5449-9191 (M.-C. Zennaro).

*These authors contributed equally to this work.
†These authors contributed equally to this work.

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropin; APA, aldosterone-producing adenoma; APCC, aldosterone-producing cell cluster; cAMP, 3′,5′-cyclic AMP; CYP11B2, aldosterone-synthase; FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; IHC, immunohistochemistry; MC2R, melanocortin type 2 receptor; NGS, next-generation sequencing; PA, primary aldosteronism; pAATL, possible APCC to APA translational lesion; PKA, protein kinase A; RT-qPCR, reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction; VEGFA, vascular endothelial growth factor A; ZF, zona fasciculata; ZG, zona glomerulosa.

Received: 11 June 2021; Editorial Decision: 22 September 2021; First Published Online: 27 September 2021; Corrected and Typeset: 15 October 2021.

Abstract

Context: Aldosterone-producing adenomas (APAs) are a common cause of primary aldosteronism (PA). Despite the discovery of somatic mutations in APA and the characterization of multiple factors regulating adrenal differentiation and function, the sequence of events leading to APA formation remains to be determined.

Objective: We investigated the role of Wnt/β-catenin and adrenocorticotropin signaling, as well as elements of paracrine regulation of aldosterone biosynthesis in adrenals with APA and their relationship to intratumoral heterogeneity and mutational status.

Methods: We analyzed the expression of aldosterone-synthase (CYP11B2), CYP17A1, β-catenin, melanocortin type 2 receptor (MC2R), phosphorlyated cAMP response element-binding protein (pCREB), tryptase, S100, CD34 by multiplex immunofluorescence, and immunohistochemistry-guided reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction. Eleven adrenals with APA and 1 with micronodular hyperplasia from patients

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in USA
© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of the Endocrine Society. All rights reserved.
For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

with PA were analyzed. Main outcome measures included localization of CYP11B2, CYP17A1, β-catenin, MC2R, pCREB, tryptase, S100, CD34 in APA and aldosterone-producing cell clusters (APCCs).

Results: Immunofluorescence revealed abundant mast cells and a dense vascular network in APA, independent of mutational status. Within APA, mast cells were localized in areas expressing CYP11B2 and were rarely colocalized with nerve fibers, suggesting that their degranulation is not controlled by innervation. In these same areas, ß-catenin was activated, suggesting a zona glomerulosa cell identity. In heterogeneous APA with *KCNJ5* mutations, *MC2R* and vascular endothelial growth factor A expression was higher in areas expressing CYP11B2. A similar pattern was observed in APCC, with high expression of CYP11B2, activated β-catenin, and numerous mast cells.

Conclusion: Our results suggest that aldosterone-producing structures in adrenals with APA share common molecular characteristics and cellular environment, despite different mutation status, suggesting common developmental mechanisms.

Key Words: aldosterone, mineralocorticoids, endocrine hypertension, primary aldosteronism, aldosterone-producing adenoma, adrenal cortex, signaling pathway, paracrine regulation, mast cells, vessels

Aldosterone-producing adenomas (APAs) and bilateral adrenal hyperplasia are the main causes of primary aldosteronism (PA) (1). PA is the most frequent form of secondary arterial hypertension, with a prevalence of 5% of hypertensive patients in primary care and up to 10% of those seen in reference centers (2-4). Hypertension, increased aldosterone levels with suppressed plasma renin, and in many cases hypokalemia are the main characteristics of the disease. Patients with PA are at excess risk for cardiovascular events when compared to patients with primary hypertension (5, 6).

Different somatic mutations in APA and germline mutations in familial PA were discovered using whole-exome sequencing approaches. These mutations affect genes coding for ion channels (*KCNJ5*, *CACNA1D*, *CACNA1H*, *CLCN2*) or ATPases (*ATP1A1*, *ATP2B3*) (7). They lead to autonomous aldosterone production by increasing the expression of aldosterone-synthase (*CYP11B2*), coding for aldosterone synthase. The prevalence of somatic mutations is estimated to be between 88% and 96% by immunohistochemistry (IHC)-guided next-generation sequencing (NGS) (8-12). Other autonomous aldosterone-producing lesions have been described in normal adrenals as well as in peritumoral tissue in adrenals with APA. Indeed, somatic mutations in *CACNA1D*, *ATP1A1*, and *KCNJ5* have been described in aldosterone-producing cell clusters (APCCs, also called aldosterone-producing nodules) (13) and possible APCC to APA translational lesions (pAATLs) (10, 14, 15). The recurrence of somatic mutations in APA driver genes and the metabolic profile of APCC suggested that they may induce APA development (14).

In addition to genes coding for ion channels and pumps, mutations in genes related to adrenal development, maintenance of the zona glomerulosa (ZG) and steroidogenesis have also been described in APA. Particularly, somatic mutations in *CTNNB1* coding for β-catenin are found in 2% to 5% of cases (16, 17), possibly causing a proliferative advantage in adrenal cells and an abnormal activation of the WNT signaling pathway. More recently, somatic mutations in *GNAQ*/*GNA11* were identified in APA-carrying somatic *CTNNB1* mutations in patients presenting with PA in puberty, pregnancy, or menopause (18). Somatic mutations in *PRKACA* (catalytic subunit of protein kinase A) are rare findings in APAs and their direct involvement in APA development is still unclear (19). The Wnt/β-catenin pathway plays a role in the identity and function of ZG cells, whereas the adrenocorticotropin (ACTH)/3′,5′-cyclic AMP (cAMP) pathway is involved in the differentiation of ZG cells into zona fasciculata (ZF) cells by inhibiting the Wnt/β-catenin pathway (20) as well as in regulating glucocorticoid biosynthesis. We have previously reported that in APA the Wnt/β-catenin pathway was activated mainly in areas expressing aldosterone synthase (10), supporting its role in maintaining ZG cell identity and function (21). The observed intratumoral heterogeneity in APA suggests that the interplay between ACTH/cAMP and Wnt/β-catenin pathways may be involved in the transdifferentiation of ZG cells into ZF cells within the APA.

Aldosterone production is regulated by the renin-angiotensin system, potassium concentrations and, to a lesser extent, by ACTH (22). When binding to its receptor (melanocortin type 2 receptor; MC2R), ACTH activates adenylate cyclase and protein kinase A (PKA), which phosphorylates cAMP response element binding protein (CREB), resulting in increased steroidogenic acute

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

regulatory protein expression (23). In addition, paracrine regulation of aldosterone production is mediated by factors released by components of the APA microenvironment, including chromaffin cells, endothelial cells, nerve fibers, and immune cells (24-27). Serotonin (5-HT) released by perivascular mast cells is known to induce aldosterone production. Different signals may stimulate mast cell degranulation such as neurotransmitters, neuropeptides, and hormones (28). However, the control of mast cell degranulation in the adrenal gland is not well clarified (24, 29). A peculiar feature of the adrenal gland is also the very high expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), even in adulthood, despite the absence of active angiogenesis (30, 31). ACTH controls the coordinated development of vessels and endocrine cells. In this context, the role of *VEGFA*, whose expression is controlled by ACTH, is to maintain a high density of stable fenestrated microvessels (30, 31). The combined secretion of angiogenic factors by endocrine cells and trophic factors by endothelial cells allows the maintenance of a "symbiosis" between these cellular compartments.

The aim of this study was to investigate the relationship between different signaling pathways and components of the microenvironment in adrenals with APA to better understand the mechanisms driving the development of aldosterone-producing structures and intratumoral heterogeneity. We performed detailed morphological investigations of 11 adrenals with APA and 1 with micronodular hyperplasia using multiplex immunofluorescence multispectral image analysis. In addition, CYP11B2 IHC-guided reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed on RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues in 7 adrenals. Results were correlated with APA mutation status.

Materials and Methods

Patients

Patients included in this study underwent adrenalectomy between 2013 and 2016 at the Hôpital Européen Georges Pompidou and were recruited within the COMETE-HEGP protocol (authorization No. CPP 2012-A00508-35) and are described in De Sousa et al (10). Screening and subtype identification of PA were performed according to institutional and Endocrine Society guidelines (32-34); 16 adrenals from patients with APA and 2 adrenal blocs from 1 patient with multinodular hyperplasia were investigated for a total of 18 samples from 17 patients (Table 1). All patients gave written informed consent for genetic and clinical investigation. Procedures were in accordance with institutional guidelines. APA mutational status has been described in De Sousa et al (10).

Multiplex Immunofluorescence

Multiplex immunofluorescence staining was performed with the Opal 7-color Manual IHC Kit (PerkinElmer) in 2 separate sets of experiments. Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded ethanol before washing with distilled water and TBST (0.1-M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15-M NaCl, 0.05% Tween 20). Sections were refixed by 20-minute incubation in 4% paraformaldehyde followed by a distilled water wash. The slides were incubated in AR6 buffer (1/10; PerkinElmer) and subjected to microwave treatment for 15 minutes at 20% power for antigen unmasking. Nonspecific staining was blocked with blocking solution (PerkinElmer) for 10 minutes. Given the complexity of the setup of multiplex immunofluorescence, either CYP11B1 or CYP17A1 were used to identify ZF cells.

For a first multiplex immunofluorescence, the slides were incubated with a mouse monoclonal antibody against aldosterone-synthase (1/100, hCYP11B2, clone 41-13C, kindly provided by Dr C Gomez-Sanchez, RRID: AB_2650562; https://scicrunch.org/resolver/AB_2650562), rabbit polyclonal antibody against 17α-hydroxylase (1/1000, LSBio No. LS-B14227, RRID: AB_2857939; https://scicrunch.org/resolver/AB_2857939), mouse monoclonal antibody against β-catenin (1/400; BD Biosciences No. 610153, RRID: AB_397554; https://scicrunch.org/resolver/AB_397554), rabbit polyclonal antibody against MC2R (1/200, Abgent No. AP5540b, RRID: AB_10820209; https://scicrunch.org/resolver/AB_10820209), and a rabbit monoclonal antibody against pCREB (Ser133) (1/500, Cell signaling technology No. 9198, RRID: AB_2561044; https://scicrunch.org/resolver/AB_2561044). For a second multiplex immunofluorescence, the slides were incubated with a mouse monoclonal antibody against mast cell tryptase (1/10000, BIO-RAD No. MCA1438, RRID: AB_2206190; https://scicrunch.org/resolver/AB_2206190), rabbit monoclonal antibody against S100 protein (1/2, Agilent No. GA50461-2, RRID: AB_2811056; https://scicrunch.org/resolver/AB_2811056), antibody against 11β-hydroxylase (1/100, hCYP11B1-80-2-2, kindly provided by Dr C Gomez-Sanchez, RRID: AB_2650563; https://scicrunch.org/resolver/AB_2650563), and a mouse monoclonal antibody against CD34 (1/5000, ThermoFisher No. MA1-10202, RRID: AB_11156010; https://scicrunch.org/resolver/AB_11156010) for 1 hour at room temperature. Sections were washed and incubated with secondary antibody working solution (PerkinElmer) for 10 minutes; for CYP11B1 the slides were incubated with an antirat secondary antibody (1/400, ImmPRESS Anti-Rat IgG, Vector Laboratories

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

Table 1. Samples analyzed in this study

Patient ID	Structure	CYP11B2 staining	Mutation	Multiplex Immunofluorescence study	Gene expression study
1	APA	Yes	*ATP2B3*	Yes	
4	APA	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC3	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC4	Yes	*KCNJ5*	Yes	
	APCC5	Yes	*Neg*	Yes	
	APCC6	Yes	*Neg*	Yes	
	APCC7	Yes	*Neg*	Yes	
8	APA	Yes	*CACNA1D*	Yes	
10	APA	Yes	*CACNA1D*		Yes
24	APA	Yes	*ATP1A1*	Yes	
25	APA	Yes	*Neg*		Yes
26	APA	Yes	*ATP1A1*	Yes	
34	APA	Yes	*CACNA1D*		Yes
36	APA	Yes	*ATP2B3*	Yes	
40	APA	Yes	*KCNJ5*		
	APA zone 1	No	*KCNJ5*		Yes
	APA zone 2	Yes	*KCNJ5*		Yes
	APA zone 3	Yes	*KCNJ5*		Yes
	APA zone 4	No	*KCNJ5*		Yes
41	APA	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC1	Yes	*Neg*	Yes	
	APCC2	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC4	Yes	*CACNA1D*	Yes	
			CACNA1D	Yes	
			CACNA1H	Yes	
	APCC5	Yes	*KCNJ5*	Yes	
42	APA	Yes	*CACNA1D*		Yes
50	APA	Yes	*KCNJ5*	Yes	
	APA zone 1	No	*KCNJ5*		Yes
	APA zone 2	Yes	*KCNJ5*		Yes
52	APA	Yes	*KCNJ5*	Yes	
	APCC2	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC4	Yes	*KCNJ5*	Yes	
	APCC1	Yes	*Neg*	Yes	
	APCC3	Yes	*Neg*	Yes	
53	APA	Yes	*ATP1A1*	Yes	
56	APA	Yes	*ATP2B3*	Yes	Yes
	Nodule	No	*Neg*	Yes	Yes
48 bloc1	APCC1	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC2	Yes	*Neg*	Yes	
	APCC3	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	APCC6	Yes	*CACNA1D*	Yes	
48 bloc4	pAATL B2+	Yes	*CACNA1D*	Yes	
	pAATL B2-	No	*CACNA1D*	Yes	

Abbreviations: APA, aldosterone-producing adenoma; APCC, aldosterone-producing cell cluster; CYP11B2, aldosterone-synthase; ID, identification; Neg, negative; pAATL, possible APCC to APA translational lesion.

No. MP-7404, RRID: AB_2336531; https://scicrunch.org/resolver/AB_2336531) for 1 hour at room temperature. Then, slides were incubated for 10 minutes in TSA plus solution (included in the Opal 7-color manual IHC kit to detect antibody staining), prepared according to the manufacturer's instructions: Opal 570 (1/100), Opal 650 (1/100-1/200 for S100), Opal 690 (1/50), Opal 540 (1/50-1/100 for CYP11B1), Opal 520 (1/50), and Opal 620 (1/200). Microwave treatment was performed to remove primary and secondary antibodies while retaining an intact fluorescent signal. This process was repeated until all targets of interest were detected, using the respective Opal fluorophore for each one. The slides were counterstained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole PerkinElmer) for 5 minutes.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

Immunohistochemistry

Sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through graded ethanol. For antigen unmasking, the slides were incubated for 30 minutes at 98 °C in Trilogy solution (1/20) (Sigma-Aldrich) for CYP11B2 and 11β-hydroxylase (CYP11B1) IHC, or in a citrate solution (0.935%, Vector Laboratories) for immunostaining against CD34, mast cell tryptase, pCREB, MC2R, and β-catenin. No antigen unmasking was performed for S100 immunostaining. Endogenous peroxidases were inhibited by incubation in 3% hydrogen peroxide (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. Nonspecific staining was blocked with filtered Tris 0.1-M pH 7.4, 10% normal goat serum, 10% bovine serum albumin, and 0.1% sodium dodecyl sulfate for 90 minutes (for 11 β-hydroxylase staining); filtered Tris 0.1-M pH 7.4, 10% horse serum and 0.5% sodium dodecyl sulfate for 60 minutes (for aldosterone-synthase staining); or with phosphate-buffered saline 1× and 10% normal goat serum for 30 minutes (for CD34, mast cell tryptase, S100, β-catenin, MC2R, and pCREB stainings). The slides were incubated overnight at 4 °C (aldosterone-synthase, 11β-hydroxylase, and pCREB stainings) or for 1 hour at room temperature (β-catenin MC2R, mast cell tryptase, S100 protein, and CD34 stainings), using the same antibodies and same dilutions described for multiplex immunofluorescence experiments. Sections were washed, incubated for 30 minutes with affinity purified horse antimouse secondary antibody for aldosterone-synthase, β-catenin, CD34, and mast cell tryptase stainings (1/400, Vector Laboratories No. BP-2000, RRID: AB_2687893; https://scicrunch.org/resolver/AB_2687893), rabbit antirat antibody for 11β-hydroxylase antibody (1/400, Vector Laboratories No. BA-4001, RRID: AB_10015300; https://scicrunch.org/resolver/AB_10015300), or an antirabbit secondary antibody for MC2R, S100, and pCREB stainings (1/400, Vector Laboratories No. BA-1000, RRID: AB_2313606; https://scicrunch.org/resolver/AB_2313606). Slides were washed and incubated with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain ABC Elite; Vector Laboratories) for 30 minutes. The slides were developed using diaminobenzidin (Vector Laboratories) and counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich).

Analysis and Quantification of Histological Features

Multiplex immunofluorescence and immunohistochemistry images were acquired using a Vectra automated imaging system and automatically quantified with the InForm image analysis package (both Perkin Elmer). Each monoplex biomarker was used to generate the spectral library required for multispectral analysis. Tryptase-positive cells and S100-positive fibers were counted as objects, and CD34-positive vessels as area based on their staining in CYP11B2-expressing and -nonexpressing areas. The quantification of these markers was automatically performed with InForm. Areas in 11 APAs were selected to allow the determination of colocalization of CYP11B2, 17α-hydroxylase (CYP17A1), MC2R, pCREB, and cytoplasmic and nuclear staining for β-catenin, which was automatically quantified using InForm (Perkin Elmer).

The distance between mast cells and nerve fibers was measured using Icy software (http://icy.bioimageanalysis.org/).

RNA Extraction and Reverse Transcription–Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNA was coextracted with DNA from FFPE sections using an AllPrep DNA/RNA FFPE kit (Qiagen). Before extraction, APAs and APCCs were identified by CYP11B2 IHC as described in De Sousa et al (10). Based on the CYP11B2 IHC, the areas of interest were delineated and isolated for DNA and RNA extraction by scraping unstained FFPE sections guided by the CYP11B2 IHC slide using a scalpel under a Wild Heerbrugg microscope.

A total of 250 ng of total RNA was retrotranscribed (iScript reverse transcriptase, BioRad). Primers used for amplification of *MC2R* (qHsaCEP0054989) and *MRAP* (qHsaCID0022591) were purchased from BioRad. The sequence of primers used for *MRAP2*, *VEGFA*, *18S*, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) can be provided on request. qPCR was performed using SYBRgreen (Sso Advanced Universal SyBr Green Supermix, BioRad) on a C1000 touch thermal cycler (BioRad CFX96 Real Time System), according to the manufacturer's instructions. Controls without a template were included to exclude primer dimer formation or PCR contaminations. RT-qPCR products were analyzed in a postamplification fusion curve to ensure that a single amplicon was obtained. Normalization for RNA quantity and reverse transcriptase efficiency was performed against 2 reference genes (geometric mean of the expression of ribosomal *18S* and *GAPDH* RNA). Quantification was performed using the standard curve method. Standard curves were generated using serial dilutions from a complementary DNA pool of all samples of each experiment, yielding a correlation coefficient of at least 0.98 in all experiments.

Statistical Analyses

Quantitative variables are reported as mean ± SEM. Comparisons between groups were performed by unpaired *t* test when Gaussian distribution or the Mann-Whitney

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

test when there was no Gaussian distribution. A P value of less than .05 was considered significant for comparisons between 2 groups.

Results

Elements of Paracrine Regulation of Aldosterone Biosynthesis in Aldosterone-producing Adenomas

Eleven adrenals with APA were analyzed by multiplex immunofluorescence to study the cellular environment and markers of paracrine regulation: Mast cells were labeled with tryptase, nerve cells with S100, and vascular endothelial cells were labeled with CD34. In addition, the Wnt/β-catenin and ACTH/cAMP/PKA pathways involved in the maintenance and function of the adrenal cortex were investigated (Fig. 1). These APAs carry somatic mutations previously identified by Sanger sequencing and IHC-guided targeted NGS, including 2 *KCNJ5* mutations, 3 *CACNA1D* mutations, 3 *ATP1A1* mutations, and 3 *ATP2B3* mutations (see Table 1).

Multiplex immunofluorescence revealed abundance of tryptase-positive mast cells and a dense vascular component in APA independently of the mutational status. Remarkably, in all APAs analyzed, the majority of mast cells were found in areas expressing CYP11B2, in contrast to areas not expressing CYP11B2 or areas expressing CYP11B1 ($P < .0001$) (Fig. 2A and 2B). There was no difference of vascular surface between CYP11B2-expressing and -nonexpressing areas ($P = .1214$) (Fig. 2C). APAs also contained nerve fibers whose localization was independent of the expression of CYP11B2 ($P = .6614$) (Fig. 2D). Remarkably, colocalization of mast cells and nerve fibers, which would suggest innervation of mast cells, was rarely observed (Fig. 3A). Indeed, measurement of the distance between mast cells and nerve fibers in the 11 APAs included in our study showed a mean distance between immune cells and nerve fibers of 80.27 µm, with important intratumoral heterogeneity (Fig. 3B). Multiplex immunofluorescence on selected areas revealed cellular coexpression of CYP11B2 with activated, that is, nuclear and/or cytoplasmic, staining of β-catenin in the majority of cells, in contrast to areas expressing CYP17A1, independently of the mutational status of APA, as previously described (10) (see Fig. 1).

Finally, mast cells were found both within the APAs and in the adjacent adrenal cortex, often in close proximity to vascular cells (Fig. 4).

Expression of Components of Adrenocorticotropin Signaling and Vascularization

Expression of MC2R was more frequently observed in CYP11B2-positive areas in comparison to areas expressing CYP17A1. Among cells expressing CYP11B2, 68% coexpressed MC2R; in contrast, only 15% of CYP17A1-positive cells also expressed MC2R, and this pattern was independent of mutation status (Fig. 5A and 5B). Expression of pCREB in APA was observed in approximately 11% of cells and mainly observed in APAs with *CACNA1D* mutations. pCREB did not appear to be colocalized with CYP11B2 nor CYP17A1 in any of the mutational groups (Fig. 5C and 5D). Coexpression of pCREB in cells expressing MC2R was also low (Fig. 5E), suggesting

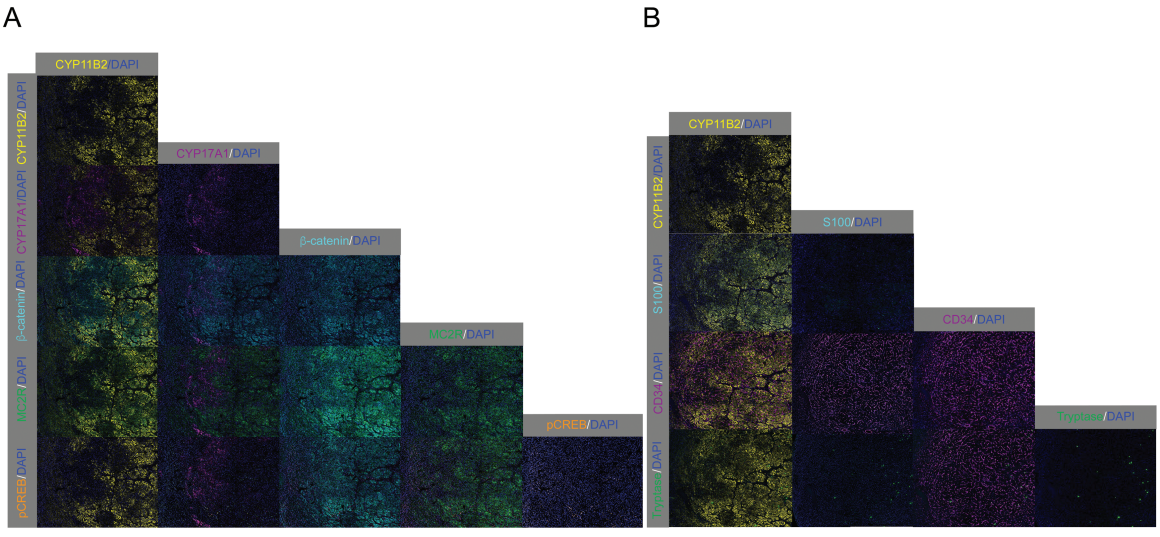


Figure 1. Signaling pathways and cellular environment in aldosterone-producing adenoma (APA). A, Colocalization of aldosterone-synthase (CYP11B2), 17α-hydroxylase (CYP17A1), β-catenin, melanocortin receptor type 2 (MC2R), and phosphorlyated cAMP response element-binding protein (pCREB) by multiplex immunofluorescence in APA. B, Colocalization of CYP11B2, CD34 (vessels), tryptase (mast cells), and S100 (nerve fibers) by multiplex immunofluorescence in APA. Images represent the APA from patient 1 carrying an *ATP2B3* mutation.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

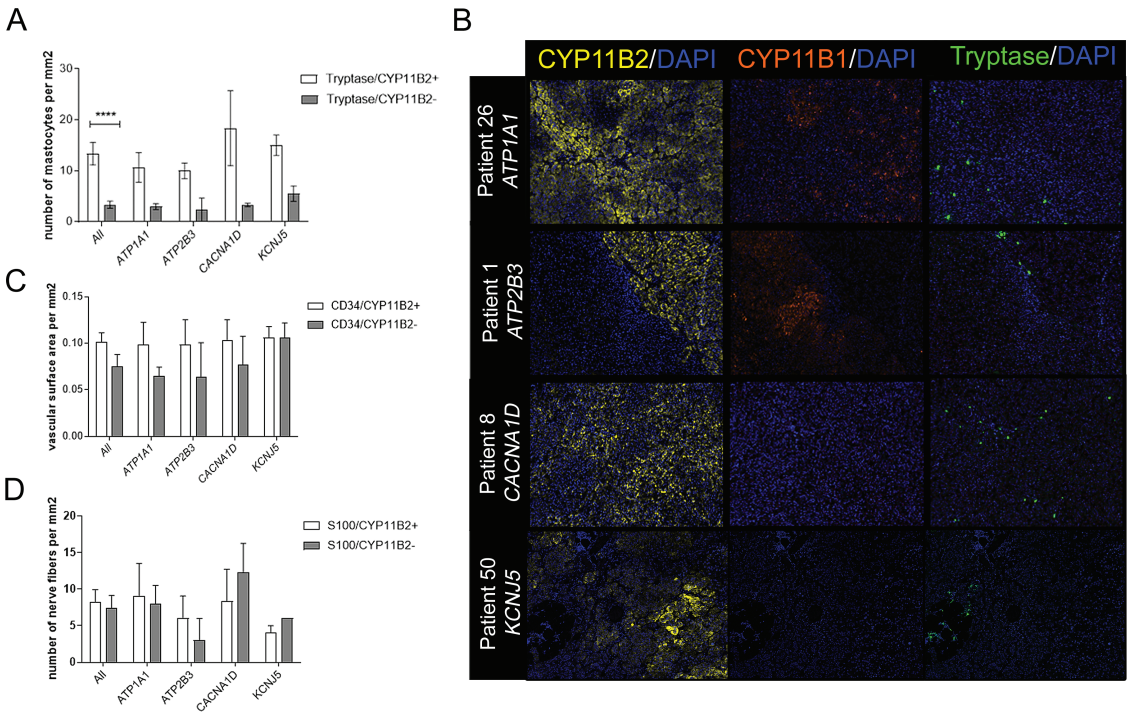


Figure 2. Distribution of components of the microenvironment in different regions of aldosterone-producing adenoma (APA). The number of mast cells (A and B, stained tryptase, $P < .0001$), the vessels' surface (C, stained by CD34, $P = .1214$), and the number of nerve fibers (D, stained by S100 $P = .7346$) were quantified in APA regions expressing aldosterone synthase (CYP11B2+) or not expressing aldosterone synthase (CYP11B2–) using InForm. Eleven APAs carrying *ATP1A1* (n = 3), *ATP2B3* (n = 2), *CACNA1D* (n = 3), and *KCNJ5* (n = 2) mutations were analyzed. *P* values were calculated only for the entire set of APAs (all, n = 11).

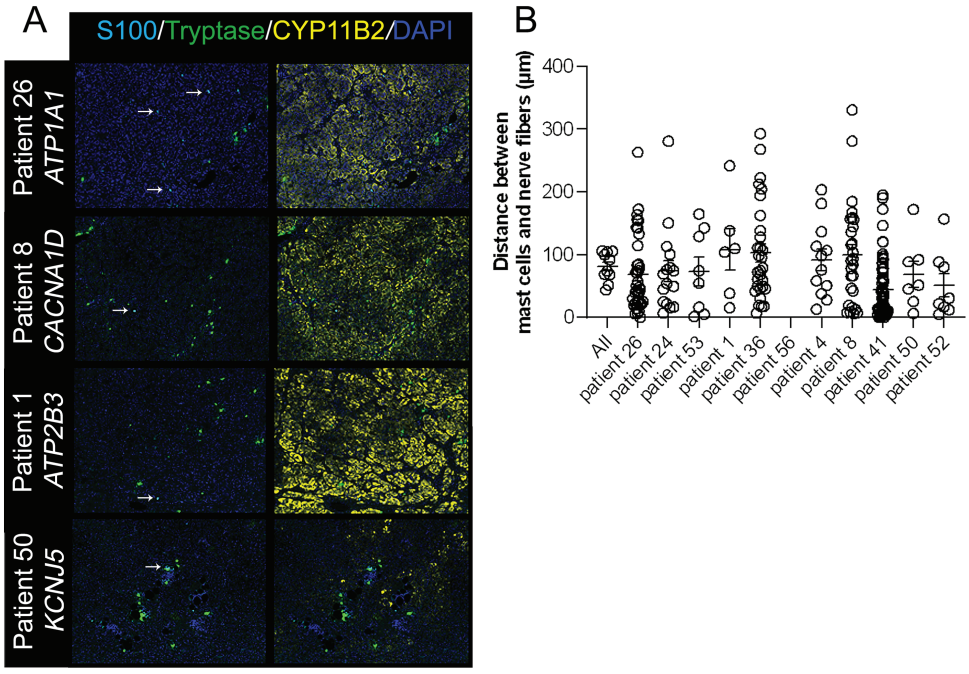


Figure 3. Interaction between nerve fibers and mast cells in aldosterone-producing adenoma (APA). A, The distance between mast cells (stained by tryptase, green) and nerve fibers (stained by S100, cyan) was measured in 11 APAs carrying *ATP1A1* (n = 3), *ATP2B3* (n = 2), *CACNA1D* (n =), and *KCNJ5* (n = 2) mutations. B, Quantification of the distances between mast cells and nerve fibers as analyzed in A represented as the mean of all measures for each individual APA (All) or individually for each APA. CYP11B2 (yellow), DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole; nuclei, blue); white arrows indicate nerve fibers.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

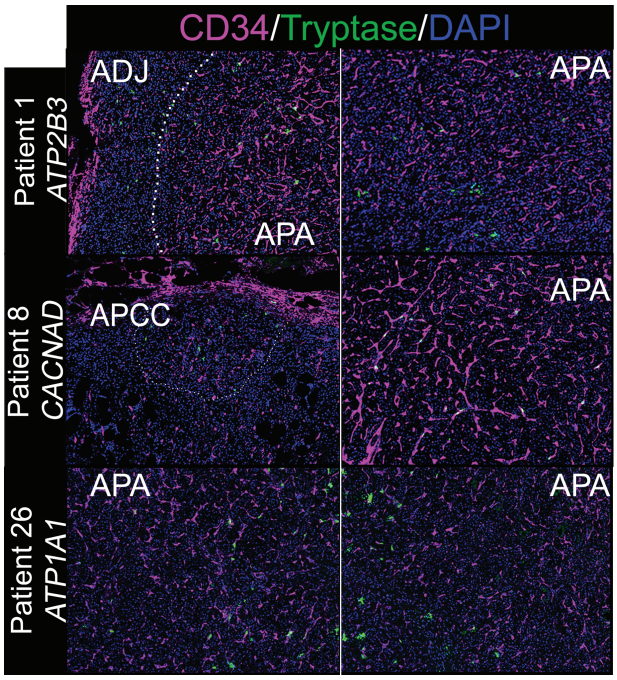


Figure 4. Perivascular localization of mast cells in aldosterone-producing adenoma (APA). APA tissues from 3 patients carrying different mutations were stained by multiplex immunofluorescence for localization of mast cells (tryptase, green) and vessels (CD34, magenta). ADJ, adjacent adrenal cortex. Nuclei are stained in blue by DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole).

that MC2R expression is not correlated to PKA signaling in those cells.

For a better understanding of the control of the ACTH/cAMP signaling pathway in APAs and its interaction with the vascular component, the expression of *MC2R*, *MRAP*, *MRAP2*, and *VEGFA* was investigated by RT-qPCR in 5 APAs included in the multiplex immunofluorescence study. Three APAs carried a *CACNA1D* mutation, 1 carried an *ATP2B3* mutation, and in 1 APA no mutation was identified; in addition, a nodule not expressing CYP11B2 and not carrying somatic mutations in any of the APA driver genes was included (see Table 1, Fig. 6A and 6B). In addition, different areas expressing or not expressing CYP11B2 from 2 APAs carrying *KCNJ5* mutations were also analyzed by RT-qPCR (Fig. 7A).

MC2R messenger RNA was expressed in 3 out of 4 APAs included in our study, although at different levels (Fig. 6C). Interestingly, in one adrenal gland presenting a small APA and a large nodule not expressing CYP11B2, *MC2R* was expressed only in the APA, but not in the CYP11B2-negative nodule (see Fig. 6C). MRAP and MRAP2 are accessory proteins for MC2R signaling (35). *MRAP* expression was observed in APA from patients 25 (nonmutated), 42 (*CACNA1D* mutated), and 56 (*ATP2B3* mutated) (Fig. 6D), but not in APAs from patients 10 and 34 (*CACNA1D* mutated); *MRAP2* was not expressed in any of the samples (data not shown). Within heterogeneous APA carrying *KCNJ5* mutations (Fig. 7A), the expression of the *MC2R* gene was higher in areas expressing CYP11B2 in comparison to areas not expressing CYP11B2 (Fig. 7B). *MRAP* was expressed heterogeneously in APA but independently of CYP11B2 expression (Fig. 7C), while again *MRAP2* expression was not found (data not shown).

The expression of *VEGFA* was found in all APAs as well as in the CYP11B2-negative nodule of patient 56, independently of the APA mutation status (Fig. 6E). Within heterogeneous APAs, expression of *VEGFA* was higher in areas expressing CYP11B2 in comparison to areas not expressing CYP11B2, and grossly followed the pattern of MC2R expression in the majority of zones investigated (Fig. 7D).

Adrenocorticotropin and β-Catenin Signaling Pathways and Paracrine Regulation in Other Aldosterone-Producing Lesions From Adrenals With Aldosterone-producing Adenomas

Within our adrenal samples, several APCC and secondary nodules not expressing CYP11B2 were present, including multiple APCCs in one adrenal with micronodular hyperplasia. The mutational status of 13 APCCs from 3 adrenals carrying an APA, and 4 APCCs and 1 pAATL from 1 adrenal with micronodular hyperplasia had previously been assessed by CYP11B2 immunohistochemistry-guided NGS (10). Three APCC carried *KCNJ5* mutations, 7 carried *CACNA1D* mutations, and in 7 APCCs no mutations were identified (see Table 1). Remarkably, all APCC in adrenals with APAs or with micronodular hyperplasia showed cytoplasmic and/or nuclear β-catenin coexpressed with CYP11B2, independently of the mutational status; nuclear pCREB expression was also observed, indicating an activation of both signaling pathways in APCCs (Fig. 8). For technical reasons, in these structures acquisition of MC2R labeling on Opal was not possible, thus MC2R expression in the same APCC was investigated by IHC. MC2R was strongly expressed at the membrane and in the cytoplasm of cells composing the APCC (Fig. 9). Nuclear pCREB was also strongly expressed in the APCC, as well as in the ZG, similar to activated β-catenin (Fig. 8). Remarkably, accumulation of mast cells was observed around APCCs with a reorganization of the vascular network, where the centripetal capillaries follow the CYP11B2-positive cells (see Fig. 8); in some cases, mast cells were observed in close proximity to vascular cells (see Fig. 4). Nerve fibers labeled by S100 were hardly detected in APCCs.

Remarkably, in the pAATLs the outer part expresses CYP11B2 and the inner part is CYP17A1 positive (Fig. 10). Activated β-catenin, a reduced vascular network, nuclear pCREB expression, and an abundant number of mast cells were observed in the external part of the structure

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

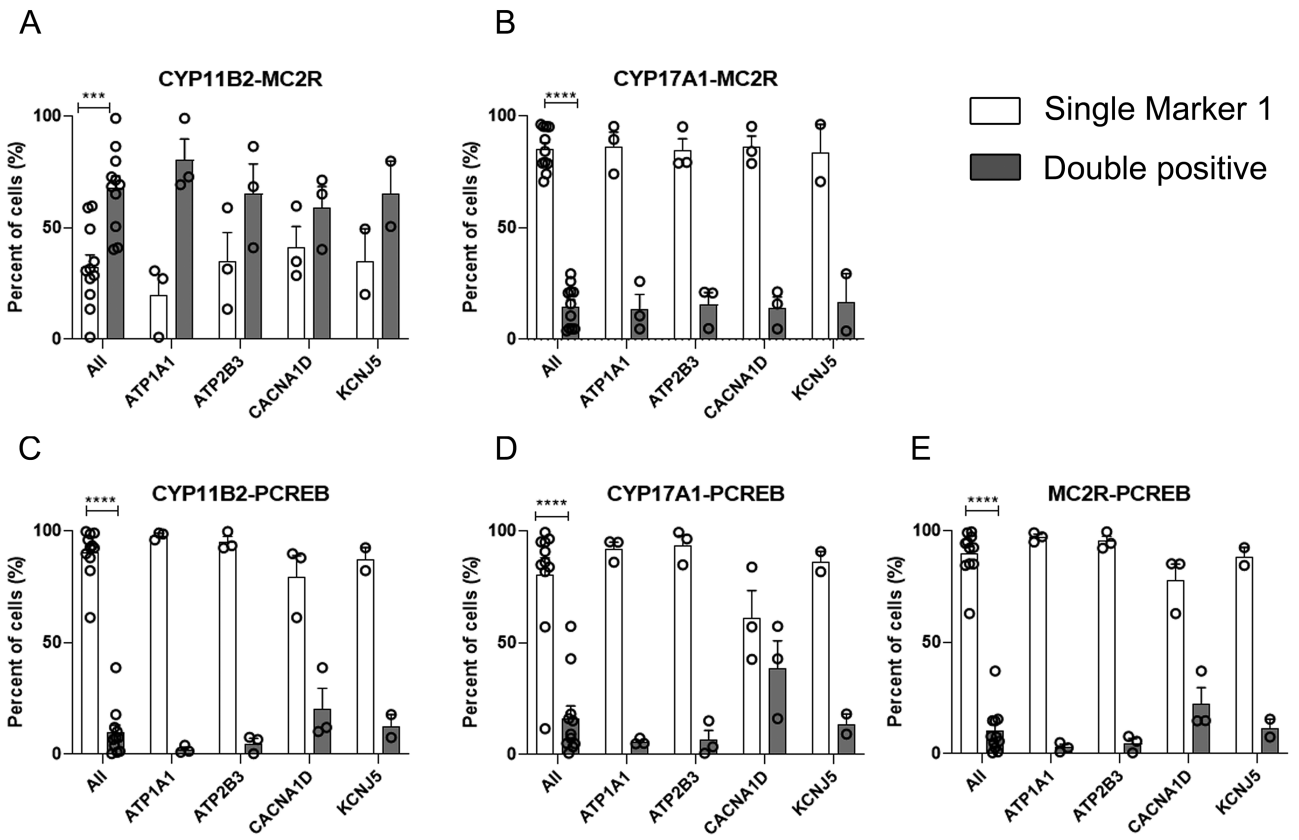


Figure 5. Expression of components of protein kinase A signaling in aldosterone-producing adenoma (APA). Automatic quantification of colocalization of different proteins was analyzed in the entire set of 11 APAs and by mutation status (*ATP1A1*, n = 3; *ATP2B3*, n = 3; *CACNA1D*, n = 3; *KCNJ5*, n = 2). Colocalization of A, CYP11B2-MC2R; B, CYP17A1-MC2R; C, CYP11B2-pCREB (phosphorlyated cAMP response element-binding protein); D, CYP17A1-pCREB; and E, MC2R-pCREB. White bars refer to the percentage of cells expressing only the first marker: A and C, CYP11B2; B and D, CYP17A1; and E, MC2R. Gray bars refer to the percentage of cells coexpressing the second marker together with the first. *P* values were calculated only for the entire set of APA (all, n = 11). *****P* less than .0001; ****P* less than .001.

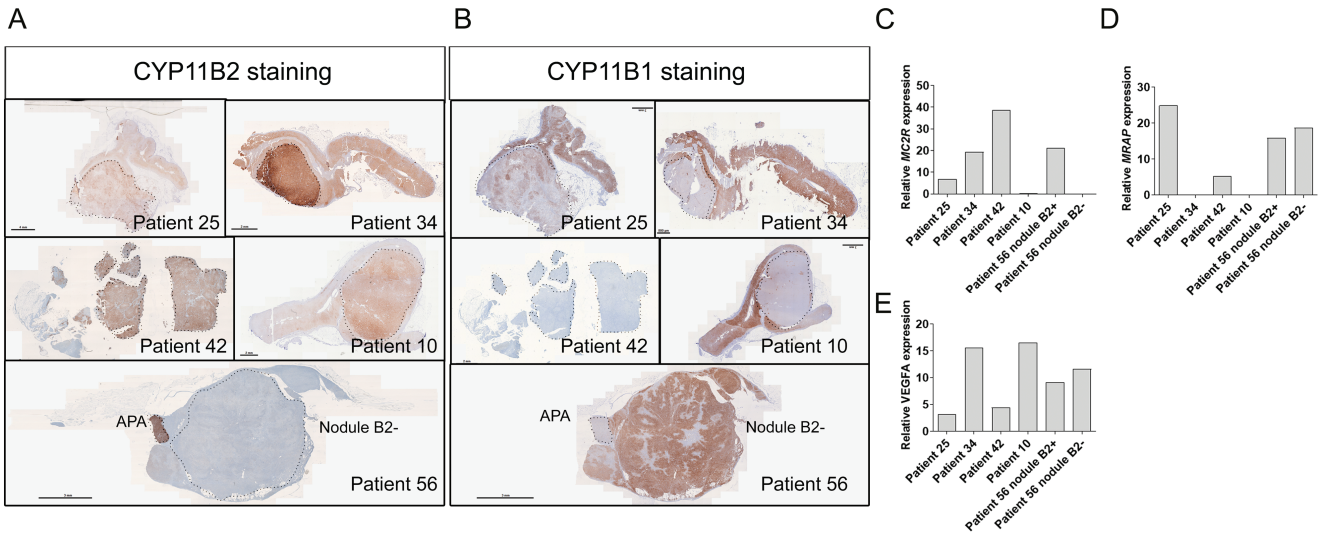


Figure 6. Expression of genes involved in adrenocorticotropin/3′,5′-cyclic AMP signaling and vascularization. A, Aldosterone synthase (CYP11B2), and B, 11β-hydroxylase (CYP11B1) staining in aldosterone-producing adenomas (APAs) from 5 patients. RNA was extracted from 5 APA (patients 25, 34, 42, 10, and 56) and from 1 nodule not expressing CYP11B2 from patient 56. Messenger RNA (mRNA) expression of C, MC2R; D, melanocortin 2 receptor-associated protein (MRAP); and E, vascular endothelial growth factor A (VEGFA) was assessed by reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction. Relative mRNA expression represents mRNA levels of the gene of interest normalized by the geometric mean of 2 housekeeping genes.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

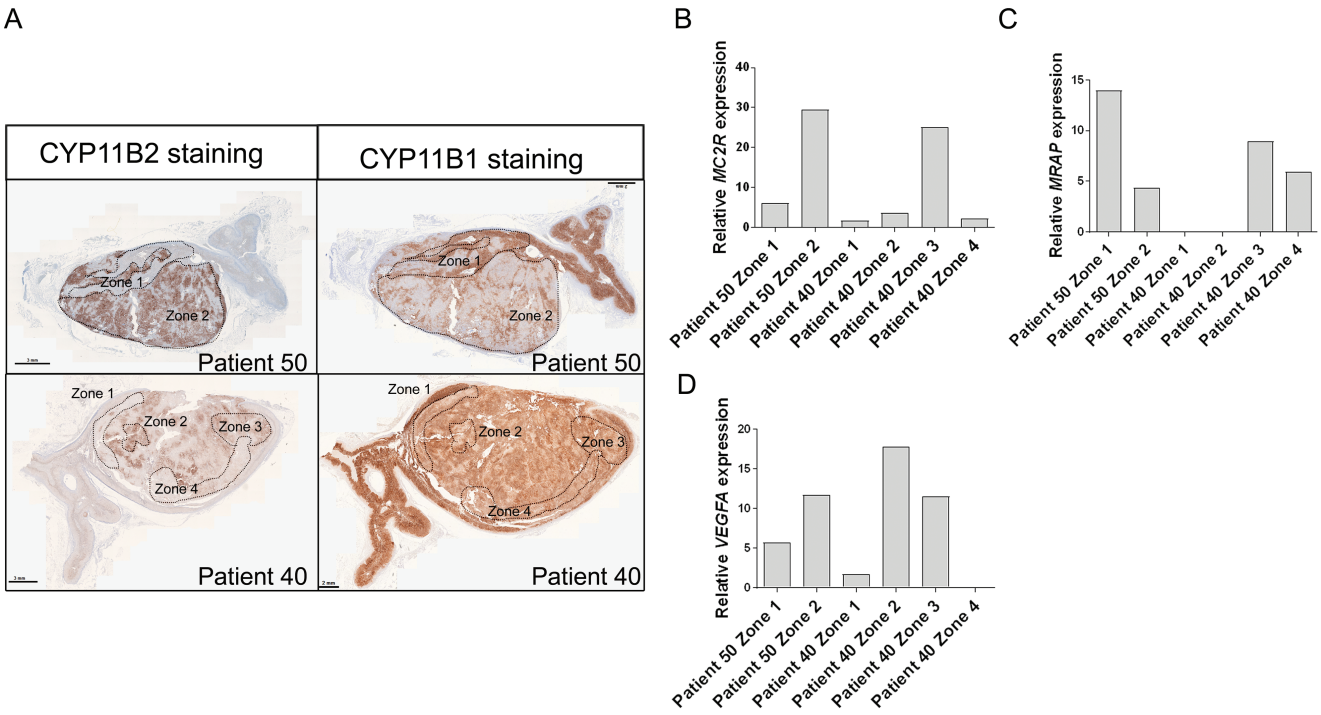


Figure 7. Expression of genes involved in adrenocorticotropin/3′,5′-cyclic AMP signaling and vascularization and intratumoral heterogeneity in *KCNJ5*-mutated aldosterone-producing adenoma (APA). A, Areas with different aldosterone synthase expression from 2 APA carrying a *KCNJ5* mutation (according to De Sousa et al) (10) were investigated. RNA was extracted from one CYP11B2-positive region and one region with mostly negative expression of CYP11B2 from patient 50, and 2 CYP11B2-positive regions and 2 regions with mostly negative expression of CYP11B2 from patient 40. Messenger RNA (mRNA) expression of B, *MC2R*; C, melanocortin 2 receptor-associated protein (*MRAP*); and D, vascular endothelial growth factor A (*VEGFA*) was assessed by reverse transcription–quantitative polymerase chain reaction. Relative mRNA expression represents mRNA levels of the gene of interest normalized by the geometric mean of 2 housekeeping genes.

coexpressed with CYP11B2 (see Fig. 10). In contrast, the inner part of the pAATL did not express activated β-catenin and pCREB, showed a more organized vascular network, and fewer mast cells. MC2R expression was homogeneous in the pAATL (see Fig. 10). This differential pattern was observed, although the inner and outer part of the pAATL carry the same *CACNA1D* mutation (see Table 1).

A secondary nodule not expressing CYP11B2 from patient 56 was also analyzed. This nodule, which does not carry a somatic mutation (see Table 1), expresses CYP17A1, shows nuclear expression of pCREB and heterogeneous expression of activated β-catenin but no expression of MC2R (Fig. 11).

Discussion

The Wnt/β-catenin, ACTH/cAMP/PKA signaling pathways, and paracrine pathways play an important role in steroidogenesis and adrenal development (36), but their role in the development of APAs and other aldosterone-producing structures in the context of somatic mutations as well as their interactions remain unclear. Although previous studies have investigated individual components of these pathways independently, here we applied multiplex immunofluorescence and multispectral image analysis to investigate proteins involved in aldosterone (CYP11B2) and cortisol (CYP11B1/CYP17A1) biosynthesis, in addition to markers of Wnt/β-catenin (β-catenin) and ACTH/cAMP/PKA (MC2R, pCREB) signaling, as well as paracrine pathways of the tumor microenvironment (tryptase, S100) and vascularization (CD34), in adrenals with APAs and with micronodular hyperplasia. Our results show a high abundance of mast cells and dense vascularization in APAs that are independent of the mutation status. Mast cells were mainly localized in zones expressing aldosterone synthase within the tumor. In cells expressing aldosterone synthase, β-catenin is activated and MC2R is highly expressed and found at the cell membrane; *VEGFA* expression was more important in areas expressing CYP11B2, suggesting regulation by ACTH signaling. In APCC, β-catenin is activated and coexpressed with aldosterone-synthase; a high number of mast cells are observed in these areas, with a reorganization of the blood vessels following the cellular arrangement of steroidogenic cells. Strong nuclear pCREB expression was also observed in these structures, together with MC2R expression.

Our results confirm that mast cells are abundant in APAs (27). In addition, our study shows that mast cells

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

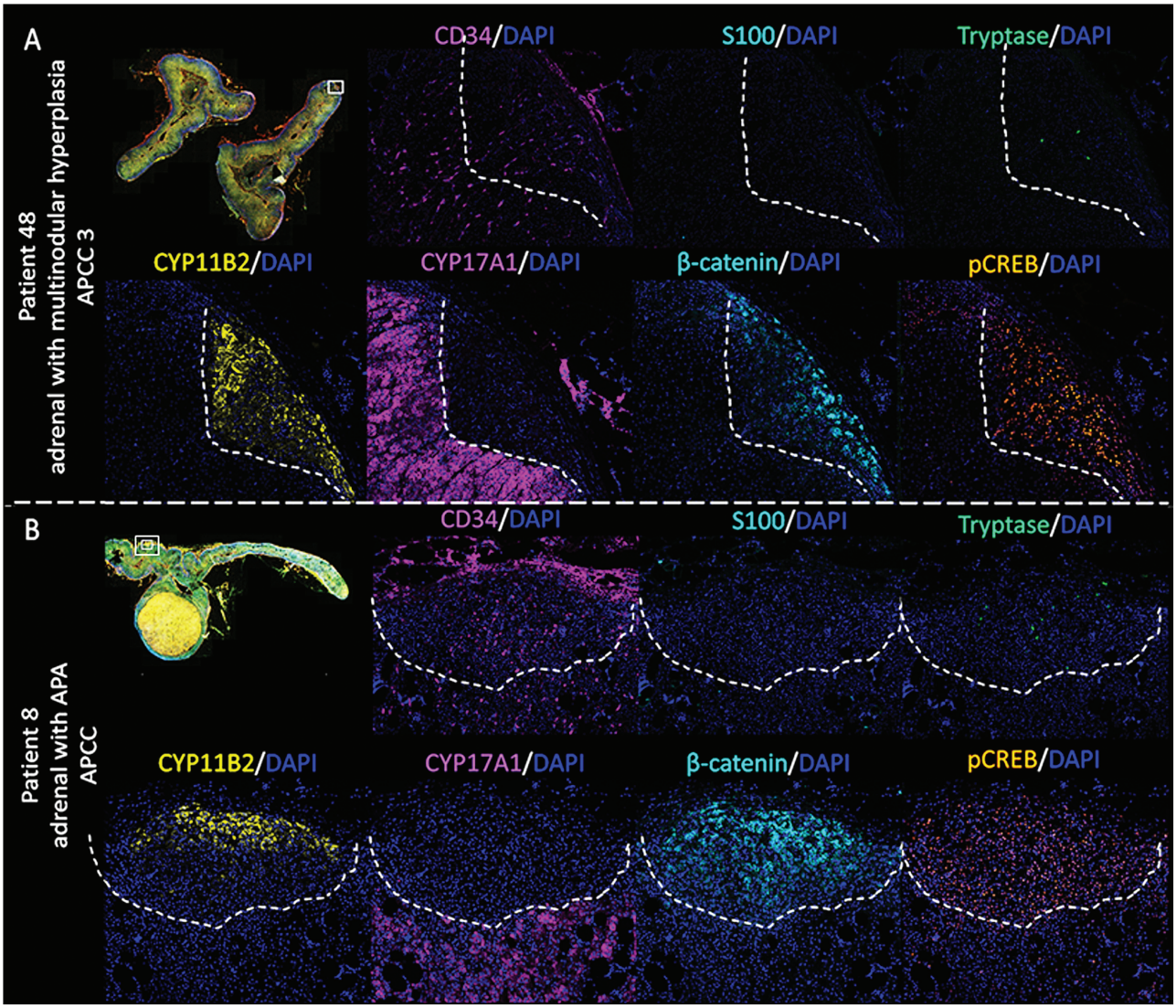


Figure 8. Expression and activation of signaling pathways and paracrine pathways in aldosterone-producing cell clusters (APCCs). Colocalization of CD34 (vessels), S100 (nerve fibers), tryptase (mast cells), CYP11B2 (aldosterone-synthase), CYP17A1 (17α-hydroxylase), β-catenin, and phosphorlyated cAMP response element-binding protein (pCREB) by multiplex immunofluorescence in one APCC from an adrenal with A, multinodular hyperplasia, and in one APCC from an adrenal with B, aldosterone-producing adenoma (APA).

accumulate next to CYP11B2-positive cells in APAs, supporting their specific contribution to aldosterone biosynthesis. Indeed, several studies have demonstrated that mast cells are able to stimulate aldosterone production through the secretion of serotonin and the activation of intracellular calcium signaling (37-39). It is well known that the adrenal cortex is richly innervated and contains vasoactive intestinal peptide, substance P, and neuropeptide Y peptidergic fibers, which may influence aldosterone synthesis through a paracrine regulation (26). Although it has been shown that neuronal mechanisms are involved in mast cell activation (24), supporting the possibility that the sympathetic system can influence the function of a subgroup of APA, colocalization of mast cells and nerve fibers was rarely observed in APAs in our study, suggesting that mast cell degranulation is not primarily stimulated by nerve fibers. These results are in accordance with previous work showing only occasional contacts between mast cells and nerve fibers in APA tissues (24). However, although we have quantified between 50% and 100% of the surface of each APA, we cannot exclude that some interactions may have been missed; also, local concentrations of neurotransmitters may signal to mast cells at distance.

The Wnt/β-catenin and ACTH/cAMP/PKA signaling pathways both are involved in cell differentiation and function of the ZG and ZF. Although only approximately 5% of APAs carry *CTNNB1* mutations, β-catenin is activated in a majority of them (40). In certain cases, *CTNNB1* mutations alone, arising in the ZG, may suffice to induce development of APAs, maintaining the ZG phenotype of the tumor. In other cases, *CTNNB1* may contribute to tumor formation in APAs carrying other types of mutations, by

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

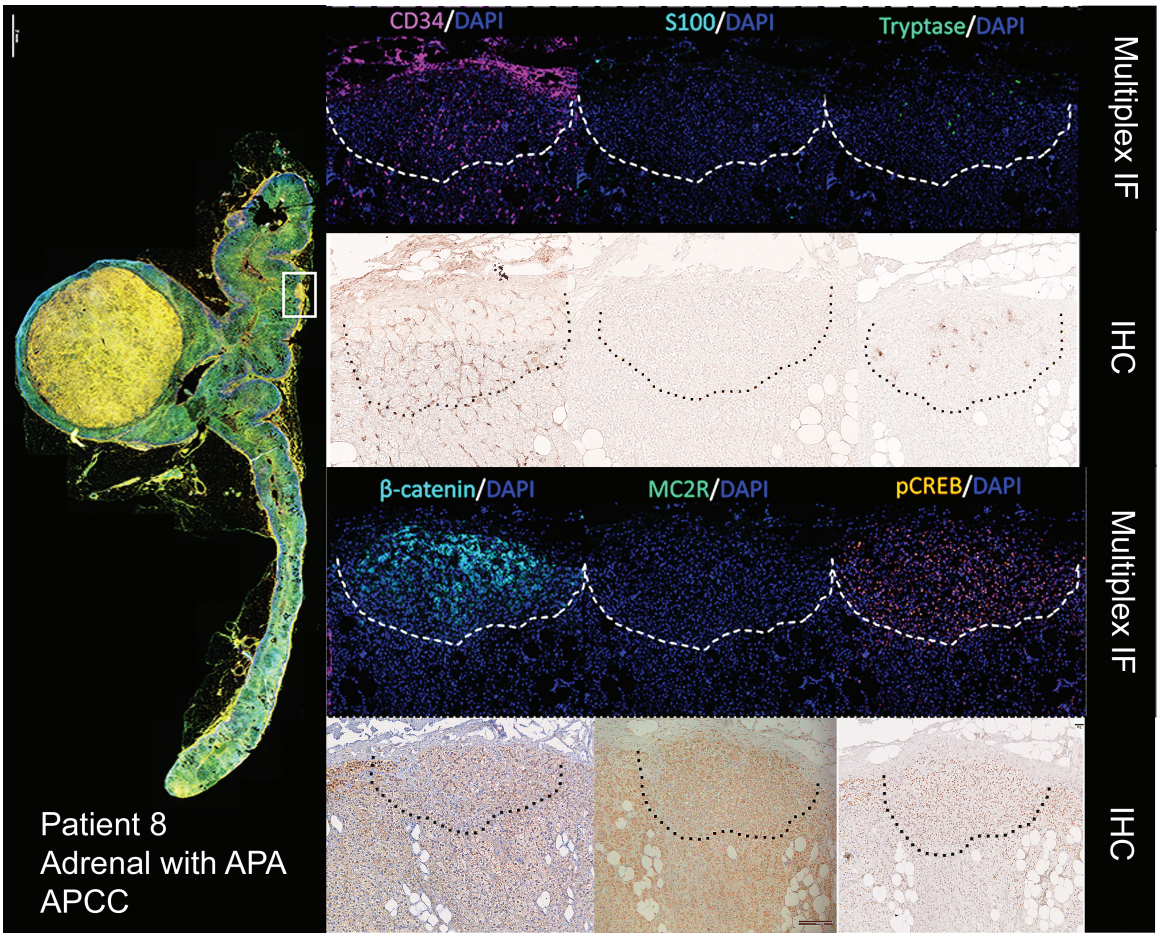


Figure 9. Comparison between immunohistochemistry (IHC) and multiplex immunofluorescence in aldosterone-producing cell clusters (APCCs). For technical reasons, acquisition of melanocortin type 2 receptor (MC2R) marking on Opal was not possible, thus we have investigated in IHC expression of all other markers in the same APCCs analyzed in multiplex immunofluorescence.

promoting cell proliferation or nodule formation either as a first hit due to somatic mutations or because of its activation due to mechanisms that need to be identified. The 2-hit model is supported by the identification of somatic *GNAQ*/*GNA11* mutations in *CTNNB1*-mutated APAs in patients with PA presenting at puberty, pregnancy, or menopause (18), as well as the occurrence of *KCNJ5* mutations in adrenals from patients with familial adenomatous polyposis carrying germline *APC* gene mutations (41).

Previous studies have shown that the expression of MC2R is higher in APAs compared to the normal adrenal gland (42). Our results showed that MC2R was highly expressed in areas expressing CYP11B2 in APAs, a result that was confirmed by *MC2R* gene expression studies of different regions of APAs expressing or not expressing CYP11B2. In contrast, expression of pCREB in APAs was low and did not show any particular colocalization with CYP11B2, CYP17A1, or MC2R, suggesting that CREB phosphorylation is independent of MC2R activation in APAs. We further investigated the activity of the ACTH signaling pathway by studying 2 accessory proteins, MRAP and MRAP2, known to initiate or inhibit MC2R activation, respectively (43). While we did not observe any expression of *MRAP2*, the expression of *MRAP* was heterogeneous and independent of CYP11B2 expression, both across APAs and within heterogeneous APAs carrying *KCNJ5* mutations. Altogether, these results suggest that in APAs, ACTH may be involved in the regulation of aldosterone production by signaling through MC2R/MRAP and activation of calcium rather than CREB signaling. Indeed, activation of calcium signaling by ACTH has been previously shown, involving activation, through phosphorylation via PKA, of voltage-gated calcium channels (23, 44, 45).

APAs are highly vascularized structures. Although we did not observe intratumoral heterogeneity in vascularization by multiplex immunofluorescence, *VEGFA* expression was more important in areas expressing CYP11B2 in contrast to areas not expressing CYP11B2. The increase of *VEGFA* expression in these areas may be explained by the presence of perivascular mast cells, which are involved in the maintenance of angiogenesis, as shown in pancreatic islet tumors (46), or alternatively by the activation of the ACTH/cAMP pathway via MC2R, as MC2R is highly expressed in these same regions. Indeed, in the adrenal gland,

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

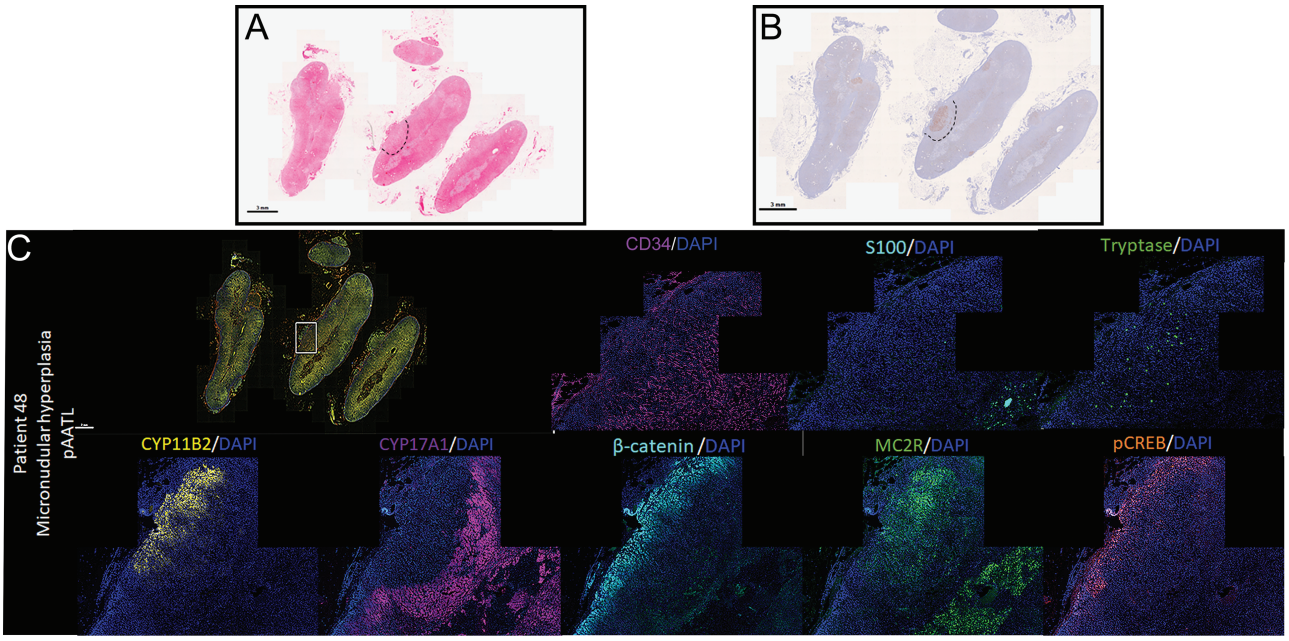


Figure 10. Expression and activation of signaling pathways and paracrine pathways in possible aldosterone-producing cell clusters to aldosterone-producing adenoma translational lesions (pAATLs). A, Hematoxylin-eosin-safran, and B, aldosterone-synthase (CYP11B2) staining in one adrenal (patient 48) with micronodular hyperplasia showing the presence of one pAATL. C, Expression of CD34 (vessels), S100 (nerve fibers), tryptase (mast cells), CYP11B2, CYP17A1 (17α-hydroxylase), β-catenin, melanocortin receptor type 2 (MC2R), and phosphorlyated cAMP response element-binding protein (pCREB) by multiplex immunofluorescence.

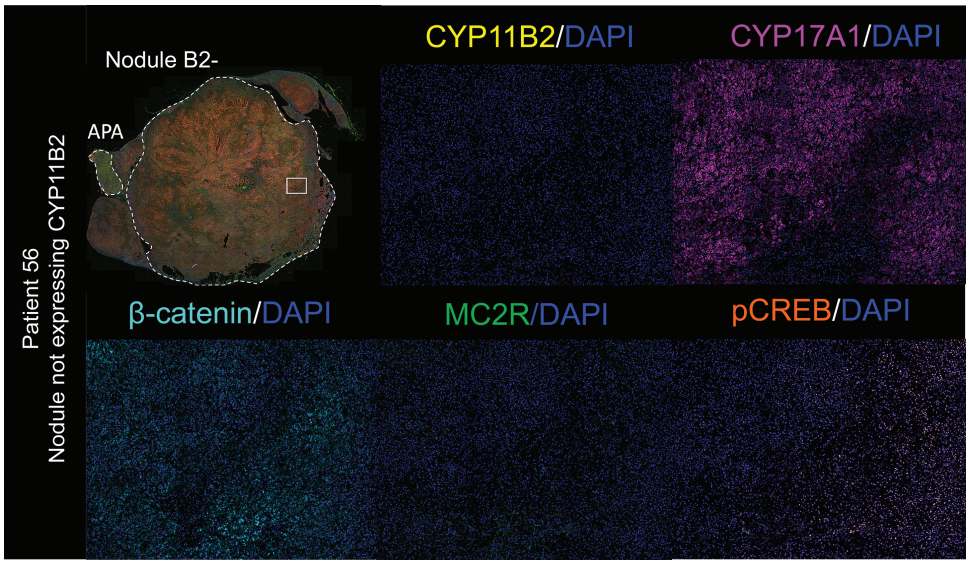


Figure 11. Wnt/β-catenin and adrenocorticotropin/3′,5′-cyclic AMP signaling in a nodule not expressing aldosterone synthase in an adrenal with aldosterone-producing adenoma (APA). Colocalization of aldosterone synthase (CYP11B2), 17α-hydroxylase (CYP17A1), β-catenin, melanocortin receptor type 2 (MC2R), and phosphorlyated cAMP response element-binding protein (pCREB) by multiplex immunofluorescence in a nodule not expressing aldosterone synthase in one adrenal with APA (patient 56).

ACTH stimulates the release of VEGF and the stabilization of its messenger RNA (47). Furthermore, it has been suggested that changes in the vascular supply of the adrenal cortex, because of the phenomena of atherosclerosis or high blood pressure, may influence the function of the adrenal cortex, resulting in compensatory adrenal cortex hyperplasia and eventually nodulation (48).

Remarkably, investigation of APCCs revealed similar patterns of expression as observed in APAs, although with some peculiar features. We observed abundant mast cells in APCCs, supporting a role for paracrine regulation of autonomous aldosterone production in these structures. The localization of mast cells close to blood vessels and within CYP11B2-positive areas suggest they may influence

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

mineralocorticoid production directly and/or via the blood flow. Furthermore, all APCCs in adrenals with APAs or with micronodular hyperplasia showed nuclear and/or cytoplasmic β-catenin coexpressed with CYP11B2, independently of mutational status. In contrast to APAs, strong nuclear pCREB expression was also observed, together with MC2R expression, suggesting ACTH signaling via PKA/pCREB in APCCs. *MC2R* was previously identified as a highly expressed gene in APCCs (14). These results indicate that in APCC both ACTH/cAMP as well as Wnt/β-catenin signaling are activated, suggesting that APCCs may be intermediary structures in terms of cell lineage between the ZG and the ZF. This hypothesis is supported by previous work showing characteristics of both ZG and ZF within the same structures (49). The presence of mast cells in these structures may contribute to the activation of PKA signaling pathway via serotonin/5HT4 signaling (50) and be involved in the autonomous aldosterone production. The additional activity of the calcium signaling pathway in regulating CYP11B2 expression and aldosterone production in APCCs is supported by the presence of somatic mutations in APA-driver genes that have been previously shown to activate calcium signaling. These finding suggests that different signaling pathways are involved in the development and maintenance of APCCs.

Remarkably, in a nodule not expressing CYP11B2 from an adrenal with APAs, mast cells were present but localized to the areas not expressing CYP11B1 either. This is consistent with previous studies showing that mast cell proliferation is observed in a deoxycorticosterone-secreting tumor and APAs but not in cortisol-secreting adenomas (51), suggesting that mast cells may preferentially favor proliferation of glomerulosa cells (24) and mineralocorticoid secretion.

In conclusion, our results show that aldosterone-producing structures in adrenals with APAs share common molecular characteristics and cellular environments, despite different mutation status, suggesting common developmental mechanisms. In particular, mast cells appear to be closely associated with cells expressing aldosterone synthase, both in APAs and APCCs, and their degranulation seems not to be regulated by innervation. In these same areas, activation of ß-catenin indicates a ZG cell identity. Activation of PKA signaling was heterogeneous in aldosterone-producing structures, suggesting different signaling pathways activated by ACTH and serotonin to drive aldosterone biosynthesis.

Acknowledgments

The authors wish to thank CE Gomez-Sanchez (University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi) for providing antibodies against CYP11B1 and CYP11B2.

Financial Support: This work was supported by institutional support from Inserm, the Agence Nationale de la Recherche (grant No. ANR-15-CE14-0017-03), and the Fondation pour la Recherche Médicale (grant No. DEQ20140329556).

Additional Information

Correspondence: Maria-Christina Zennaro, MD, PhD, Inserm, U970, Paris Cardiovascular Research Center–PARCC, 56, rue Leblanc, 75015 Paris, France. Email: maria-christina.zennaro@inserm.fr.

Disclosures: The authors have nothing to disclose.

Data Availability: Some or all data sets generated during and/or analyzed during the present study are not publicly available but are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Funder JW, Carey RM, Mantero F, et al. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(5):1889-1916.
2. Monticone S, Burrello J, Tizzani D, et al. Prevalence and clinical manifestations of primary aldosteronism encountered in primary care practice. *J Am Coll Cardiol*. 2017;**69**(14):1811-1820.
3. Hannemann A, Wallaschofski H. Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies—a review of the current literature. *Horm Metab Res*. 2012;**44**(3):157-162.
4. Brown JM, Siddiqui M, Calhoun DA, et al. The unrecognized prevalence of primary aldosteronism: a cross-sectional study. *Ann Intern Med*. 2020;**173**(1):10-20.
5. Savard S, Amar L, Plouin PF, Steichen O. Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension*. 2013;**62**(2):331-336.
6. Monticone S, D'Ascenzo F, Moretti C, et al. Cardiovascular events and target organ damage in primary aldosteronism compared with essential hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2018;**6**(1):41-50.
7. Fernandes-Rosa FL, Boulkroun S, Zennaro MC. Genetic and genomic mechanisms of primary aldosteronism. *Trends Mol Med*. 2020;**26**(9):819-832.
8. Nanba K, Omata K, Else T, et al. Targeted molecular characterization of aldosterone-producing adenomas in White Americans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;**103**(10):3869-3876.
9. Nanba K, Omata K, Gomez-Sanchez CE, et al. Genetic characteristics of aldosterone-producing adenomas in blacks. *Hypertension*. 2019;**73**(4):885-892.
10. De Sousa K, Boulkroun S, Baron S, et al. Genetic, cellular, and molecular heterogeneity in adrenals with aldosterone-producing adenoma. *Hypertension*. 2020;**75**(4):1034-1044.
11. Ono Y, Yamazaki Y, Omata K, et al. Histological characterization of aldosterone-producing adrenocortical adenomas with different somatic mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;**105**(3):e282-e289.
12. Nanba K, Yamazaki Y, Bick N, et al. Prevalence of somatic mutations in aldosterone-producing adenomas in Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;**105**(11):e4066-e4073.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

13. Williams TA, Gomez-Sanchez CE, Rainey WE, et al. International histopathology consensus for unilateral primary aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;**106**(1):42-54.
14. Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, et al. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;**112**(33):E4591-E4599.
15. Nishimoto K, Seki T, Kurihara I, et al. Case report: nodule development from subcapsular aldosterone-producing cell clusters causes hyperaldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(1):6-9.
16. Scholl UI, Healy JM, Thiel A, et al. Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;**83**(6):779-789.
17. Åkerström T, Maharjan R, Sven Willenberg H, et al. Activating mutations in *CTNNB1* in aldosterone producing adenomas. *Sci Rep*. 2016;**6**:19546.
18. Zhou J, Azizan EAB, Cabrera CP, et al. Somatic mutations of GNA11 and GNAQ in CTNNB1-mutant aldosterone-producing adenomas presenting in puberty, pregnancy or menopause. *Nat Genet*. 2021;**53**(9):1360-1372.
19. Rhayem Y, Perez-Rivas LG, Dietz A, et al. PRKACA somatic mutations are rare findings in aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(8):3010-3017.
20. Drelon C, Berthon A, Mathieu M, Martinez A, Val P. Adrenal cortex tissue homeostasis and zonation: a WNT perspective. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;**408**:156-164.
21. Pignatti E, Leng S, Yuchi Y, et al. Beta-catenin causes adrenal hyperplasia by blocking zonal transdifferentiation. *Cell Rep*. 2020;**31**(3):107524.
22. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005;**186**(1):1-20.
23. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;**350**(2):151-162.
24. Duparc C, Moreau L, Dzib JF, et al. Mast cell hyperplasia is associated with aldosterone hypersecretion in a subset of aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;**100**(4):E550-E560.
25. 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.
26. Wils J, Duparc C, Cailleux AF, et al. The neuropeptide substance P regulates aldosterone secretion in human adrenals. *Nat Commun*. 2020;**11**(1):2673.
27. Lopez AG, Duparc C, Naccache A, Castanet M, Lefebvre H, Louiset E. Role of mast cells in the control of aldosterone secretion. *Horm Metab Res*. 2020;**52**(6):412-420.
28. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: challenges and controversies. *Exp Dermatol*. 2017;**26**(9):751-759.
29. Hinson JP, Vinson GP, Kapas S, Teja R. The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1991;**40**(1-3):381-389.
30. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ. Role of adrenocorticotropic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech*. 2003;**61**(3):247-251.
31. Feige JJ. Angiogenesis in adrenocortical physiology and tumor development. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2009;**70**(3):153-155.
32. Funder JW, Carey RM, Fardella C, et al; Endocrine Society. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;**93**(9):3266-3281.
33. Amar L, Baguet JP, Bardet S, et al. SFE/SFHTA/AFCE primary aldosteronism consensus: introduction and handbook. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2016;**77**(3):179-186.
34. Baron S, Amar L, Faucon AL, et al. Criteria for diagnosing primary aldosteronism on the basis of liquid chromatography-tandem mass spectrometry determinations of plasma aldosterone concentration. *J Hypertens*. 2018;**36**(7):1592-1601.
35. Webb TR, Clark AJ. Minireview: the melanocortin 2 receptor accessory proteins. *Mol Endocrinol*. 2010;**24**(3):475-484.
36. Pignatti E, Leng S, Carlone DL, Breault DT. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;**441**:146-155.
37. Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, 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;**86**(10):5001-5007.
38. Boyer HG, Wils J, Renouf S, et al. Dysregulation of aldosterone secretion in mast cell-deficient mice. *Hypertension*. 2017;**70**(6):1256-1263.
39. 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;**121**(2):253-260.
40. Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, et al. WNT/β-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Hum Mol Genet*. 2014;**23**(4):889-905.
41. Vouillarmet J, Fernandes-Rosa F, Graeppi-Dulac J, et al. Aldosterone-producing adenoma with a somatic KCNJ5 mutation revealing APC-dependent familial adenomatous polyposis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(11):3874-3878.
42. Ye P, Mariniello B, Mantero F, Shibata H, Rainey WE. G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol*. 2007;**195**(1):39-48.
43. Novoselova TV, Jackson D, Campbell DC, Clark AJ, Chan LF. Melanocortin receptor accessory proteins in adrenal gland physiology and beyond. *J Endocrinol*. 2013;**217**(1):R1-11.
44. El Ghorayeb N, Bourdeau I, Lacroix A. Role of ACTH and other hormones in the regulation of aldosterone production in primary aldosteronism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;**7**:72.
45. Gallo-Payet N. 60 Years of POMC: adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. *J Mol Endocrinol*. 2016;**56**(4):T135-T156.
46. Soucek L, Lawlor ER, Soto D, Shchors K, Swigart LB, Evan GI. Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. *Nat Med*. 2007;**13**(10):1211-1218.
47. 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 (Lausanne)*. 2016;**7**:98.
48. Sasano H, Suzuki T, Moriya T. Adrenal cortex. In: Lloyd RV, ed. *Endocrine Pathology*. Humana Press; 2004.
49. Boulkroun S, Samson-Couterie B, Golib-Dzib JF, et al. Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers. *Endocrinology*. 2011;**152**(12):4753-4763.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

50. Louiset E, Duparc C, Lefebvre H. Role of serotonin in the paracrine control of adrenal steroidogenesis in physiological and pathophysiological conditions. *Curr Opin Endocr Metab*. 2019;**8**:50-59.

51. Lefebvre H, Duparc C, Naccache A, Lopez AG, Castanet M, Louiset E. Paracrine regulation of aldosterone secretion in physiological and pathophysiological conditions. *Vitam Horm*. 2019;**109**:303-339.

Downloaded from https://academic.oup.com/jcem/article/107/2/419/6376054 by guest on 28 February 2022

8.3 Discussion

L'expression de protéines marqueurs de l'origine et de la fonction cellulaire : des marqueurs de la biosynthèse d'aldostérone (CYP11B2) et du cortisol (CYP11B1/CYP17A1), des marqueurs de la signalisation Wnt/β-caténine (β-caténine) et ACTH/cAMP/PKA (MC2R, pCREB), ainsi que des voies paracrines du microenvironnement tumoral et des interactions cellule endocrines – vaisseaux (mastocytes (tryptase), fibres nerveuses (S100) et vaisseaux (CD34)), ont été étudiées dans des tissus surrénaliens de 14 patients avec APA par une technique d'immunofluorescence multiplexe (méthodologie Opal). Les analyses ont été réalisées sur des coupes de surrénales avec APA et une hyperplasie multinodulaire, permettant d'étudier également le tissu péritumoral adjacent. Dans ces tissus, la quantification des mastocytes et des fibres nerveuses a révélé leur abondance dans les APA ainsi que dans les APCCs (Aldosterone Producing Cell Clusters), de petits amas de cellules responsables d'une production autonome d'aldostérone, dont le nombre augmente avec l'âge. En particulier, dans les APA comme dans les APCC, nous avons observé une forte expression de CYP11B2, de la β-caténine activée et de nombreux mastocytes. Les voies de signalisation Wnt/β-caténine, ACTH/cAMP/PKA et les voies paracrines jouent un rôle important dans la stéroïdogenèse et le développement des surrénales (Pignatti et al. 2017) , mais leur rôle dans le développement des APA et d'autres structures productrices d'aldostérone dans le contexte de mutations somatiques ainsi que leurs interactions restent à vérifier. Nos résultats montrent une forte abondance de mastocytes et une vascularisation dense dans les APA qui sont indépendants du statut mutationnel. Les mastocytes étaient principalement localisés dans les zones exprimant l'aldostérone synthase au sein de la tumeur. Dans les cellules exprimant l'aldostérone synthase, la β-caténine était activée et le MC2R était fortement exprimé et se trouvait à la membrane cellulaire ; l'expression du VEGFA était plus importante dans les zones exprimant CYP11B2, suggérant une régulation par la signalisation de l'ACTH. Dans les APCC, nous avons montré que la β-caténine était activée et coexprimée avec l'aldostérone-synthase ; un nombre élevé de mastocytes était également observé dans ces zones, avec une réorganisation des vaisseaux sanguins suivant l'arrangement cellulaire des cellules stéroïdogènes. Une forte expression nucléaire de pCREB a également été observée dans ces structures, ainsi que l'expression de MC2R.

Notre étude montre que les mastocytes s'accumulent à côté des cellules CYP11B2 positives dans les APA, ce qui soutient leur contribution spécifique à la biosynthèse d'aldostérone. En effet, la sécrétion de sérotonine et l'activation de la signalisation calcique intracellulaire par les mastocytes ont été démontré être capables de stimuler la production d'aldostérone (H. Lefebvre et al. 2001; Boyer et al.

2017; Hinson et al. 1989). Dans cette étude, la colocalisation des mastocytes et des fibres nerveuses a rarement été observée dans les APA, suggérant que la dégranulation des mastocytes n'est pas principalement stimulée par les fibres nerveuses. Cependant, il a été démontré que des mécanismes neuronaux sont impliqués dans l'activation des mastocytes (Duparc et al. 2015), soutenant la possibilité que le système sympathique puisse influencer la fonction d'un sous-groupe d'APA. Cela peut être expliqué par le fait qu'on a quantifié entre 50 % et 100 % de la surface de chaque APA, nous ne pouvons pas exclure que certaines interactions aient pu être manquées ; de plus, des concentrations locales de neurotransmetteurs peuvent envoyer des signaux aux mastocytes à distance.

Aucune hétérogénéité intratumorale dans la vascularisation n'a été observée par immunofluorescence multiplex, cependant, l'expression du VEGFA était plus importante dans les zones exprimant CYP11B2 par rapport aux zones n'exprimant pas CYP11B2. L'augmentation de l'expression du VEGFA dans ces zones pourrait être due à la présence de mastocytes périvasculaires, qui sont impliqués dans le maintien de l'angiogenèse, comme cela a été montré dans les tumeurs des îlots pancréatiques (Soucek et al. 2007), ou alternativement par l'activation de la voie ACTH/cAMP via MC2R. De plus, il a été suggéré que des changements dans l'approvisionnement vasculaire de la corticosurrénale, en raison des phénomènes d'athérosclérose ou d'hypertension artérielle, peuvent influencer la fonction de la corticosurrénale, entraînant une hyperplasie compensatoire de la corticosurrénale et éventuellement une nodulation.

Dans notre étude, nous avons montré que le MC2R était fortement exprimé dans les zones exprimant CYP11B2 dans les APA ce qui explique les résultats d'augmentation de son expression dans des études antérieures (Ye et al. 2007). Par contre, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de CREB est indépendante de l'activation de MC2R dans les APA puisque l'expression de pCREB était faible. Nous avons également étudié l'activité de la voie de signalisation de l'ACTH en étudiant 2 protéines accessoires, MRAP et MRAP2, connues pour initier ou inhiber l'activation de MC2R, respectivement (Novoselova et al. 2013). L'expression de MRAP était hétérogène et indépendante de l'expression de CYP11B2, à la fois dans les APA homogènes et au sein des APA hétérogènes portant des mutations de *KCNJ5*. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que dans les APA, l'ACTH peut être impliquée dans la régulation de la production d'aldostérone par une signalisation via MC2R/MRAP et une activation de la voie de signalisation du calcium plutôt que par la signalisation CREB.

De façon remarquable, l'étude des APCC a révélé des schémas d'expression similaires à ceux observés dans les APA, bien qu'avec certaines caractéristiques particulières. Nous avons observé une abondance de mastocytes dans les APCC, ce qui soutient un rôle de régulation paracrine de la production autonome d'aldostérone dans ces structures. En outre, tous les APCC dans les surrénales avec APA ou

avec hyperplasie micronodulaire ont montré une localisation de la β-caténine nucléaire et/ou cytoplasmique coexprimée avec CYP11B2, indépendamment du statut mutationnel. Contrairement aux APA, une forte expression nucléaire de pCREB a également été observée, ainsi que l'expression de MC2R, suggérant une signalisation de l'ACTH via PKA/pCREB dans les APCC. Ces résultats indiquent que dans les APCC, la voie de signalisation ACTH/cAMP ainsi que la voie de signalisation Wnt/β-caténine sont activées, ce qui suggère que les APCC pourraient être des structures intermédiaires en termes de lignage cellulaire entre la ZG et la ZF. Ces travaux suggèrent que les différentes structures productrices d'aldostérone dans les surrénales avec APA partagent des caractéristiques moléculaires et un environnement cellulaire communs, malgré des statuts mutationnels différents, ce qui suggère des mécanismes de développement communs.

9. Références

Alenina, Natalia, and Robson Augusto Souza dos Santos. 2015. "Angiotensin-(1-7) and Mas." In *The Protective Arm of the Renin Angiotensin System (RAS)*, 155–59. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801364-9.00021-3.

Almeida, H., L. Matos, and D. Neves. 2007. "Caspase-3 and Bcl-2 Expression in Aging in Adrenal Zona Reticularis After Dexamethasone Administration." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1119 (1): 190–95. https://doi.org/10.1196/annals.1404.021.

Ansurudeen, Ishrath, Steffi Kopprasch, Monika Ehrhart-Bornstein, Stefan R. Bornstein, and Holger S. Willenberg. 2007. "Endothelial Cell-Mediated Regulation of Aldosterone Release from Human Adrenocortical Cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 265–266 (February): 150–56. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.12.011.

Azizan, Elena A B, Hanne Poulsen, Petronel Tuluc, Junhua Zhou, Michael V Clausen, Andreas Lieb, Carmela Maniero, et al. 2013. "Somatic Mutations in ATP1A1 and CACNA1D Underlie a Common Subtype of Adrenal Hypertension." *Nature Genetics* 45 (9): 1055–60. https://doi.org/10.1038/ng.2716.

Baker, Bo Y., Raquel F. Epand, Richard M. Epand, and Walter L. Miller. 2007. "Cholesterol Binding Does Not Predict Activity of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein, StAR." *Journal of Biological Chemistry* 282 (14): 10223–32. https://doi.org/10.1074/jbc.M611221200.

Bandiera, Roberto, Valerie P.I. Vidal, Fariba Jian Motamedi, Michael Clarkson, Isabelle Sahut-Barnola, Alexander von Gise, William T. Pu, Peter Hohenstein, Antoine Martinez, and Andreas Schedl. 2013. "WT1 Maintains Adrenal-Gonadal Primordium Identity and Marks a Population of AGP-like Progenitors within the Adrenal Gland." *Developmental Cell* 27 (1): 5–18. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.003.

Bandulik, S. 2017. "Of Channels and Pumps: Different Ways to Boost the Aldosterone?" *Acta Physiologica* 220 (3): 332–60. https://doi.org/10.1111/apha.12832.

Bandulik, Sascha, Philipp Tauber, David Penton, Frank Schweda, Ines Tegtmeier, Christina Sterner, Enzo Lalli, et al. 2013. "Severe Hyperaldosteronism in Neonatal Task3 Potassium Channel Knockout Mice Is Associated With Activation of the Intraadrenal Renin-Angiotensin System." *Endocrinology* 154 (8): 2712–22. https://doi.org/10.1210/en.2013-1101.

Baranowski, Elizabeth S., Wiebke Arlt, and Jan Idkowiak. 2018. "Monogenic Disorders of Adrenal Steroidogenesis." *Hormone Research in Paediatrics* 89 (5): 292–310. https://doi.org/10.1159/000488034.

Bassett, Jack R., and Sandra H. West. 1997. "Vascularization of the Adrenal Cortex: Its Possible Involvement in the Regulation of Steroid Hormone Release." *Microscopy Research and Technique* 36 (6): 546–57. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19970315)36:6<546::AID-JEMT11>3.0.CO;2-O.

Berthon, Annabel, Coralie Drelon, Bruno Ragazzon, Sheerazed Boulkroun, Frédérique Tissier, Laurence Amar, Benoît Samson-Couterie, et al. 2014. "WNT/β-Catenin Signalling Is Activated in Aldosterone-Producing Adenomas and Controls Aldosterone Production." *Human Molecular Genetics* 23 (4): 889–905. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt484.

Beuschlein, Felix, Sheerazed Boulkroun, Andrea Osswald, Thomas Wieland, Hang N Nielsen, Urs D Lichtenauer, David Penton, et al. 2013. "Somatic Mutations in ATP1A1 and ATP2B3 Lead to Aldosterone-Producing Adenomas and Secondary Hypertension." *Nature Genetics* 45 (4): 440–44. https://doi.org/10.1038/ng.2550.

Beuschlein, Felix, Sara Galac, and David B. Wilson. 2012. "Animal Models of Adrenocortical Tumorigenesis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (1): 78–86. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.045.

Bielohuby, Max, Nadja Herbach, Rüdiger Wanke, Christiane Maser-Gluth, Felix Beuschlein, Eckhard Wolf, and Andreas Hoeflich. 2007. "Growth Analysis of the Mouse Adrenal Gland from

Weaning to Adulthood: Time- and Gender-Dependent Alterations of Cell Size and Number in the Cortical Compartment." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 293 (1): E139–46. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00705.2006.

Boulkroun, Sheerazed, Benoit Samson-Couterie, José-Felipe Golib Dzib, Hervé Lefebvre, Estelle Louiset, Laurence Amar, Pierre-François Plouin, et al. 2010. "Adrenal Cortex Remodeling and Functional Zona Glomerulosa Hyperplasia in Primary Aldosteronism." *Hypertension* 56 (5): 885–92. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158543.

Boulkroun, Sheerazed, Benoit Samson-Couterie, José-Felipe Golib-Dzib, Laurence Amar, Pierre-François Plouin, Mathilde Sibony, Hervé Lefebvre, et al. 2011. "Aldosterone-Producing Adenoma Formation in the Adrenal Cortex Involves Expression of Stem/Progenitor Cell Markers." *Endocrinology* 152 (12): 4753–63. https://doi.org/10.1210/en.2011-1205.

Boyer, Hadrien-Gaël, Julien Wils, Sylvie Renouf, Arnaud Arabo, Céline Duparc, Isabelle Boutelet, Hervé Lefebvre, and Estelle Louiset. 2017. "Dysregulation of Aldosterone Secretion in Mast Cell–Deficient Mice." *Hypertension* 70 (6): 1256–63. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09746.

Briones, Ana M., Aurelie Nguyen Dinh Cat, Glaucia E. Callera, Alvaro Yogi, Dylan Burger, Ying He, Jose W. Corrêa, et al. 2012. "Adipocytes Produce Aldosterone Through Calcineurin-Dependent Signaling Pathways: Implications in Diabetes Mellitus–Associated Obesity and Vascular Dysfunction." *Hypertension* 59 (5): 1069–78. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.190223.

Bustin, Stephen A, Vladimir Benes, Jeremy A Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797.

Calebiro, Davide, Guido Di Dalmazi, Kerstin Bathon, Cristina L Ronchi, and Felix Beuschlein. 2015. "CAMP Signaling in Cortisol-Producing Adrenal Adenoma." *European Journal of Endocrinology* 173 (4): M99–106. https://doi.org/10.1530/EJE-15-0353.

Calhoun, David A., Mari K. Nishizaka, Mohammad A. Zaman, Roopal B. Thakkar, and Paula Weissmann. 2002. "Hyperaldosteronism Among Black and White Subjects With Resistant Hypertension." *Hypertension* 40 (6): 892–96. https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000040261.30455.B6.

Caprio, Massimiliano, Brenna G. Newfell, Andrea la Sala, Wendy Baur, Andrea Fabbri, Giuseppe Rosano, Michael E. Mendelsohn, and Iris Z. Jaffe. 2008. "Functional Mineralocorticoid Receptors in Human Vascular Endothelial Cells Regulate Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression and Promote Leukocyte Adhesion." *Circulation Research* 102 (11): 1359–67. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.174235.

Chang, Su-Ping, Hamish D. Morrison, Frida Nilsson, Christopher J. Kenyon, John D. West, and Steven D. Morley. 2013. "Cell Proliferation, Movement and Differentiation during Maintenance of the Adult Mouse Adrenal Cortex." Edited by Harpal Singh Randeva. *PLoS ONE* 8 (12): e81865. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081865.

Cherradi, Nadia, Cyrille Lejczak, Agnes Desroches-Castan, and Jean-Jacques Feige. 2006. "Antagonistic Functions of Tetradecanoyl Phorbol Acetate-Inducible-Sequence 11b and HuR in the Hormonal Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid Stability by Adrenocorticotropin." *Molecular Endocrinology* 20 (4): 916–30. https://doi.org/10.1210/me.2005-0121.

Ching, Saunders, and Eric Vilain. 2009. "Targeted Disruption of Sonic Hedgehog in the Mouse Adrenal Leads to Adrenocortical Hypoplasia." *Genesis* 47 (9): 628–37. https://doi.org/10.1002/dvg.20532.

Choi, M., U. I. Scholl, P. Yue, P. Bjorklund, B. Zhao, C. Nelson-Williams, W. Ji, et al. 2011. "K+ Channel Mutations in Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas and Hereditary Hypertension." *Science* 331 (6018): 768–72. https://doi.org/10.1126/science.1198785.

Chow, Clara K. 2013. “Prevalence, Awareness, Treatment, and Control of Hypertension in Rural and Urban Communities in High-, Middle-, and Low-Income Countries.” *JAMA* 310 (9): 959. https://doi.org/10.1001/jama.2013.184182.

Ciais, Delphine, Nadia Cherradi, Sabine Bailly, Emilie Grenier, Edurne Berra, Jacques Pouyssegur, Jonathan LaMarre, and Jean-Jacques Feige. 2004. “Destabilization of Vascular Endothelial Growth Factor MRNA by the Zinc-Finger Protein TIS11b.” *Oncogene* 23 (53): 8673–80. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207939.

Clark, B. J., J. Wells, S. R. King, and D. M. Stocco. 1994. “The Purification, Cloning, and Expression of a Novel Luteinizing Hormone-Induced Mitochondrial Protein in MA-10 Mouse Leydig Tumor Cells. Characterization of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR).” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (45): 28314–22.

Connell, John M. C., and Eleanor Davies. 2005. “The New Biology of Aldosterone.” *The Journal of Endocrinology* 186 (1): 1–20. https://doi.org/10.1677/joe.1.06017.

Coussens, Lisa M., and Zena Werb. 2002. “Inflammation and Cancer.” *Nature* 420 (6917): 860–67. https://doi.org/10.1038/nature01322.

Daniil, Georgios, Fabio L Fernandes-Rosa, Jean Chemin, Iulia Blesneac, Jacques Beltrand, Michel Polak, Xavier Jeunemaitre, et al. 2016. “CACNA1H Mutations Are Associated With Different Forms of Primary Aldosteronism.” *EBioMedicine* 13 (November): 225–36. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.002.

Danik, M., A. M. Chinn, B. Lafeuillade, M. Keramidas, S. Aguesse-Germon, A. Penhoat, H. Chen, D. F. Mosher, E. M. Chambaz, and J. J. Feige. 1999. “Bovine Thrombospondin-2: Complete Complementary Deoxyribonucleic Acid Sequence and Immunolocalization in the External Zones of the Adrenal Cortex.” *Endocrinology* 140 (6): 2771–80. https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6835.

De Sousa, Kelly, Sheerazed Boulkroun, Stéphanie Baron, Kazutaka Nanba, Maxime Wack, William E. Rainey, Angélique Rocha, et al. 2020. “Genetic, Cellular, and Molecular Heterogeneity in Adrenals With Aldosterone-Producing Adenoma.” *Hypertension* 75 (4): 1034–44. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14177.

Dinh Cat, Aurelie Nguyen, Malou Friederich-Persson, Anna White, and Rhian M Touyz. 2016. “Adipocytes, Aldosterone and Obesity-Related Hypertension.” *Journal of Molecular Endocrinology* 57 (1): F7–21. https://doi.org/10.1530/JME-16-0025.

Dobbie, J. W., and T. Symington. 1966. “THE HUMAN ADRENAL GLAND WITH SPECIAL REFERENCE TO THE VASCULATURE.” *Journal of Endocrinology* 34 (4): 479-NP. https://doi.org/10.1677/joe.0.0340479.

Douma, Stella, Konstantinos Petidis, Michael Doumas, Panagiota Papaefthimiou, Areti Triantafyllou, Niki Kartali, Nikolaos Papadopoulos, Konstantinos Vogiatzis, and Chrysanthos Zamboulis. 2008. “Prevalence of Primary Hyperaldosteronism in Resistant Hypertension: A Retrospective Observational Study.” *The Lancet* 371 (9628): 1921–26. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60834-X.

Drelon, Coralie, Annabel Berthon, Isabelle Sahut-Barnola, Mickaël Mathieu, Typhanie Dumontet, Stéphanie Rodriguez, Marie Batisse-Lignier, et al. 2016. “PKA Inhibits WNT Signalling in Adrenal Cortex Zonation and Prevents Malignant Tumour Development.” *Nature Communications* 7 (1): 12751. https://doi.org/10.1038/ncomms12751.

Dumontet, Typhanie, Isabelle Sahut-Barnola, Amandine Septier, Nathanaëlle Montanier, Ingrid Plotton, Florence Roucher-Boulez, Véronique Ducros, et al. 2018. “PKA Signaling Drives Reticularis Differentiation and Sexually Dimorphic Adrenal Cortex Renewal.” *JCI Insight* 3 (2): e98394. https://doi.org/10.1172/jci.insight.98394.

Duparc, Céline, Lucile Moreau, Jose Felipe Golib Dzib, Hadrien-Gaël Boyer, Milène Tetsi Nomigni, Isabelle Boutelet, Sheerazed Boulkroun, et al. 2015. “Mast Cell Hyperplasia Is Associated With Aldosterone Hypersecretion in a Subset of Aldosterone-Producing Adenomas.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (4): E550–60. https://doi.org/10.1210/jc.2014-3660.

Ehrhart-Bornstein, Monika, Joy P. Hinson, Stefan R. Bornstein, Werner A. Scherbaum, and Gavin P. Vinson. 1998. “Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis.” *Endocrine Reviews* 19 (2): 101–43. https://doi.org/10.1210/edrv.19.2.0326.

El Wakil, Abeer, and Enzo Lalli. 2011. “The Wnt/Beta-Catenin Pathway in Adrenocortical Development and Cancer.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 332 (1–2): 32–37. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.014.

Else, Tobias, and Gary D. Hammer. 2005. “Genetic Analysis of Adrenal Absence: Agenesis and Aplasia.” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (10): 458–68. https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.10.004.

Epstein, Franklin H., and Perrin C. White. 1994. “Disorders of Aldosterone Biosynthesis and Action.” *New England Journal of Medicine* 331 (4): 250–58. https://doi.org/10.1056/NEJM199407283310408.

Fassnacht, Martin, and Bruno Allolio. 2009. “Epidemiology of Adrenocortical Carcinoma.” In *Adrenocortical Carcinoma*, edited by Gary D. Hammer and Tobias Else, 23–29. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77236-3_3.

Faulkner, Jessica L., and Eric J. Belin de Chantemèle. 2019. “Mineralocorticoid Receptor and Endothelial Dysfunction in Hypertension.” *Current Hypertension Reports* 21 (10): 78. https://doi.org/10.1007/s11906-019-0981-4.

Fernandes-Rosa, Fabio L., Sheerazed Boulkroun, and Maria-Christina Zennaro. 2020. “Genetic and Genomic Mechanisms of Primary Aldosteronism.” *Trends in Molecular Medicine* 26 (9): 819–32. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.05.005.

Fernandes-Rosa, Fabio L., Georgios Daniil, Ian J. Orozco, Corinna Göppner, Rami El Zein, Vandana Jain, Sheerazed Boulkroun, et al. 2018. “A Gain-of-Function Mutation in the CLCN2 Chloride Channel Gene Causes Primary Aldosteronism.” *Nature Genetics* 50 (3): 355–61. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0053-8.

Fernandes-Rosa, Fabio Luiz, Isabelle Giscos-Douriez, Laurence Amar, Celso E. Gomez-Sanchez, Tchao Meatchi, Sheerazed Boulkroun, and Maria-Christina Zennaro. 2015. “Different Somatic Mutations in Multinodular Adrenals With Aldosterone-Producing Adenoma.” *Hypertension* 66 (5): 1014–22. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05993.

Fernandes-Rosa, Fabio Luiz, Tracy Ann Williams, Anna Riester, Olivier Steichen, Felix Beuschlein, Sheerazed Boulkroun, Tim M. Strom, et al. 2014. “Genetic Spectrum and Clinical Correlates of Somatic Mutations in Aldosterone-Producing Adenoma.” *Hypertension* 64 (2): 354–61. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03419.

Ferraz-de-Souza, Bruno, Lin Lin, Sonia Shah, Nipurna Jina, Mike Hubank, Mehul T. Dattani, and John C. Achermann. 2011. “ChIP-on-chip Analysis Reveals Angiopoietin 2 (Ang2, ANGPT2) as a Novel Target of Steroidogenic Factor-1 (SF-1, NR5A1) in the Human Adrenal Gland.” *The FASEB Journal* 25 (4): 1166–75. https://doi.org/10.1096/fj.10-170522.

Finco, Isabella, Antonio M Lerario, and Gary D Hammer. 2018. “Sonic Hedgehog and WNT Signaling Promote Adrenal Gland Regeneration in Male Mice.” *Endocrinology* 159 (2): 579–96. https://doi.org/10.1210/en.2017-03061.

Freedman, Bethany D., Petra Bukovac Kempna, Diana L. Carlone, Manasvi S. Shah, Nick A. Guagliardo, Paula Q. Barrett, Celso E. Gomez-Sanchez, Joseph A. Majzoub, and David T. Breault. 2013. “Adrenocortical Zonation Results from Lineage Conversion of Differentiated Zona Glomerulosa Cells.” *Developmental Cell* 26 (6): 666–73. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.07.016.

Funder, John W., Robert M. Carey, Carlos Fardella, Celso E. Gomez-Sanchez, Franco Mantero, Michael Stowasser, William F. Young, Victor M. Montori, and Endocrine Society. 2008. “Case Detection, Diagnosis, and Treatment of Patients with Primary Aldosteronism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (9): 3266–81. https://doi.org/10.1210/jc.2008-0104.

Funder, John W., Robert M. Carey, Franco Mantero, M. Hassan Murad, Martin Reincke, Hirotaka Shibata, Michael Stowasser, and William F. Young. 2016. “The Management of Primary

Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101 (5): 1889–1916. https://doi.org/10.1210/jc.2015-4061.

Gaillard, Isabelle, Michelle Keramidas, Panagiotis Liakos, Isabelle Vilgrain, Jean-Jacques Feige, and Daniel Vittet. 2000. "ACTH-Regulated Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the Adult Bovine Adrenal Cortex: A Possible Role in the Maintenance of the Microvasculature." *Journal of Cellular Physiology* 185 (2): 226–34. https://doi.org/10.1002/1097-4652(200011)185:2<226::AID-JCP7>3.0.CO;2-E.

Gallo-Payet, Nicole, and Marie-Claude Battista. 2014. "Steroidogenesis—Adrenal Cell Signal Transduction." In *Comprehensive Physiology*, edited by Ronald Terjung, 1st ed., 889–964. Wiley. https://doi.org/10.1002/cphy.c130050.

Geerling, Joel C., and Arthur D. Loewy. 2009. "Aldosterone in the Brain." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 297 (3): F559–76. https://doi.org/10.1152/ajprenal.90399.2008.

Geller, David S., Junhui Zhang, Max V. Wisgerhof, Cedric Shackleton, Michael Kashgarian, and Richard P. Lifton. 2008. "A Novel Form of Human Mendelian Hypertension Featuring Nonglucocorticoid-Remediable Aldosteronism." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93 (8): 3117–23. https://doi.org/10.1210/jc.2008-0594.

Gennari-Moser, Carine, Eliyahu V. Khankin, Geneviève Escher, Fiona Burkhard, Brigitte M. Frey, S. Ananth Karumanchi, Felix J. Frey, and Markus G. Mohaupt. 2013. "Vascular Endothelial Growth Factor-A and Aldosterone: Relevance to Normal Pregnancy and Preeclampsia." *Hypertension* 61 (5): 1111–17. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00575.

Gomes, Débora C., Letícia F. Leal, Livia M. Mermejo, Carlos A. Scrideli, Carlos E. Martinelli, Maria C. B. V. Fragoso, Ana C. Latronico, et al. 2014. "Sonic Hedgehog Signaling Is Active in Human Adrenal Cortex Development and Deregulated in Adrenocortical Tumors." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99 (7): E1209–16. https://doi.org/10.1210/jc.2013-4098.

Goto, M. 2006. "In Humans, Early Cortisol Biosynthesis Provides a Mechanism to Safeguard Female Sexual Development." *Journal of Clinical Investigation* 116 (4): 953–60. https://doi.org/10.1172/JCI25091.

Grabek, Anaëlle, Bastien Dolfi, Bryan Klein, Fariba Jian-Motamedi, Marie-Christine Chaboissier, and Andreas Schedl. 2019. "The Adult Adrenal Cortex Undergoes Rapid Tissue Renewal in a Sex-Specific Manner." *Cell Stem Cell* 25 (2): 290-296.e2. https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.04.012.

Guasti, Leonardo, Alex Paul, Ed Laufer, and Peter King. 2011. "Localization of Sonic Hedgehog Secreting and Receiving Cells in the Developing and Adult Rat Adrenal Cortex." *Molecular and Cellular Endocrinology* 336 (1–2): 117–22. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.010.

Gwynne, John T., and Jerome F. Strauss. 1982. "The Role of Lipoproteins in Steroidogenesis and Cholesterol Metabolism in Steroidogenic Glands*." *Endocrine Reviews* 3 (3): 299–329. https://doi.org/10.1210/edrv-3-3-299.

Hannemann, A., and H. Wallaschofski. 2012. "Prevalence of Primary Aldosteronism in Patient's Cohorts and in Population-Based Studies - A Review of the Current Literature." *Hormone and Metabolic Research* 44 (03): 157–62. https://doi.org/10.1055/s-0031-1295438.

Hashikabe, Yuko, Kunihiro Suzuki, Teruo Jojima, Kohsuke Uchida, and Yoshiyuki Hattori. 2006. "Aldosterone Impairs Vascular Endothelial Cell Function." *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47 (4): 609–13. https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000211738.63207.c3.

Hatano, Osamu, Akira Takakusu, Masatoshi Nomura, and Ken-ichirou Morohashi. 1996. "Identical Origin of Adrenal Cortex and Gonad Revealed by Expression Profiles of Ad4BP/SF-1." *Genes to Cells* 1 (7): 663–71. https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.00254.x.

Hattangady, Namita G., Lawrence O. Olala, Wendy B. Bollag, and William E. Rainey. 2012. "Acute and Chronic Regulation of Aldosterone Production." *Molecular and Cellular Endocrinology* 350 (2): 151–62. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.034.

He, B. Julie, and Mark E. Anderson. 2013. “Aldosterone and Cardiovascular Disease: The Heart of the Matter.” *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 24 (1): 21–30. https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.09.004.

Heitzmann, Dirk, Renaud Derand, Stefan Jungbauer, Sascha Bandulik, Christina Sterner, Frank Schweda, Abeer El Wakil, et al. 2008. “Invalidation of TASK1 Potassium Channels Disrupts Adrenal Gland Zonation and Mineralocorticoid Homeostasis.” *The EMBO Journal* 27 (1): 179–87. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601934.

Hershkovitz, Liat, Felix Beuschlein, Steffen Klammer, Margalit Krup, and Yacob Weinstein. 2007. “Adrenal 20α-Hydroxysteroid Dehydrogenase in the Mouse Catabolizes Progesterone and 11-Deoxycorticosterone and Is Restricted to the X-Zone.” *Endocrinology* 148 (3): 976–88. https://doi.org/10.1210/en.2006-1100.

Hinson, J. P., G. P. Vinson, J. Pudney, and B. J. Whitehouse. 1989. “Adrenal Mast Cells Modulate Vascular and Secretory Responses in the Intact Adrenal Gland of the Rat.” *Journal of Endocrinology* 121 (2): 253-NP. https://doi.org/10.1677/joe.0.1210253.

Holzwarth, M. A., L. A. Cunningham, and N. Kleitman. 1987. “The Role of Adrenal Nerves in the Regulation of Adrenocortical Functions.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 512 (1 The Hypothala): 449–64. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb24980.x.

Huby, Anne-Cécile, Galina Antonova, Jake Groenendyk, Celso E. Gomez-Sanchez, Wendy B. Bollag, Jessica A. Filosa, and Eric J. Belin de Chantemèle. 2015. “Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis.” *Circulation* 132 (22): 2134–45. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018226.

Ishimoto, Hitoshi, David G. Ginzinger, and Robert B. Jaffe. 2006. “Adrenocorticotropin Preferentially Up-Regulates Angiopoietin 2 in the Human Fetal Adrenal Gland: Implications for Coordinated Adrenal Organ Growth and Angiogenesis.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91 (5): 1909–15. https://doi.org/10.1210/jc.2005-2252.

Ishimoto, Hitoshi, and Robert B. Jaffe. 2011. “Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit.” *Endocrine Reviews* 32 (3): 317–55. https://doi.org/10.1210/er.2010-0001.

Ishimoto, Hitoshi, Kazuhiro Minegishi, Takayuki Higuchi, Masataka Furuya, Satoshi Asai, Seon Hye Kim, Mamoru Tanaka, Yasunori Yoshimura, and Robert B. Jaffe. 2008. “The Periphery of the Human Fetal Adrenal Gland Is a Site of Angiogenesis: Zonal Differential Expression and Regulation of Angiogenic Factors.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93 (6): 2402–8. https://doi.org/10.1210/jc.2007-2509.

Jaffe, Iris Z., Brenna G. Newfell, Mark Aronovitz, Najwa N. Mohammad, Adam P. McGraw, Roger E. Perreault, Peter Carmeliet, Afshin Ehsan, and Michael E. Mendelsohn. 2010. “Placental Growth Factor Mediates Aldosterone-Dependent Vascular Injury in Mice.” *Journal of Clinical Investigation* 120 (11): 3891–3900. https://doi.org/10.1172/JCI40205.

Jirasek JE. 1980. *Human Fetal Endocrines.* London: Martinus Nijhoff.

Joannidis, Michael, and Eric Hoste. 2018. “Angiotensin Inhibition in Patients with Acute Kidney Injury: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?” *Intensive Care Medicine* 44 (7): 1159–61. https://doi.org/10.1007/s00134-018-5223-8.

Kataoka, Y., Y. Ikehara, and T. Hattori. 1996. “Cell Proliferation and Renewal of Mouse Adrenal Cortex.” *Journal of Anatomy* 188 (Pt 2) (April): 375–81.

Keegan, Catherine E, and Gary D Hammer. 2002. “Recent Insights into Organogenesis of the Adrenal Cortex.” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13 (5): 200–208. https://doi.org/10.1016/S1043-2760(02)00602-1.

Kim, Ji-Hoon, and Man Ho Choi. 2020. “Embryonic Development and Adult Regeneration of the Adrenal Gland.” *Endocrinology and Metabolism* 35 (4): 765–73. https://doi.org/10.3803/EnM.2020.403.

King, J. A., D. J. Lush, and J. C. Fray. 1993. “Regulation of Renin Processing and Secretion: Chemiosmotic Control and Novel Secretory Pathway.” *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 265 (2): C305–20. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.2.C305.

King, Peter, Alex Paul, and Ed Laufer. 2009. “Shh Signaling Regulates Adrenocortical Development and Identifies Progenitors of Steroidogenic Lineages.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (50): 21185–90. https://doi.org/10.1073/pnas.0909471106.

Komiya, Yuko, and Raymond Habas. 2008. “Wnt Signal Transduction Pathways.” *Organogenesis* 4 (2): 68–75. https://doi.org/10.4161/org.4.2.5851.

Kon, Yashuhiro, Yoshiharu Hashimoto, Hiroshi Kitagawa, Makoto Sugimura, and Kazuo Murakami. 1990. “Renin Immunohistochemistry in the Adrenal Gland of the Mouse Fetus and Neonate.” *The Anatomical Record* 227 (1): 124–31. https://doi.org/10.1002/ar.1092270114.

Koritz, S. B., and A. M. Kumar. 1970. “On the Mechanism of Action of the Adrenocorticotrophic Hormone. The Stimulation of the Activity of Enzymes Involved in Pregnenolone Synthesis.” *The Journal of Biological Chemistry* 245 (1): 152–59.

Krajewska, M., H. G. Wang, S. Krajewski, J. M. Zapata, A. Shabaik, R. Gascoyne, and J. C. Reed. 1997. “Immunohistochemical Analysis of in Vivo Patterns of Expression of CPP32 (Caspase-3), a Cell Death Protease.” *Cancer Research* 57 (8): 1605–13.

Krug, Alexander W., Steffi Kopprasch, Christian G. Ziegler, Sandra Dippong, Rusan A. Catar, Stefan R. Bornstein, Henning Morawietz, and Michael Gekle. 2007. “Aldosterone Rapidly Induces Leukocyte Adhesion to Endothelial Cells: A New Link Between Aldosterone and Arteriosclerosis?” *Hypertension* 50 (5). https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099531.

Krystel-Whittemore, Melissa, Kottarappat N. Dileepan, and John G. Wood. 2016. “Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell.” *Frontiers in Immunology* 6 (January). https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00620.

Kyriakides, T. R., Y. H. Zhu, L. T. Smith, S. D. Bain, Z. Yang, M. T. Lin, K. G. Danielson, et al. 1998. “Mice That Lack Thrombospondin 2 Display Connective Tissue Abnormalities That Are Associated with Disordered Collagen Fibrillogenesis, an Increased Vascular Density, and a Bleeding Diathesis.” *The Journal of Cell Biology* 140 (2): 419–30. https://doi.org/10.1083/jcb.140.2.419.

Kyriakides, Themis R., Yu-Hong Zhu, Zhantao Yang, and Paul Bornstein. 1998. “The Distribution of the Matricellular Protein Thrombospondin 2 in Tissues of Embryonic and Adult Mice.” *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46 (9): 1007–15. https://doi.org/10.1177/002215549804600904.

Lachance, Y., V. Luu-The, C. Labrie, J. Simard, M. Dumont, Y. de Launoit, S. Guérin, G. Leblanc, and F. Labrie. 1990. “Characterization of Human 3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta 5-Delta 4-Isomerase Gene and Its Expression in Mammalian Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 265 (33): 20469–75.

Lacroix, André, Richard A Feelders, Constantine A Stratakis, and Lynnette K Nieman. 2015. “Cushing’s Syndrome.” *The Lancet* 386 (9996): 913–27. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61375-1.

Lane, D. P., X. Lu, T. Hupp, and P. A. Hall. 1994. “The Role of the P53 Protein in the Apoptotic Response.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 345 (1313): 277–80. https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0106.

Laufer, Ed, Dörthe Kesper, Andrea Vortkamp, and Peter King. 2012. “Sonic Hedgehog Signaling during Adrenal Development.” *Molecular and Cellular Endocrinology* 351 (1): 19–27. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.002.

Lee, Gene, Natalia Makhanova, Kathleen Caron, Maria L. Sequeira Lopez, R. Ariel Gomez, Oliver Smithies, and Hyung-Suk Kim. 2005. “Homeostatic Responses in the Adrenal Cortex to the Absence of Aldosterone in Mice.” *Endocrinology* 146 (6): 2650–56. https://doi.org/10.1210/en.2004-1102.

Lefebvre, H., P. Compagnon, V. Contesse, C. Delarue, C. Thuillez, H. Vaudry, and J. M. Kuhn. 2001. “Production and Metabolism of Serotonin (5-HT) by the Human Adrenal Cortex: Paracrine

Stimulation of Aldosterone Secretion by 5-HT." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 (10): 5001–7. https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7917.

Lefebvre, Hervé, Céline Duparc, Alexandre Naccache, Antoine-Guy Lopez, Mireille Castanet, and Estelle Louiset. 2019. "Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions." In *Vitamins and Hormones*, 109:303–39. Elsevier. https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.10.001.

Lefebvre, Hervé, Michaël Thomas, Céline Duparc, Jérôme Bertherat, and Estelle Louiset. 2016. "Role of ACTH in the Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions." *Frontiers in Endocrinology* 7: 98. https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00098.

Lenzini, Livia, Giacomo Rossitto, Giuseppe Maiolino, Claudio Letizia, John W. Funder, and Gian Paolo Rossi. 2015. "A Meta-Analysis of Somatic KCNJ5 K^+ Channel Mutations In 1636 Patients With an Aldosterone-Producing Adenoma." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 100 (8): E1089–95. https://doi.org/10.1210/jc.2015-2149.

Lerario, Antonio Marcondes, Isabella Finco, Christopher LaPensee, and Gary Douglas Hammer. 2017. "Molecular Mechanisms of Stem/Progenitor Cell Maintenance in the Adrenal Cortex." *Frontiers in Endocrinology* 8: 52. https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00052.

Levasseur, Adrien, Typhanie Dumontet, and Antoine Martinez. 2019. "'Sexual Dimorphism in Adrenal Gland Development and Tumorigenesis.'" *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 8 (October): 60–65. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.07.008.

Lip, Stefanie, and Sandosh Padmanabhan. 2020. "Genomics of Blood Pressure and Hypertension: Extending the Mosaic Theory Toward Stratification." *The Canadian Journal of Cardiology* 36 (5): 694–705. https://doi.org/10.1016/j.cjca.2020.03.001.

Litchfield, W. Reid, Bruce F. Anderson, Ruediger J. Weiss, Richard P. Lifton, and Robert G. Dluhy. 1998. "Intracranial Aneurysm and Hemorrhagic Stroke in Glucocorticoid-Remediable Aldosteronism." *Hypertension* 31 (1): 445–50. https://doi.org/10.1161/01.HYP.31.1.445.

Lobov, I. B., P. C. Brooks, and R. A. Lang. 2002. "Angiopoietin-2 Displays VEGF-Dependent Modulation of Capillary Structure and Endothelial Cell Survival in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (17): 11205–10. https://doi.org/10.1073/pnas.172161899.

Lopez, Antoine-Guy, Céline Duparc, Alexandre Naccache, Mireille Castanet, Hervé Lefebvre, and Estelle Louiset. 2020. "Role of Mast Cells in the Control of Aldosterone Secretion." *Hormone and Metabolic Research* 52 (06): 412–20. https://doi.org/10.1055/a-1119-1063.

Louiset, Estelle, Céline Duparc, and Hervé Lefebvre. 2019. "Role of Serotonin in the Paracrine Control of Adrenal Steroidogenesis in Physiological and Pathophysiological Conditions." *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 8 (October): 50–59. https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.07.003.

Luo, Xunrong, Yayoi Ikeda, and Keith L. Parker. 1994. "A Cell-Specific Nuclear Receptor Is Essential for Adrenal and Gonadal Development and Sexual Differentiation." *Cell* 77 (4): 481–90. https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90211-9.

Lyraki, Rodanthi, and Andreas Schedl. 2021. "Adrenal Cortex Renewal in Health and Disease." *Nature Reviews Endocrinology* 17 (7): 421–34. https://doi.org/10.1038/s41574-021-00491-4.

MacDonald, Bryan T., Keiko Tamai, and Xi He. 2009. "Wnt/β-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases." *Developmental Cell* 17 (1): 9–26. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016.

MacKenzie, Scott M., John M.C. Connell, and Eleanor Davies. 2012. "Non-Adrenal Synthesis of Aldosterone: A Reality Check." *Molecular and Cellular Endocrinology* 350 (2): 163–67. https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.06.026.

MacKenzie, Sm, Cj Clark, R Fraser, Ce Gomez-Sanchez, Jm Connell, and E Davies. 2000. "Expression of 11beta-Hydroxylase and Aldosterone Synthase Genes in the Rat Brain." *Journal of Molecular Endocrinology* 24 (3): 321–28. https://doi.org/10.1677/jme.0.0240321.

MacLauchlan, S., J. Yu, M. Parrish, T. A. Asoulin, M. Schleicher, M. M. Krady, J. Zeng, P. L. Huang, W. C. Sessa, and T. R. Kyriakides. 2011. "Endothelial Nitric Oxide Synthase Controls the Expression of the Angiogenesis Inhibitor Thrombospondin 2." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (46): E1137–45. https://doi.org/10.1073/pnas.1104357108.

Mason, J. Ian, and William E. Rainey. 1987. "Steroidogenesis in the Human Fetal Adrenal: A Role for Cholesterol Synthesized *de Novo* *." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 64 (1): 140–47. https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-140.

Mazzocchi, G., P. Rebuffat, G. Gottardo, V. Meneghelli, and G. G. Nussdorfer. 1996. "Evidence That Both ETA and ETB Receptor Subtypes Are Involved in the in Vivo Aldosterone Secretagogue Effect of Endothelin-1 in Rats." *Research in Experimental Medicine* 196 (1): 145–52. https://doi.org/10.1007/BF02576836.

McEwan, Pauline E., Gavin P. Vinson, and Christopher J. Kenyon. 1999. "Control of Adrenal Cell Proliferation by AT_1 Receptors in Response to Angiotensin II and Low-Sodium Diet." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 276 (2): E303–9. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1999.276.2.E303.

McNutt, N. S., and A. L. Jones. 1970. "Observations on the Ultrastructure of Cytodifferentiation in the Human Fetal Adrenal Cortex." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 22 (6): 513–27.

Megha, Rishi, Chase J. Wehrle, Sarang Kashyap, and Stephen W. Leslie. 2022. "Anatomy, Abdomen and Pelvis, Adrenal Glands (Suprarenal Glands)." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482264/.

Michel, Frédéric, Marie-Lory Ambroisine, Micheline Duriez, Claude Delcayre, Bernard I. Levy, and Jean-Sébastien Silvestre. 2004. "Aldosterone Enhances Ischemia-Induced Neovascularization Through Angiotensin II–Dependent Pathway." *Circulation* 109 (16): 1933–37. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000127112.36796.9B.

Miller, Walter L., and Richard J. Auchus. 2011. "The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders." *Endocrine Reviews* 32 (1): 81–151. https://doi.org/10.1210/er.2010-0013.

Monticone, Silvia, Jacopo Burrello, Davide Tizzani, Chiara Bertello, Andrea Viola, Fabrizio Buffolo, Luisa Gabetti, et al. 2017. "Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice." *Journal of the American College of Cardiology* 69 (14): 1811–20. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.052.

Morohashi, Ken-ichirou, and Mohamad Zubair. 2011. "The Fetal and Adult Adrenal Cortex." *Molecular and Cellular Endocrinology* 336 (1–2): 193–97. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.026.

Mulatero, Paolo, Silvia Monticone, William E. Rainey, Franco Veglio, and Tracy Ann Williams. 2013. "Role of KCNJ5 in Familial and Sporadic Primary Aldosteronism." *Nature Reviews Endocrinology* 9 (2): 104–12. https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.230.

Mulatero, Paolo, Davide Tizzani, Andrea Viola, Chiara Bertello, Silvia Monticone, Giulio Mengozzi, Domenica Schiavone, et al. 2011. "Prevalence and Characteristics of Familial Hyperaldosteronism: The PATOGEN Study (Primary Aldosteronism in TOrino-GENetic Forms)." *Hypertension* 58 (5): 797–803. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175083.

Mulrow, P. 1998. "Renin-Angiotensin System in the Adrenal." *Hormone and Metabolic Research* 30 (06/07): 346–49. https://doi.org/10.1055/s-2007-978896.

Mulrow, P. J. 1992. "Adrenal Renin: Regulation and Function." *Frontiers in Neuroendocrinology* 13 (1): 47–60.

Nakamaru, M., K. S. Misono, M. Naruse, R. J. Workman, and T. Inagami. 1985. "A Role for the Adrenal Renin-Angiotensin System in the Regulation of Potassium-Stimulated Aldosterone Production." *Endocrinology* 117 (5): 1772–78. https://doi.org/10.1210/endo-117-5-1772.

Nanba, Kazutaka, Kei Omata, Tobias Else, Peter C C Beck, Aya T Nanba, Adina F Turcu, Barbra S Miller, Thomas J Giordano, Scott A Tomlins, and William E Rainey. 2018. "Targeted Molecular Characterization of Aldosterone-Producing Adenomas in White Americans." *The Journal of*

Clinical Endocrinology & Metabolism 103 (10): 3869–76. https://doi.org/10.1210/jc.2018-01004.

Nanba, Kazutaka, Kei Omata, Celso E. Gomez-Sanchez, Constantine A. Stratakis, Andrew P. Demidowich, Mari Suzuki, Lester D. R. Thompson, et al. 2019. "Genetic Characteristics of Aldosterone-Producing Adenomas in Blacks." *Hypertension* 73 (4): 885–92. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12070.

Nanba, Kazutaka, Anand Vaidya, Gordon H. Williams, Isabel Zheng, Tobias Else, and William E. Rainey. 2017. "Age-Related Autonomous Aldosteronism." *Circulation* 136 (4): 347–55. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028201.

Nanba, Kazutaka, Yuto Yamazaki, Nolan Bick, Kei Onodera, Yuta Tezuka, Kei Omata, Yoshikiyo Ono, et al. 2020. "Prevalence of Somatic Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas in Japanese Patients." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 105 (11). https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa595.

Naruse, Mitsuhide, Craig R. Sussman, Kiyoko Naruse, Richard V. Jackson, and Tadashi Inagami. 1983. "Renin Exists in Human Adrenal Tissue*." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 57 (3): 482–87. https://doi.org/10.1210/jcem-57-3-482.

Nishimoto, Koshiro, Tsugio Seki, Yuichiro Hayashi, Shuji Mikami, Ghaith Al-Eyd, Ken Nakagawa, Shinya Morita, et al. 2016. "Human Adrenocortical Remodeling Leading to Aldosterone-Producing Cell Cluster Generation." *International Journal of Endocrinology* 2016: 7834356. https://doi.org/10.1155/2016/7834356.

Nishizaka, Mari K., M. Amin Zaman, Sharon A. Green, Kerry Y. Renfroe, and David A. Calhoun. 2004. "Impaired Endothelium-Dependent Flow-Mediated Vasodilation in Hypertensive Subjects With Hyperaldosteronism." *Circulation* 109 (23): 2857–61. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129307.26791.8E.

Norrby, Klas. 2002. "Mast Cells and Angiogenesis. Review Article." *APMIS* 110 (5): 355–71. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.100501.x.

Novoselova, T V, D Jackson, D C Campbell, A J L Clark, and L F Chan. 2013. "Melanocortin Receptor Accessory Proteins in Adrenal Gland Physiology and Beyond." *Journal of Endocrinology* 217 (1): R1–11. https://doi.org/10.1530/JOE-12-0501.

Oberleithner, Hans. 2005. "Aldosterone Makes Human Endothelium Stiff and Vulnerable." *Kidney International* 67 (5): 1680–82. https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00263.x.

Omata, Kei, Sharath K. Anand, Daniel H. Hovelson, Chia-Jen Liu, Yuto Yamazaki, Yasuhiro Nakamura, Sadayoshi Ito, et al. 2017. "Aldosterone-Producing Cell Clusters Frequently Harbor Somatic Mutations and Accumulate With Age in Normal Adrenals." *Journal of the Endocrine Society* 1 (7): 787–99. https://doi.org/10.1210/js.2017-00134.

Ono, Yoshikiyo, Yuto Yamazaki, Kei Omata, Tobias Else, Scott A. Tomlins, Yara Rhayem, Tracy Ann Williams, et al. 2020. "Histological Characterization of Aldosterone-Producing Adrenocortical Adenomas with Different Somatic Mutations." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 105 (3). https://doi.org/10.1210/clinem/dgz235.

Ozisik, Gokhan, John C. Achermann, Joshua J. Meeks, and J. Larry Jameson. 2003. "SF1 in the Development of the Adrenal Gland and Gonads." *Hormone Research in Paediatrics* 59 (1): 94–98. https://doi.org/10.1159/000067831.

Pallauf, A., C. Schirpenbach, O. Zwermann, E. Fischer, M. Morak, E. Holinski-Feder, L. Hofbauer, F. Beuschlein, and M. Reincke. 2012. "The Prevalence of Familial Hyperaldosteronism in Apparently Sporadic Primary Aldosteronism in Germany: A Single Center Experience." *Hormone and Metabolic Research* 44 (03): 215–20. https://doi.org/10.1055/s-0031-1299730.

Parker, T. L., W. K. Kesse, A. A. Mohamed, and M. Afework. 1993. "The Innervation of the Mammalian Adrenal Gland." *Journal of Anatomy* 183 (Pt 2) (October): 265–76.

Patel, Seema, Abdur Rauf, Haroon Khan, and Tareq Abu-Izneid. 2017. "Renin-Angiotensin-Aldosterone (RAAS): The Ubiquitous System for Homeostasis and Pathologies." *Biomedicine &*

Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie 94 (October): 317–25. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.091.

Patel, Sheila K., Elena Velkoska, Melanie Freeman, Bryan Wai, Terase F. Lancefield, and Louise M. Burrell. 2014. "From Gene to Proteinâ€"experimental and Clinical Studies of ACE2 in Blood Pressure Control and Arterial Hypertension." *Frontiers in Physiology* 5 (June). https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00227.

Pearce, David, Aditi Bhargava, and Timothy J. Cole. 2003. "Aldosterone: Its Receptor, Target Genes, and Actions." *Vitamins and Hormones* 66: 29–76. https://doi.org/10.1016/s0083-6729(03)01002-1.

Pellerin, S., B. Lafeuillade, E. M. Chambaz, and J. J. Feige. 1994. "Distinct Effects of Thrombospondin-1 and CISP/Thrombospondin-2 on Adrenocortical Cell Spreading." *Molecular and Cellular Endocrinology* 106 (1–2): 181–86. https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90201-1.

Pellerin, S., B. Lafeuillade, N. Scherrer, J. Gagnon, D. L. Shi, E. M. Chambaz, and J. J. Feige. 1993. "Corticotropin-Induced Secreted Protein, an ACTH-Induced Protein Secreted by Adrenocortical Cells, Is Structurally Related to Thrombospondins." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (6): 4304–10.

Pereira, Sofia S., Sofia Oliveira, Mariana P. Monteiro, and Duarte Pignatelli. 2021. "Angiogenesis in the Normal Adrenal Fetal Cortex and Adrenocortical Tumors." *Cancers* 13 (5): 1030. https://doi.org/10.3390/cancers13051030.

Pignatti, Emanuele, Sining Leng, Diana L. Carlone, and David T. Breault. 2017. "Regulation of Zonation and Homeostasis in the Adrenal Cortex." *Molecular and Cellular Endocrinology* 441 (February): 146–55. https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.003.

Pignatti, Emanuele, Sining Leng, Yixing Yuchi, Kleiton S. Borges, Nick A. Guagliardo, Manasvi S. Shah, Gerard Ruiz-Babot, et al. 2020. "Beta-Catenin Causes Adrenal Hyperplasia by Blocking Zonal Transdifferentiation." *Cell Reports* 31 (3): 107524. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107524.

Pueyo, Maria E., Jean-François Arnal, Jacques Rami, and Jean-Baptiste Michel. 1998. "Angiotensin II Stimulates the Production of NO and Peroxynitrite in Endothelial Cells." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 274 (1): C214–20. https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.1.C214.

Rhayem, Yara, Luis G. Perez-Rivas, Anna Dietz, Kerstin Bathon, Christian Gebhard, Anna Riester, Brigitte Mauracher, et al. 2016. "PRKACA Somatic Mutations Are Rare Findings in Aldosterone-Producing Adenomas." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 101 (8): 3010–17. https://doi.org/10.1210/jc.2016-1700.

Rocha, Ricardo, Amy E. Rudolph, Gregory E. Frierdich, Denise A. Nachowiak, Beverly K. Kekec, Eric A. G. Blomme, Ellen G. McMahon, and John A. Delyani. 2002. "Aldosterone Induces a Vascular Inflammatory Phenotype in the Rat Heart." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 283 (5): H1802–10. https://doi.org/10.1152/ajpheart.01096.2001.

Rossi, G, G Albertin, A Belloni, L Zanin, M A Biasolo, T Prayer-Galetti, M Bader, G G Nussdorfer, G Palù, and A C Pessina. 1994. "Gene Expression, Localization, and Characterization of Endothelin A and B Receptors in the Human Adrenal Cortex." *Journal of Clinical Investigation* 94 (3): 1226–34. https://doi.org/10.1172/JCI117440.

Rossi, G. P., P. G. Andreis, S. Colonna, G. Albertin, F. Aragona, A. S. Belloni, and G. G. Nussdorfer. 2002. "Endothelin-1[1–31]: A Novel Autocrine-Paracrine Regulator of Human Adrenal Cortex Secretion and Growth." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87 (1): 322–28. https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8134.

Rossi, Gian Paolo, Giampaolo Bernini, Chiara Caliumi, Giovambattista Desideri, Bruno Fabris, Claudio Ferri, Chiara Ganzaroli, et al. 2006. "A Prospective Study of the Prevalence of Primary Aldosteronism in 1,125 Hypertensive Patients." *Journal of the American College of Cardiology* 48 (11): 2293–2300. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.059.

Ruggiero, Carmen, and Enzo Lalli. 2016. “Impact of ACTH Signaling on Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes.” *Frontiers in Endocrinology* 7 (March). https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00024.

Ryan, U. S., J. W. Ryan, D. S. Smith, and H. Winkler. 1975. “Fenestrated Endothelium of the Adrenal Gland: Freeze-Fracture Studies.” *Tissue & Cell* 7 (1): 181–90. https://doi.org/10.1016/s0040-8166(75)80015-2.

Sahut-Barnola, Isabelle, Cyrille de Joussineau, Pierre Val, Sarah Lambert-Langlais, Christelle Damon, Anne-Marie Lefrançois-Martinez, Jean-Christophe Pointud, et al. 2010. “Cushing’s Syndrome and Fetal Features Resurgence in Adrenal Cortex–Specific Prkar1a Knockout Mice.” Edited by G. Stanley McKnight. *PLoS Genetics* 6 (6): e1000980. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000980.

Santos, Robson Augusto Souza, Walkyria Oliveira Sampaio, Andreia C. Alzamora, Daisy Motta-Santos, Natalia Alenina, Michael Bader, and Maria Jose Campagnole-Santos. 2018. “The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7).” *Physiological Reviews* 98 (1): 505–53. https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2016.

Sasano, H., Y. Ohashi, T. Suzuki, and H. Nagura. 1998. “Vascularity in Human Adrenal Cortex.” *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 11 (4): 329–33.

Sasano H., Suzuki T., Moriya T. (2004) “Adrenal Cortex. In: Lloyd R.V. (Eds) Endocrine Pathology. Humana Press, Totowa.” n.d. In .

Satoh, Mamoru, Motoyuki Nakamura, Hidenori Saitoh, Hidetoshi Satoh, Tomonari Akatsu, Junji Iwasaka, Tomoyuki Masuda, and Katsuhiko Hiramori. 2002. “Aldosterone Synthase (CYP11B2) Expression and Myocardial Fibrosis in the Failing Human Heart.” *Clinical Science (London, England: 1979)* 102 (4): 381–86.

Savard, Sébastien, Laurence Amar, Pierre-François Plouin, and Olivier Steichen. 2013. “Cardiovascular Complications Associated With Primary Aldosteronism: A Controlled Cross-Sectional Study.” *Hypertension* 62 (2): 331–36. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01060.

Scholl, Ute I, Gerald Goh, Gabriel Stölting, Regina Campos de Oliveira, Murim Choi, John D Overton, Annabelle L Fonseca, et al. 2013. “Somatic and Germline CACNA1D Calcium Channel Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas and Primary Aldosteronism.” *Nature Genetics* 45 (9): 1050–54. https://doi.org/10.1038/ng.2695.

Scholl, Ute I., James M. Healy, Anne Thiel, Annabelle L. Fonseca, Taylor C. Brown, John W. Kunstman, Matthew J. Horne, et al. 2015. “Novel Somatic Mutations in Primary Hyperaldosteronism Are Related to the Clinical, Radiological and Pathological Phenotype.” *Clinical Endocrinology* 83 (6): 779–89. https://doi.org/10.1111/cen.12873.

Scholl, Ute I, Gabriel Stölting, Carol Nelson-Williams, Alfred A Vichot, Murim Choi, Erin Loring, Manju L Prasad, et al. 2015. “Recurrent Gain of Function Mutation in Calcium Channel CACNA1H Causes Early-Onset Hypertension with Primary Aldosteronism.” *ELife* 4 (April): e06315. https://doi.org/10.7554/eLife.06315.

Scholl, Ute I., Gabriel Stölting, Julia Schewe, Anne Thiel, Hua Tan, Carol Nelson-Williams, Alfred A. Vichot, et al. 2018. “CLCN2 Chloride Channel Mutations in Familial Hyperaldosteronism Type II.” *Nature Genetics* 50 (3): 349–54. https://doi.org/10.1038/s41588-018-0048-5.

Sewer, Marion B., and Michael R. Waterman. 2003. “ACTH Modulation of Transcription Factors Responsible for Steroid Hydroxylase Gene Expression in the Adrenal Cortex.” *Microscopy Research and Technique* 61 (3): 300–307. https://doi.org/10.1002/jemt.10339.

Shifren, J L, N Doldi, N Ferrara, S Mesiano, and R B Jaffe. 1994. “In the Human Fetus, Vascular Endothelial Growth Factor Is Expressed in Epithelial Cells and Myocytes, but Not Vascular Endothelium: Implications for Mode of Action.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 79 (1): 316–22. https://doi.org/10.1210/jcem.79.1.8027247.

Shifren, Jan L., Sam Mesiano, Robert N. Taylor, Napoleone Ferrara, and Robert B. Jaffe. 1998. “Corticotropin Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Fetal

Adrenal Cortical Cells1." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83 (4): 1342–47. https://doi.org/10.1210/jcem.83.4.4730.

Soucek, Laura, Elizabeth R Lawlor, Darya Soto, Ksenya Shchors, Lamorna Brown Swigart, and Gerard I Evan. 2007. "Mast Cells Are Required for Angiogenesis and Macroscopic Expansion of Myc-Induced Pancreatic Islet Tumors." *Nature Medicine* 13 (10): 1211–18. https://doi.org/10.1038/nm1649.

Stagl, Matthew, Mary Bozsik, Christopher Karow, David Wertz, Ian Kloehn, Savin Pillai, Paul J Gasser, Marieke R Gilmartin, and Jennifer A Evans. 2018. "Chronic Stress Alters Adrenal Clock Function in a Sexually Dimorphic Manner." *Journal of Molecular Endocrinology* 60 (2): 55–69. https://doi.org/10.1530/JME-17-0146.

Steenblock, Charlotte, Maria F. Rubin de Celis, Luis F. Delgadillo Silva, Verena Pawolski, Ana Brennand, Martin Werdermann, Ilona Berger, et al. 2018. "Isolation and Characterization of Adrenocortical Progenitors Involved in the Adaptation to Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (51): 12997–2. https://doi.org/10.1073/pnas.1814072115.

Stenina-Adognravi, Olga. 2013. "Thrombospondins: Old Players, New Games." *Current Opinion in Lipidology* 24 (5): 401–9. https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e3283642912.

Stindl, J., P. Tauber, C. Sterner, I. Tegtmeier, R. Warth, and S. Bandulik. 2015. "Pathogenesis of Adrenal Aldosterone-Producing Adenomas Carrying Mutations of the Na+/K+-ATPase." *Endocrinology* 156 (12): 4582–91. https://doi.org/10.1210/en.2015-1466.

Stowasser, Michael, and Richard D Gordon. 2001. "Familial Hyperaldosteronism." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 78 (3): 215–29. https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00097-8.

Stowasser, Michael, Richard D Gordon, Thanuja G Gunasekera, Diane C Cowley, Gregory Ward, Colin Archibald, and B Mark Smithers. 2003. "High Rate of Detection of Primary Aldosteronism, Including Surgically Treatable Forms, after ???Non-Selective??? Screening of Hypertensive Patients:" *Journal of Hypertension* 21 (11): 2149–57. https://doi.org/10.1097/00004872-200311000-00025.

Stowasser, Michael, James Sharman, Rodel Leano, Richard D. Gordon, Gregory Ward, Diane Cowley, and Thomas H. Marwick. 2005. "Evidence for Abnormal Left Ventricular Structure and Function in Normotensive Individuals with Familial Hyperaldosteronism Type I." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90 (9): 5070–76. https://doi.org/10.1210/jc.2005-0681.

Sucheston, Martha E., and Marvin S. Cannon. 1968. "Development of Zonular Patterns in the Human Adrenal Gland." *Journal of Morphology* 126 (4): 477–91. https://doi.org/10.1002/jmor.1051260408.

Sutherland, D. J., J. L. Ruse, and J. C. Laidlaw. 1966. "Hypertension, Increased Aldosterone Secretion and Low Plasma Renin Activity Relieved by Dexamethasone." *Canadian Medical Association Journal* 95 (22): 1109–19.

Suzuki, Sayuri, Jun Namiki, Shinsuke Shibata, Yumi Mastuzaki, and Hideyuki Okano. 2010. "The Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin Is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 58 (8): 721–30. https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955609.

Suzuki, Takashi, Hironobu Sasano, Junji Takeyama, Chika Kaneko, William A. Freije, Bruce R. Carr, and William E. Rainey. 2000. "Developmental Changes in Steroidogenic Enzymes in Human Postnatal Adrenal Cortex: Immunohistochemical Studies: Developmental Changes in Adrenal Steroidogenesis." *Clinical Endocrinology* 53 (6): 739–47. https://doi.org/10.1046/j.1365-2265.2000.01144.x.

Szekeres, Mária, Gábor Turu, Anna Orient, Bence Szalai, Katinka Süpeki, Miklós Cserző, Péter Várnai, and László Hunyady. 2009. "Mechanisms of Angiotensin II-Mediated Regulation of Aldosterone Synthase Expression in H295R Human Adrenocortical and Rat Adrenal Glomerulosa Cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 302 (2): 244–53. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.015.

Teo, Ada E.D., Sumedha Garg, Lalarukh Haris Shaikh, Junhua Zhou, Fiona E. Karet Frankl, Mark Gurnell, Lisa Happerfield, et al. 2015. “Pregnancy, Primary Aldosteronism, and Adrenal *CTNNB1* Mutations.” *New England Journal of Medicine* 373 (15): 1429–36. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504869.

Thomas, Michal, Michelle Keramidas, Emmanuelle Monchaux, and Jean-Jacques Feige. 2003. “Role of Adrenocorticotropic Hormone in the Development and Maintenance of the Adrenal Cortical Vasculature.” *Microscopy Research and Technique* 61 (3): 247–51. https://doi.org/10.1002/jemt.10333.

Thornberry, Nancy A. 1998. “Caspases: Key Mediators of Apoptosis.” *Chemistry & Biology* 5 (5): R97–103. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90615-9.

Toti, P., M. Regoli, G. Nesi, R. Occhini, S. Bartolommei, L. Fonzi, and E. Bertelli. 2005. “Nestin Expression in Normal Adrenal Gland and Adrenocortical Tumors.” *Histology and Histopathology* 20 (4): 1115–20. https://doi.org/10.14670/HH-20.1115.

Udare, Amar, Minu Agarwal, Evan Siegelman, and Nicola Schieda. 2021. “CT and MR Imaging of Acute Adrenal Disorders.” *Abdominal Radiology* 46 (1): 290–302. https://doi.org/10.1007/s00261-020-02580-w.

Unsicker, Klaus. 1971. “On the Innervation of the Rat and Pig Adrenal Cortex.” *Zeitschrift Fr Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 116 (1): 151–56. https://doi.org/10.1007/BF00332863.

Val, Pierre, Juan-Pedro Martinez-Barbera, and Amanda Swain. 2007. “Adrenal Development Is Initiated by Cited2 and Wt1 through Modulation of Sf-1 Dosage.” *Development* 134 (12): 2349–58. https://doi.org/10.1242/dev.004390.

Vaux, David L., Suzanne Cory, and Jerry M. Adams. 1988. “Bcl-2 Gene Promotes Haemopoietic Cell Survival and Cooperates with c-Myc to Immortalize Pre-B Cells.” *Nature* 335 (6189): 440–42. https://doi.org/10.1038/335440a0.

Vidal, Valerie, Sonia Sacco, Ana Sofia Rocha, Fabio da Silva, Clara Panzolini, Typhanie Dumontet, Thi Mai Phuong Doan, et al. 2016. “The Adrenal Capsule Is a Signaling Center Controlling Cell Renewal and Zonation through Rspo3.” *Genes & Development* 30 (12): 1389–94. https://doi.org/10.1101/gad.277756.116.

Vinson, G. P., J. P. Hinson, and I. E. Tóth. 1994. “The Neuroendocrinology of the Adrenal Cortex.” *Journal of Neuroendocrinology* 6 (3): 235–46. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.1994.tb00578.x.

Vittet, D., D. Ciais, M. Keramidas, F. De Fraipont, and J. J. Feige. 2000. “Paracrine Control of the Adult Adrenal Cortex Vasculature by Vascular Endothelial Growth Factor.” *Endocrine Research* 26 (4): 843–52. https://doi.org/10.3109/07435800009048607.

Volpert, O.V., S.S. Tolsma, S. Pellerin, J.J. Feige, H. Chen, D.F. Mosher, and N. Bouck. 1995. “Inhibition of Angiogenesis by Thrombospondin-2.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217 (1): 326–32. https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2780.

Vouillarmet, Julien, Fabio Fernandes-Rosa, Julia Graeppi-Dulac, Pierre Lantelme, Myriam Decaussin-Petrucci, Charles Thivolet, Jean-Louis Peix, Sheerazed Boulkroun, Eric Clauser, and Maria-Christina Zennaro. 2016. “Aldosterone-Producing Adenoma With a Somatic KCNJ5 Mutation Revealing APC-Dependent Familial Adenomatous Polyposis.” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 101 (11): 3874–78. https://doi.org/10.1210/jc.2016-1874.

Walczak, Cécile, Fanny Gaignier, Alexandre Gilet, Feng Zou, Simon N. Thornton, and Armelle Ropars. 2011. “Aldosterone Increases VEGF-A Production in Human Neutrophils through PI3K, ERK1/2 and P38 Pathways.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (12): 2125–32. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.07.010.

Walczak, Elisabeth M., and Gary D. Hammer. 2015. “Regulation of the Adrenocortical Stem Cell Niche: Implications for Disease.” *Nature Reviews Endocrinology* 11 (1): 14–28. https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.166.

Weir, M. 1999. “The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management.” *American Journal of Hypertension* 12 (4): 205–13. https://doi.org/10.1016/S0895-7061(99)00103-X.

Whirledge, S., and J. A. Cidlowski. 2010. “Glucocorticoids, Stress, and Fertility.” *Minerva Endocrinologica* 35 (2): 109–25.

Willenberg, H., S. Schinner, and I. Ansurudeen. 2008. “New Mechanisms to Control Aldosterone Synthesis.” *Hormone and Metabolic Research* 40 (07): 435–41. https://doi.org/10.1055/s-2008-1065336.

Wils, Julien, Céline Duparc, Anne-Françoise Cailleux, Antoine-Guy Lopez, Caroline Guiheneuf, Isabelle Boutelet, Hadrien-Gaël Boyer, et al. 2020. “The Neuropeptide Substance P Regulates Aldosterone Secretion in Human Adrenals.” *Nature Communications* 11 (1): 2673. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16470-8.

Witherow, Fraser N., Ahmed Helmy, David J. Webb, Keith A.A. Fox, and David E. Newby. 2001. “Bradykinin Contributes to the Vasodilator Effects of Chronic Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Patients With Heart Failure.” *Circulation* 104 (18): 2177–81. https://doi.org/10.1161/hc4301.098252.

Yates, Rebecca, Harshini Katugampola, Dominic Cavlan, Katy Cogger, Eirini Meimaridou, Claire Hughes, Louise Metherell, Leonardo Guasti, and Peter King. 2013. “Adrenocortical Development, Maintenance, and Disease.” In *Current Topics in Developmental Biology*, 106:239–312. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416021-7.00007-9.

Ye, Ping, Christopher J. Kenyon, Scott M. MacKenzie, Jonathan R. Seckl, Robert Fraser, John M. C. Connell, and Eleanor Davies. 2003. “Regulation of Aldosterone Synthase Gene Expression in the Rat Adrenal Gland and Central Nervous System by Sodium and Angiotensin II.” *Endocrinology* 144 (8): 3321–28. https://doi.org/10.1210/en.2003-0109.

Ye, Ping, Barbara Mariniello, Franco Mantero, Hirotaka Shibata, and William E Rainey. 2007. “G-Protein-Coupled Receptors in Aldosterone-Producing Adenomas: A Potential Cause of Hyperaldosteronism.” *Journal of Endocrinology* 195 (1): 39–48. https://doi.org/10.1677/JOE-07-0037.

Zajicek, G., I. Ariel, and N. Arber. 1986. “The Streaming Adrenal Cortex: Direct Evidence of Centripetal Migration of Adrenocytes by Estimation of Cell Turnover Rate.” *Journal of Endocrinology* 111 (3): 477–82. https://doi.org/10.1677/joe.0.1110477.

Zeng, Zheng-pei, Xu-lei Tang, Di Yang, Han-zhong Li, Rui-qiang Zhang, Qiang Zeng, Ming Li, et al. 1998. “Immunoreactive Endothelin-1 and Its Receptors in Human Adrenal Tissues:” *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 31: S212–14. https://doi.org/10.1097/00005344-199800001-00059.

Zennaro, Maria-Christina. 2019. “From Transcripts to Proteins: New Insight Into Aldosterone-Producing Adenoma.” *Hypertension* 73 (2): 284–85. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11820.

Zennaro, Maria-Christina, Sheerazed Boulkroun, and Fabio Fernandes-Rosa. 2017. “Genetic Causes of Functional Adrenocortical Adenomas.” *Endocrine Reviews* 38 (6): 516–37. https://doi.org/10.1210/er.2017-00189.

Zennaro, Maria-Christina, Sheerazed Boulkroun, and Fabio L. Fernandes-Rosa. 2020. “Pathogenesis and Treatment of Primary Aldosteronism.” *Nature Reviews Endocrinology* 16 (10): 578–89. https://doi.org/10.1038/s41574-020-0382-4.

Zhang, David X., Kathryn M. Gauthier, John R. Falck, Anjaiah Siddam, and William B. Campbell. 2007. “Steroid-Producing Cells Regulate Arterial Tone of Adrenal Cortical Arteries.” *Endocrinology* 148 (8): 3569–76. https://doi.org/10.1210/en.2007-0169.

Zhou, Junhua, Elena A. B. Azizan, Claudia P. Cabrera, Fabio L. Fernandes-Rosa, Sheerazed Boulkroun, Giulia Argentesi, Emily Cottrell, et al. 2021. “Somatic Mutations of GNA11 and GNAQ in CTNNB1-Mutant Aldosterone-Producing Adenomas Presenting in Puberty, Pregnancy or Menopause.” *Nature Genetics*, August. https://doi.org/10.1038/s41588-021-00906-y.

10. Annexes

1- Revue: Vascular and hormonal interactions in adrenal cortex

Alaa B. Abdellatif[1], Fabio L. Fernandes Rosa[1], Sheerazed Boulkroun[1*], Maria-Christina Zennaro[1,2*]

[1]Université Paris Cité, INSERM, PARCC, F-75015, France,

[2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, France

In revision in Frontiers in Endocrinology

Vascular and hormonal interactions in adrenal cortex

Alaa B. Abdellatif[1], Fabio L. Fernandes Rosa[1], Sheerazed Boulkroun[1*], Maria-Christina Zennaro[1, 2*]

[1]Université Paris Cité, INSERM, PARCC, F-75015, France, [2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique,, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Endocrinology

Specialty Section:
Adrenal Endocrinology

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
995228

Received on:
15 Jul 2022

Journal website link:
www.frontiersin.org

In review

frontiers

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

AA, SB, FFR and MCZ were all involved in writing the review.

Keywords

adrenal gland, Aldosterone, vascularization, Primary aldosteronism (PA), aldosterone producing adenoma

Abstract

Word count: 171

Primary aldosteronism is the most common form of secondary arterial hypertension, due to excessive aldosterone production from the adrenal gland. Although somatic mutations have been identified in aldosterone producing adenoma, the exact mechanisms leading to increased cell proliferation and nodule formation remain to be established. One hypothesis is that changes in vascular supply to the adrenal cortex, due to phenomena of atherosclerosis or high blood pressure, may influence the morphology of the adrenal cortex, resulting in a compensatory growth and nodule formation in response to local hypoxia. In this review, we will summarize our knowledge on the mechanisms regulating adrenal cortex development and function, describe adrenal vascularization in normal and pathological conditions and address the mechanisms allowing the cross-talk between the hormonal and vascular components to allow the extreme tissue plasticity of the adrenal cortex in response to endogenous and exogenous stimuli. We will then address recent evidence suggesting a role for alterations in the vascular compartment that could eventually be involved in nodule formation and the development of primary aldosteronism.

Contribution to the field

In this review, we summarize our knowledge on the mechanisms regulating adrenal cortex development and function, describe adrenal vascularization in normal and pathological conditions and address the mechanisms allowing the cross-talk between the hormonal and vascular components to allow the extreme tissue plasticity of the adrenal cortex in response to endogenous and exogenous stimuli. We also address recent evidence suggesting a role for alterations in the vascular compartment that could eventually be involved in nodule formation and the development of primary aldosteronism.

Funding statement

The laboratory of Dr. Maria-Christina Zennaro is supported through institutional funding from INSERM, by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE93-0003-01) and the Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007864).

In review

Vascular and hormonal interactions in adrenal gland

Alaa B. Abdellatif[1], Fabio L. Fernandes Rosa[1], Sheerazed Boulkroun[1*,#], Maria-Christina Zennaro[1,2*,#]

[1]Université Paris Cité, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France

[2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, Paris, France

[#]Corresponding author

*These authors contributed equally to this work

In review

Address correspondence to:

Maria-Christina Zennaro, MD, PhD
INSERM, U970
Paris Cardiovascular Research Center – PARCC
56, rue Leblanc,
75015 Paris – France
Tel : +33 (0)1 53 98 80 42
Fax : + 33 (0)1 53 98 79 52
e-mail : maria-christina.zennaro@inserm.fr

or

Sheerazed Boulkroun, PhD
INSERM, U970
Paris Cardiovascular Research Center – PARCC
56, rue Leblanc,
75015 Paris – France
Tel : +33 (0)1 53 98 80 24
Fax : + 33 (0)1 53 98 79 52
e-mail : sheerazed.boulkroun@inserm.fr

Running Title: Vascular and hormonal interactions in adrenal gland

Word count – Abstract: 171

Word count – manuscript: 4700

Number of figures: 1

Number of tables: 0

In review

Abstract

Primary aldosteronism is the most common form of secondary arterial hypertension, due to excessive aldosterone production from the adrenal gland. Although somatic mutations have been identified in aldosterone producing adenoma, the exact mechanisms leading to increased cell proliferation and nodule formation remain to be established. One hypothesis is that changes in vascular supply to the adrenal cortex, due to phenomena of atherosclerosis or high blood pressure, may influence the morphology of the adrenal cortex, resulting in a compensatory growth and nodule formation in response to local hypoxia. In this review, we will summarize our knowledge on the mechanisms regulating adrenal cortex development and function, describe adrenal vascularization in normal and pathological conditions and address the mechanisms allowing the cross-talk between the hormonal and vascular components to allow the extreme tissue plasticity of the adrenal cortex in response to endogenous and exogenous stimuli. We will then address recent evidence suggesting a role for alterations in the vascular compartment that could eventually be involved in nodule formation and the development of primary aldosteronism.

In review

Key words: adrenal gland, vascularization, aldosterone, primary aldosteronism, aldosterone producing adenoma

Introduction

The adrenal gland is an endocrine tissue composed of two distinct zones with different functions: the cortex, responsible for steroid biosynthesis, and the medulla, where catecholamine biosynthesis occurs. In human, the adrenal cortex is subdivided into three distinct functional zones: the outer part of the adrenal cortex is formed by the zona glomerulosa (ZG) responsible for mineralocorticoid biosynthesis, the intermediate and thickest part is formed by the zona fasciculata (ZF), responsible for glucocorticoids biosynthesis, and the inner part is formed by the zona reticularis (ZR) responsible for the biosynthesis of adrenal androgens (1). Both adrenal glands receive arterial blood supply from the ventral aorta and the renal artery; the left adrenal is also supplied by the caudal branch of the aorta and the right adrenal by the phrenic artery (2)

Interestingly, the adrenal gland is one of the most vascularized organs. It has been shown that this organized vascular network played an important role during embryogenesis to ensure adrenal growth and differentiation, but also during whole life to provide precursors necessary for the biosynthesis of steroid hormones and to allow their secretion in blood flow (3). The specific ramification of adrenal cortex vasculature suggests strong interactions between endothelial and adrenal cells (4), allowing their coordinated development. Moreover, the proximity between endothelial and endocrine cells allows a rapid release of steroids into the blood flow.

Primary aldosteronism (PA) is the most common form of secondary arterial hypertension due to autonomous aldosterone production from the adrenal cortex. The two major causes are unilateral aldosterone producing adenoma (APA) or bilateral adrenal hyperplasia (BAH, also called idiopathic hyperaldosteronism). Patients show increased blood pressure, often associated with hypokalemia. Diagnosis is made in the presence of suppressed renin levels and increased aldosterone to renin ratio and is confirmed by one of different suppression tests. Adrenal

In review

imaging and adrenal vein sampling allow to distinguish between unilateral and bilateral forms and to introduce optimal treatment, either adrenalectomy for APA or treatment with mineralocorticoid receptor antagonists for bilateral forms (5). PA is found in up to 10% of patients with hypertension (6,7) and its prevalence increases with the severity of hypertension (8). Over the past ten years, major progress has been made in elucidating genetic defects underlying familial and sporadic forms of PA. In particular, somatic mutations have been identified in genes coding for ion channels (*KCNJ5*, *CACNA1D*, *CACNA1H*, *CLCN2*) and ATPases (*ATP1A1*, *ATP2B3*) in up to 96% of APA (9–13) . These mutations lead to cell membrane depolarization (*KCNJ5*, *ATP1A1*, *CLCN2*) or increase intracellular calcium (*ATP2B3*, *CACNA1D*, *CACNA1H*), leading to activation of calcium signaling that is the main trigger for aldosterone biosynthesis. In addition, mutations in *CTNNB1* coding for β-catenin, à key regulator of adrenal cortex development and function, have been identified in a subset of patients with PA, either alone or in association with mutations of *GNAQ*/*GNA11* in patients presenting with PA at puberty, pregnancy or menopause (14). However, it is still unclear, whether those mutations, in addition to promoting aldosterone biosynthesis, also increase cell proliferation and nodule formation and different hypotheses have emerged in recent years. Among them it has been postulated that changes in vascular supply to the adrenal cortex, due to phenomena of atherosclerosis or high blood pressure, may influence the morphology of the adrenal cortex, resulting in a compensatory growth and nodule formation in response to local hypoxia (15). This could eventually lead to the development of APA in extreme cases.

In this review we will briefly summarize the mechanisms regulating aldosterone biosynthesis in the adrenal gland, describe adrenal vascularization in normal conditions and how the cross-talk between the hormonal (epithelial) and vascular (endothelial) components ensures adrenal cortex growth and function under physiological conditions. We will then address recent

In review

evidence suggesting a role for alterations in the vascular compartment that could eventually be involved in nodule formation and the development of PA.

Regulation of aldosterone biosynthesis in the adrenal cortex

Aldosterone is synthesized in the ZG of the adrenal cortex from the precursor cholesterol through a series of enzymatic steps involving in particular the enzyme aldosterone synthase, encoded by *CYP11B2*, which is specifically expressed in this zone. Regulation of aldosterone biosynthesis is aimed at maintaining its essential functions as one of the principal regulators of extracellular fluid and electrolyte homeostasis as well as blood pressure, due to its effects on sodium reabsorption and potassium secretion in the kidney. Thus, aldosterone biosynthesis is regulated by the renin-angiotensin system (RAS), potassium concentrations and, to a lesser extent, by the adrenocorticotropic hormone (ACTH) (1). Following dehydration or salt loss, activation of the RAS regulates aldosterone biosynthesis via angiotensin II (AngII) binding to its type 1 receptor (AT1R) in ZG cells. This activates the inositol triphosphate pathway that stimulates Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum; alternatively, AngII inhibits potassium channels and the Na^{+},K^{+}-ATPase, inducing cell membrane depolarization, followed by opening of voltage-gated calcium channels. Both pathways increase intracellular calcium concentrations and activate calcium signaling, which regulates different steps involved in aldosterone biosynthesis, including expression of *CYP11B2* via calcium/calmodulin-dependent protein kinases (16). Similarly, increased extracellular potassium concentrations induce cell membrane depolarization followed by activation of voltage-gated calcium channels and activation of calcium signaling (17).

ACTH binds to its receptor (melanocortin type 2 receptor, MC2R) and activates adenylate cyclase (AC), with subsequent activation of downstream signaling pathways, in particular the

In review

cAMP-dependent protein kinase (PKA) pathway (Figure 1). PKA activates StAR (steroidogenic acute regulatory protein) either directly, or by increasing its expression via CREB (cAMP response element binding protein) phosphorylation, thus increasing the amount of cholesterol delivered to the inner mitochondrial membrane. In addition, ACTH also increases the expression of other enzymes of the steroidogenic cascade, such as *CYP11A1*, increasing the amount of precursors for aldosterone biosynthesis (18,19).

In addition to these endocrine regulatory loops, autocrine and paracrine regulation of aldosterone production has been described. Different factors produced by steroidogenic cells, such as renin and angiotensin II (20–22), epoxyeicosatrienoic acid (EET) or prostaglandin E2 (PGE2), may modulate aldosterone secretion though an autocrine mechanism (23). Components of the RAS have been detected in the adrenal, however their role in adrenal function is still unclear (24). It has been proposed that the adrenal RAS could play a role in the control of aldosterone production under potassium stimulation (21). Interestingly, in wild-type mice, adrenal production of renin is observed during embryonic development while kidneys are immature (25), but down-regulated after birth. However, in specific mouse models, expression of renin is observed even in adult mice to compensate deficiency in proteins involved in the control of aldosterone biosynthesis. This is the case in Task3 (26) or aldosterone synthase deficient mice (27), as well as in mast cell deficient mice under low salt diet (28). Furthermore, paracrine regulation of aldosterone production is mediated by factors released by components of the microenvironment both in normal human adrenals and adrenals with APA, i.e. chromaffin cells, endothelial cells, adipocytes, nerve fibers and immune cells (29–32). Interestingly, serotonin (5-HT) released by perivascular mast cells is known to induce aldosterone production by activating the 5-hydroxytryptamine receptor 4 (5-HT4) expressed in ZG cells (33). Chromaffin cells and nerve fibers stimulate aldosterone production by secreting neurotransmitters (NT), including catecholamines and various neuropeptides (34). In particular,

In review

it has been shown recently that the neuropeptide substance P released by intraadrenal nerve fibres is able to regulate aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex by binding to neurokinin type 1 receptors (31). Cytokine C1q/TNF related protein and the adipokine leptin are also able *in vitro* to activate aldosterone production (35,36). ZG cells express leptin receptors, thus leptin released by adrenal adipocytes may have a direct effect on aldosterone production (35). Finally, endothelial cells secrete endothelin 1 (ET-1) which by binding to endothelin receptor type A and B (ET-A, ET-B) on adrenocortical cells can stimulate aldosterone production (37,38).

Vascularisation of the adrenal cortex

As an endocrine organ, the adrenal gland is highly vascularized, allowing each endocrine cell to be in contact with an endothelial cell (39). Part of the arterial flow to both adrenal glands is provided by the ventral aorta. The remaining arterial supply is provided bilaterally by the renal artery, completed by the phrenic artery for the right adrenal and by a caudal branch of the aorta for the left adrenal (4,39). In the middle of the medulla, the central vein is responsible for venous drainage. This vein merges with the vena cava in the right adrenal or the renal vein in the left adrenal. Three adrenal arteries are distinguished: the superior adrenal artery; the middle adrenal artery and the inferior adrenal artery.

From the capsule, two types of arteries emerge from the arteriolar capsular plexus and enter the cortex and medulla: 1) The arteriae medullae, responsible for medulla arterial supply after passing directly through the adrenal cortex; and 2) The arteriae cortices, that arise directly from the capsule plexus, form an anastomotic network in the ZG, then cross the ZF as longitudinal capillary sinusoids between the columns of ZF cells (4,39). The vasculature of the adrenal gland is composed of fenestrated sinusoids (40) that are highly permeable to fluids and small

In review

molecules. This facilitates the supply in nutrients, oxygen and cholesterol to the gland and the secretion of steroid hormones into the blood flow.

The widely branched capillary bed of the adrenal cortex strongly suggests an interaction between endothelial cells (ECs) and adrenal epithelial cells (4,41). Indeed, ACTH controls the coordinated development of vessels and endocrine cells (Figure 1). The interaction between adrenocortical cells and endothelial cells enables a coordinated development of the vascular network with the proliferation of adrenal cells and organ growth. Endocrine glands are characterized by the high expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) even in adults, regardless of the absence of active angiogenesis. In this context, the role of VEGF-A, whose expression is controlled by ACTH, is to maintain a high density of stable fenestrated microvessels (42). The combined secretion of angiogenic factors by endocrine cells and trophic factors by endothelial cells makes it possible to maintain a "symbiosis" between these cellular compartments. Regulation of adrenal vascularization and growth must be coordinated to ensure that the cortical mass has appropriate vascular support essential for both growth of the adrenal cortex and its endocrine function (43).

In review

Regulation of vascularization in the adrenal cortex

Maintenance of the vascularization of the adrenal cortex and the regulation of blood flow by vasoconstriction involves different signaling pathways. Angiotensin II plays an important role in the regulation of blood pressure through its direct action on vasoconstriction (44). Interestingly, in the adrenal, vasodilatation or vasoconstriction may occur depending on the levels of angiotensin II. Low concentration of Angiotensin II induces, via AT2R activation, production and release of nitric oxide (NO) by endothelial cells, whereas increased concentration of angiotensin II leads to vasoconstriction due to activation of smooth muscle

AT1R, resulting in decreased adrenal blood flow (45). ACTH, on the other hand, plays a role in the development and maintenance of this vascularization, and regulates blood flow to the adrenal gland through the release of vasorelaxant agents by adrenocortical cells such as metabolites of arachidonic acid (i.e epoxyeicosatrienoic acids, EETs) (46), but also through the release of histamine and serotonin by adrenal mast cells, factors modulating the tonicity of adrenal arterioles (47), indirectly influencing the production of steroids. Also, in response to ACTH, adrenal cortex cells secrete Thrombospondin-2 (TSP2), a large matricellular protein (48). It has been shown that TSP2 may act as an inhibitor of angiogenesis. *In vitro*, TSP2 inhibits the migration of capillary endothelial cells and, *in vivo*, neovascularization (49). It has been also shown that NO induces angiogenesis via the suppression of TSP2 expression, confirming the anti-angiogenic role of TSP2 (50). In addition, TSP2 may mediate ACTH-dependent centripetal adrenocortical cell migration (51). However, in mice lacking TSP2 no alterations in adrenal cortex morphology were observed (52,53).

In the adrenal gland, ACTH also stimulates the release of VEGF and stabilization of its mRNA by the HuR protein (54). Conversely, the suppression of ACTH by dexamethasone in mice induces a progressive decrease in the expression of VEGF in the cells of the adrenal cortex and the regression of the vascularization (55). Interestingly, studies have also shown the role of mast cells in the development and maintenance of vascularization and in vasoconstriction. Mast cells are important cells in the immune system that originate from hematopoietic stem cells, which secrete serotonin, chondroitin, histamine and protease (56). In the adrenal gland, mast cells are present in the subcapsular region, modulating the tone of the arterioles of the adrenal gland and therefore the blood flow by the release of histamine and serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) (57). These cells are also a source of angiogenic factors including VEGF, fibroblast growth factor (FGF) 2, transforming growth factor β (TGF-β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin (IL) 8. They also induce the expression of VEGF by the release

In review

of cytokines and growth factors (TNF-α, TGF-β, platelet-derived growth factor (PDGF), FGF2 and IL-6) (58). Growth factors and cytokines released by mast cells have the ability to modulate endothelial cell function by increasing the expression of E-selectin but also by stimulating other cells that facilitate angiogenesis such as fibroblasts, epithelial cells and macrophages (59). The activation of mast cells also allows an increase in microvascular permeability, which has proangiogenic effects following the release of histamine, prostaglandin D2, Leukotriene B4, Leukotriene C4, VEGF and platelet-activating factor (60). Finally, the adrenal gland is a richly innervated organ, allowing innervation of chromaffin cells of the adrenal medulla. This innervation is therefore under the control of the sympathetic nervous system and allows the innervation of the internal part of the adrenal cortex. The adrenal cortex is also thought to be innervated by sympathetic fibers originating from extra-adrenal neurons, which, together with the blood vessels form the subcapsular plexus (61).

Adrenal cortex and medulla develop from two separate embryological tissues: the medulla is derived from the neural crest, while the cortex develops from the intermediate mesoderm. During development, the human fetal adrenal (HFA) cortex that develops from the adrenogonadal primordium, is composed of two zones: the inner zone, referred to as the fetal zone (FZ) with high expression of steroidogenic enzymes and a smaller outer zone, called definitive zone (DZ) where expression of steroidogenic enzymes is lower (62). The FZ of the adrenal cortex is the principal site of VEGF synthesis and one of the most vascularized organs in the human fetus (63). This pattern of VEGF localization is consistent with the fetal zone being the most vascular compartment in the cortex and the primary site of adrenal cortical growth. Thus, VEGF may act as a local regulator of fetal zone vascularization. The fetal zone vasculature comprises an extensive sinusoidal plexus. In contrast, the vasculature of the definitive zone is composed of distinct arterioles that arise from terminal branches of the capsular arterial network and enter the gland along connective tissue trabeculae. Therefore, as

In review

the cortex grows, the bulk of neovascularization would be expected to occur in the fetal zone (64). This vascular arrangement results in centripetal blood flow from the capsule through the definitive zone and into the sinusoidal network of the fetal zone to eventually drain into the central vein. Angiogenesis is essential for the rapid growth of the HFA. In addition, the HFA requires the development of an extensive vascular system for the delivery of steroid hormone precursors to the gland and the secretion of hormone products into the peripheral circulation. Various factors are involved in the regulation of angiogenesis. The evaluation of the expression and regulation of angiogenic factors specific to vascular endothelial cells, VEGF family members, angiopoietins (Angs) 1 and 2 in HFA medium showed that these factors are expressed in the HFA and that ACTH regulates them in isolated HFA cortical cells, suggesting that these factors may be key local regulators of HFA angiogenesis (65). Thus, they can mediate the tropic action of ACTH, exerting parallel control over the vascular system. In particular, ACTH induces an altered balance in which Ang2 predominates over Ang1. In addition, the Ang2 protein is mainly localized in the periphery of the HFA (i.e. the DZ and the outer region of the FZ). Its expression has been restricted to vascular remodeling sites, and Ang2 has been proposed to make endothelial cells sensitive to angiogenic stimuli, such as VEGF-A and FGF-2 (66). Furthermore, Steroidogenic factor 1 (SF1) and Ang2 were found to be coexpressed in early stages of HFA development (67). It is demonstrated that despite the role of SF-1 in adrenal development and function, it plays a crucial role also in its angiogenesis by activating the Ang2 gene promoter in HFA (68). By using chromatin immunoprecipitation (ChIP) microarrays, it has been shown that vascular remodeling is a mechanism regulated by SF-1 in adrenal development and tumorigenesis (67).

Coordinated development of steroidogenesis and angiogenesis in the adrenal cortex by ACTH

In review

The adrenal cortex is a highly plastic organ, in which environmental stimuli are translated to hormonal responses that can involve extreme tissue remodeling. Example of this is the ZG expansion observed under a low salt diet, which stimulates the renin-angiotensin system to promote aldosterone biosynthesis (69). On the other hand, endogenous or exogenous glucocorticoid excess, such as treatment with dexamethasone, leads to a major regression of the ZF and suppression of glucocorticoid production (70). Both these changes are reversible and may involve major modification of adrenal vascularization.

ACTH is the main hormone regulating the function of the zona fasciculata and zona reticularis and stimulating glucocorticoid biosynthesis; it also stimulates, to a lesser extent, aldosterone production by the ZG. In addition, ACTH when binding to its receptor MC2R in the adrenals also induces the adrenal production of factors affecting adrenal growth and its blood flow. Indeed, ACTH controls angiogenesis and vascularization in the adrenal gland by stimulating the intra-adrenal production of VEGF and the vaso-relaxant EETs. On the other hand, VEGF can act on adrenal cells by binding on VEGF receptors present on adrenocortical cells and stimulates aldosterone production. Vascularization and adrenal cortex development must be coordinated to ensure that adrenocortical cells have access to blood vessels as the adrenal growths.

The vasculature of the HFA is established by the eighth week of gestation when the adrenal is supplied by arteries from the descending aorta, and the capillary sinusoids within the gland form a continuum with the systemic circulation. This stimulation is mediated by specific angiogenic factors like VEGF (71). Shifren et al (64) showed that the human fetal adrenal cortex is highly vascularized, consistent with its function as an endocrine organ, and that the human fetal adrenal cortex expresses VEGF, which may regulate cortical vascular development (71). ACTH increases the steady state abundance of mRNA encoding VEGF. This may suggest that VEGF expression and secretion by human fetal adrenal cortical cells are up-regulated by ACTH

In review

and factors that increase intracellular cAMP production. In the same study, the authors also demonstrated that forskolin and ACTH are able to stimulate VEGF expression and secretion by human fetal adrenocortical cells. This suggests that adenylate cyclase and cAMP pathways are the main regulators of ACTH-dependent VEGF production. Therefore, ACTH induces steroidogenic enzymes, cortisol and aldosterone production and expression of different growth factors via the same pathway, suggesting that ACTH may coordinate vascularization, adrenocortical development and steroidogenesis in the adrenal gland.

Cross-talk between aldosterone and the vascular system

In addition to AngII, extracellular potassium and ACTH, endothelin and VEGF have been shown to stimulate aldosterone production in a paracrine manner (29,72). In particular, VEGF has been shown to stimulate aldosterone production indirectly by maintaining endothelial integrity but also directly by stimulating aldosterone synthase expression in ZG cells (72). The action of VEGF is either synergistic or independent of Ang II. Interestingly, in contrast to Ang II, VEGF does not increase the expression of StAR. The stimulatory role of VEGF is restricted to enhance aldosterone production, but does not modify cortisol biosynthesis in H295R adrenocortical cells (72). In addition, the inhibition of VEGF by overexpression of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) in rats is associated with reduced adrenal cortex vascularization (reduction of CD31 endothelial cell marker) that is accompanied by a reduction of aldosterone production (72). These results suggest that VEGF may have a role in aldosterone production independently of the RAS and may play a role in the autonomous overproduction of aldosterone in PA.

It has also been demonstrated that endothelial cell-conditioned medium stimulates aldosterone production in human adrenocortical H295R cells (73,74). The interaction between

In review

endothelial and steroidogenic cells was demonstrated at the molecular level. *In vitro* studies in cultured human adrenocortical cells revealed that cytokines like IL-6 and ET-1, as well as NO produced by endothelial cells, are the main actors in this interaction (35,36,74). Adrenocortical cells express big ET-1, the precursor of endothelin, and its specific proteolytic enzyme endothelin converting enzyme, which generates the 21 amino acid peptide ET-1 (38,75). Interestingly, ET-1 stimulates aldosterone biosynthesis in human and in rats (76). This action is mediated by the two endothelin receptor subtypes ETA and ETB expressed in the ZG of the adrenal cortex (35,36).

On the other hand, aldosterone can act not only on renal epithelial cells to regulate blood pressure but also on vascular endothelial and smooth muscle cells. Indeed, activation of its receptor, the mineralocorticoid receptor (MR), has been shown to induce endothelial dysfunction, inflammation, remodeling, stiffening and atherosclerosis (77–83). In addition, it has been demonstrated in mice that aldosterone increases vessel density in response to ischemia, a phenomenon mediated by MR activation, angiotensin II signaling and VEGF (84). Aldosterone also increases placental growth factor (PGF, a member of the VEGF family) expression in human atherosclerotic vessels, leading to inflammation and proliferation of vascular cells (85). Aldosterone may also up-regulates VEGF-A production in human neutrophils by activating PI3 kinases, ERK1/2, and to a lesser extent p38 MAPK pathways, suggesting that aldosterone has an active role on neovascularization (86).

Interplay between vascular and hormonal components in primary aldosteronism

Adrenals with APA show increased nodulation and reduced vascularization in the peritumoral adrenal cortex, as well as ZG hyperplasia (87). In addition, different studies indicate that the structure and function of the adrenal cortex changes with age and it has been suggested

In review

313 that this may be a consequence of vascular dysfunction (88). Ageing is associated with an
314 increase in adrenal nodulation in the general population, which may represent compensatory
315 growth in response to ischemic changes due to localized atherosclerosis or hypertension (15).
316 In addition, the adrenal cortex contains special structures, called aldosterone producing cell
317 clusters (APCCs), in which somatic mutations have been identified in genes responsible for
318 APA in normal subjects (89) and in adrenals with APA (12). It has been postulated that APCCs
319 represent structures of autonomous aldosterone production. Interestingly, the number of APCCs
320 increases with age(90), in parallel with a dysregulation of aldosterone production (88).

321 Mutations in different genes increase aldosterone production in PA, but additional
322 mechanisms may contribute to increased cell proliferation and APA development. We have
323 recently shown that retinoic receptor α (RARα) contributes to the maintenance of normal
324 adrenal cortex structure and cell proliferation in mice, by modulating non-canonical Wnt
325 signaling, extracellular matrix composition and angiogenesis. Dysregulation of this interaction
326 may contribute to abnormal cell proliferation, creating a propitious environment for the
327 emergence of specific driver mutations in PA (91). Indeed, RARα was identified as a central
328 molecular network involved in adrenal nodulation in a transcriptome study comparing 48 APA
329 and 11 control adrenals. Inactivation of Rarα in mice induced a major structural disorganization
330 of the adrenal cortex in both sexes, with increased adrenal cortex size in female mice and
331 increased cell proliferation in males. These changes were associated with abnormalities of
332 vessel architecture and extracellular matrix. At the molecular level, Rarα inactivation led to
333 decreased expression of components of the non-canonical Wnt signalling pathway, with
334 decreased expression of *Wnt4*, *Tcf3*, *Lef1*, without affecting the canonical Wnt pathway nor
335 PKA signaling. Rarα inactivation also reduced the expression of Vegfa, while other
336 angiogenesis factors such as Vegfc and Hif1α were not affected. In contrast, the expression of
337 components of the extracellular matrix like fibronectin 1, microfibrillar associated protein 2 and

In review

5 (Mfap2 and Mfap5) and collagen 3α1 were increased. Altogether, these data highlight the important role of the interplay between the vascular and hormonal components in the adrenal cortex and suggest that alterations affecting this interplay, such as modifications of the extracellular matrix composition, may contribute to the disorganization of the adrenal cortex by modulating adrenocortical and vascular cell migration (91).

As observed in normal adrenals, it is expected that endothelin secreted by adrenal vessels and its signaling pathway in steroidogenic cells can stimulate aldosterone production and may have a role in its autonomous overproduction and by consequence contribute to the development of PA(75). In order to verify this hypothesis, Morello et al (92) showed that normal adrenals and APA had similar levels of gene expression of prepro-ET-1, the endothelin-converting enzyme and the endothelin receptors ETA and ETB. Interestingly, ET-1 was demonstrated to have the same stimulatory effect as ANG II on aldosterone production in APA (93). Thus, administration of ETA and ETB antagonists to patients with primary aldosteronism resulted in a decrease in plasma aldosterone levels (94). However, ET-1 receptors were found to be partially downregulated in APA in another study (38). These observations suggest that the endothelin signaling pathway in adrenocortical cells may play a role on aldosterone biosynthesis in APA and normal adrenals, but that this system is not crucial in the pathogenesis of this disease.

Recently, we have investigated the relationship between different signaling pathways and components of the microenvironment in adrenals with APA. We have applied multiplex immunofluorescence and multispectral image analysis to investigate the colocalization of proteins involved in aldosterone (CYP11B2) and cortisol (CYP11B1/CYP17A1) biosynthesis, markers of Wnt/β-catenin (β-catenin) and ACTH/cAMP/PKA (MC2R, pCREB) signaling, as well as paracrine pathways of the tumor microenvironment (Tryptase, S100) and vascularization (CD34) (95). Our results show a dense vascularization in APA, which is

In review

independent of the somatic mutation status of the tumour. Although the vascular surface was similar in areas expressing aldosterone synthase and areas not expressing aldosterone synthase in APA, *VEGFA* expression analyzed by RT-qPCR in three APA was higher in areas expressing aldosterone synthase. This difference may be explained by the presence of perivascular mast cells, which was higher in areas positive for aldosterone synthase expression, which are involved in the maintenance of angiogenesis; alternatively, activation of the ACTH/cAMP pathway via MC2R may be involved, as MC2R was highly expressed in these same regions.

Vascularization and angiogenesis were also studied in other types of benign adrenocortical adenomas as well as in malignant adrenocortical tumors (ACC). Whether it was a benign or a malignant tumor, carriers of adrenocortical tumors showed higher circulating VEGF levels in comparison with healthy subjects (96,97). Interestingly, VEGF expression was shown to be very high in patients with adrenocortical carcinomas and higher in APA in comparison to non-functional adenomas (98). Despite the high expression of VEGF, APA did not present higher vascular density than normal adrenals, but remarkably APA presented higher vascular density than non-functional adenomas, cortisol producing adenomas and adrenal cortical carcinomas(98). The same study also demonstrated that in APA, vascular density is positively correlated to aldosterone levels and negatively correlated to plasma renin activity. These results suggest that angiogenesis and the functional status of adrenocortical tumors are closely associated.

Conclusions

In conclusion, the coordinated interaction between steroidogenic and endothelial cells plays a crucial role in adrenal development and function and allows adrenal cortex remodeling in response to different physiological stimuli, such as modifications of sodium diet or stress

In review

response. Key players in this interaction appear to be ACTH and VEGF, which cross-talk to regulate hormone biosynthesis and vessel growth (Figure 1). Alterations in this interaction or factors affecting adrenal cortex vascularization may modify adrenocortical cell growth and promote cell proliferation and nodule formation, creating a propitious environment for the occurrence of somatic mutations in genes involved in the development of PA. Further studies will allow deciphering how this interplay may be altered in physiological or pathological conditions.

Acknowledgments

The laboratory of Dr. Maria-Christina Zennaro is supported through institutional funding from INSERM, by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE93-0003-01) and the Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007864).

Disclosures

The authors have nothing to disclose

In review

References

1. Connell JMC, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol* (2005) 186:1–20. doi: 10.1677/joe.1.06017

2. Vinson GP, Pudney JA, Whitehouse BJ. The mammalian adrenal circulation and the relationship between adrenal blood flow and steroidogenesis. *J Endocrinol* (1985) 105:285–294. doi: 10.1677/joe.0.1050285

3. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige J-J. Role of adrenocorticotropic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* (2003) 61:247–251. doi: 10.1002/jemt.10333

4. Bassett JR, West SH. Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. *Microsc Res Tech* (1997) 36:546–557. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(19970315)36:6<546::AID-JEMT11>3.0.CO;2-O

5. Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M, Young WF. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* (2016) 101:1889–1916. doi: 10.1210/jc.2015-4061

6. Hannemann A, Wallaschofski H. Prevalence of Primary Aldosteronism in Patient's Cohorts and in Population-based Studies - A Review of the Current Literature. *Horm Metab Res* (2012) 44:157–162. doi: 10.1055/s-0031-1295438

7. Monticone S, Burrello J, Tizzani D, Bertello C, Viola A, Buffolo F, Gabetti L, Mengozzi G, Williams TA, Rabbia F, et al. Prevalence and Clinical Manifestations of Primary Aldosteronism Encountered in Primary Care Practice. *J Am Coll Cardiol* (2017) 69:1811–1820. doi: 10.1016/j.jacc.2017.01.052

8. Brown JM, Siddiqui M, Calhoun DA, Carey RM, Hopkins PN, Williams GH, Vaidya A. The Unrecognized Prevalence of Primary Aldosteronism: A Cross-sectional Study. *Ann Intern Med* (2020) 173:10–20. doi: 10.7326/M20-0065

9. Nanba K, Omata K, Else T, Beck PCC, Nanba AT, Turcu AF, Miller BS, Giordano TJ, Tomlins SA, Rainey WE. Targeted Molecular Characterization of Aldosterone-Producing Adenomas in White Americans. *J Clin Endocrinol Metab* (2018) 103:3869–3876. doi: 10.1210/jc.2018-01004

10. Nanba K, Omata K, Gomez-Sanchez CE, Stratakis CA, Demidowich AP, Suzuki M, Thompson LDR, Cohen DL, Luther JM, Gellert L, et al. Genetic Characteristics of Aldosterone-Producing Adenomas in Blacks. *Hypertension* (2019) 73:885–892. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12070

11. Nanba K, Yamazaki Y, Bick N, Onodera K, Tezuka Y, Omata K, Ono Y, Blinder AR, Tomlins SA, Rainey WE, et al. Prevalence of Somatic Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas in Japanese Patients. *J Clin Endocrinol Metab* (2020) 105: doi: 10.1210/clinem/dgaa595

12. De Sousa K, Boulkroun S, Baron S, Nanba K, Wack M, Rainey WE, Rocha A, Giscos-Douriez I, Meatchi T, Amar L, et al. Genetic, Cellular, and Molecular Heterogeneity in Adrenals With Aldosterone-Producing Adenoma. *Hypertension* (2020) 75:1034–1044. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14177

13. Ono Y, Yamazaki Y, Omata K, Else T, Tomlins SA, Rhayem Y, Williams TA, Reincke M, Carling T, Monticone S, et al. Histological Characterization of Aldosterone-producing Adrenocortical Adenomas with Different Somatic Mutations. *J Clin Endocrinol Metab* (2020) 105: doi:

In review

10.1210/clinem/dgz235

14. Zhou J, Azizan EAB, Cabrera CP, Fernandes-Rosa FL, Boulkroun S, Argentesi G, Cottrell E, Amar L, Wu X, O'Toole S, et al. Somatic mutations of GNA11 and GNAQ in CTNNB1-mutant aldosterone-producing adenomas presenting in puberty, pregnancy or menopause. *Nat Genet* (2021) doi: 10.1038/s41588-021-00906-y

15. Sasano H., Suzuki T., Moriya T. (2004) Adrenal Cortex. In: Lloyd R.V. (eds) Endocrine Pathology. Humana Press, Totowa.

16. Hattangady NG, Olala LO, Bollag WB, Rainey WE. Acute and chronic regulation of aldosterone production. *Mol Cell Endocrinol* (2012) 350:151–162. doi: 10.1016/j.mce.2011.07.034

17. Bandulik S. Of channels and pumps: different ways to boost the aldosterone? *Acta Physiol* (2017) 220:332–360. doi: 10.1111/apha.12832

18. Sewer MB, Waterman MR. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* (2003) 61:300–307. doi: 10.1002/jemt.10339

19. Ruggiero C, Lalli E. Impact of ACTH Signaling on Transcriptional Regulation of Steroidogenic Genes. *Front Endocrinol* (2016) 7: doi: 10.3389/fendo.2016.00024

20. Naruse M, Sussman CR, Naruse K, Jackson RV, Inagami T. Renin exists in human adrenal tissue. *J Clin Endocrinol Metab* (1983) 57:482–487. doi: 10.1210/jcem-57-3-482

21. Nakamaru M, Misono KS, Naruse M, Workman RJ, Inagami T. A role for the adrenal renin-angiotensin system in the regulation of potassium-stimulated aldosterone production. *Endocrinology* (1985) 117:1772–1778. doi: 10.1210/endo-117-5-1772

22. Mulrow P. Renin-Angiotensin System in the Adrenal. *Horm Metab Res* (1998) 30:346–349. doi: 10.1055/s-2007-978896

23. Lefebvre H, Duparc C, Naccache A, Lopez A-G, Castanet M, Louiset E. "Paracrine Regulation of Aldosterone Secretion in Physiological and Pathophysiological Conditions.," *Vitamins and Hormones*. Elsevier (2019). p. 303–339 doi: 10.1016/bs.vh.2018.10.001

24. Mulrow PJ. Adrenal renin: regulation and function. *Front Neuroendocrinol* (1992) 13:47–60.

25. Kon Y, Hashimoto Y, Kitagawa H, Sugimura M, Murakami K. Renin immunohistochemistry in the adrenal gland of the mouse fetus and neonate. *Anat Rec* (1990) 227:124–131. doi: 10.1002/ar.1092270114

26. Bandulik S, Tauber P, Penton D, Schweda F, Tegtmeier I, Sterner C, Lalli E, Lesage F, Hartmann M, Barhanin J, et al. Severe Hyperaldosteronism in Neonatal Task3 Potassium Channel Knockout Mice Is Associated With Activation of the Intraadrenal Renin-Angiotensin System. *Endocrinology* (2013) 154:2712–2722. doi: 10.1210/en.2013-1101

27. Lee G, Makhanova N, Caron K, Lopez MLS, Gomez RA, Smithies O, Kim H-S. Homeostatic Responses in the Adrenal Cortex to the Absence of Aldosterone in Mice. *Endocrinology* (2005) 146:2650–2656. doi: 10.1210/en.2004-1102

28. Boyer H-G, Wils J, Renouf S, Arabo A, Duparc C, Boutelet I, Lefebvre H, Louiset E. Dysregulation of Aldosterone Secretion in Mast Cell–Deficient Mice. *Hypertension* (2017) 70:1256–1263. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09746

29. Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP. Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocr Rev* (1998) 19:101–143. doi:

In review

10.1210/edrv.19.2.0326

30. Duparc C, Moreau L, Dzib JFG, Boyer H-G, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Boulkroun S, Mukai K, Benecke AG, Amar L, et al. Mast Cell Hyperplasia Is Associated With Aldosterone Hypersecretion in a Subset of Aldosterone-Producing Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* (2015) 100:E550–E560. doi: 10.1210/jc.2014-3660

31. Wils J, Duparc C, Cailleux A-F, Lopez A-G, Guiheneuf C, Boutelet I, Boyer H-G, Dubessy C, Cherifi S, Cauliez B, et al. The neuropeptide substance P regulates aldosterone secretion in human adrenals. *Nat Commun* (2020) 11:2673. doi: 10.1038/s41467-020-16470-8

32. Lopez A-G, Duparc C, Naccache A, Castanet M, Lefebvre H, Louiset E. Role of Mast Cells in the Control of Aldosterone Secretion. *Horm Metab Res* (2020) 52:412–420. doi: 10.1055/a-1119-1063

33. Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H, Kuhn JM. 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) 86:5001–5007. doi: 10.1210/jcem.86.10.7917

34. Louiset E, Duparc C, Lefebvre H. Role of serotonin in the paracrine control of adrenal steroidogenesis in physiological and pathophysiological conditions. *Curr Opin Endocr Metab Res* (2019) 8:50–59. doi: 10.1016/j.coemr.2019.07.003

35. Faulkner JL, Belin de Chantemèle EJ. Mineralocorticoid Receptor and Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Curr Hypertens Rep* (2019) 21:78. doi: 10.1007/s11906-019-0981-4

36. Huby A-C, Antonova G, Groenendyk J, Gomez-Sanchez CE, Bollag WB, Filosa JA, de Chantemèle EJB. Adipocyte-Derived Hormone Leptin Is a Direct Regulator of Aldosterone Secretion, Which Promotes Endothelial Dysfunction and Cardiac Fibrosis. *Circulation* (2015) 132:2134–2145. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.018226

37. Rossi G, Albertin G, Belloni A, Zanin L, Biasolo MA, Prayer-Galetti T, Bader M, Nussdorfer GG, Palù G, Pessina AC. Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex. *J Clin Invest* (1994) 94:1226–1234. doi: 10.1172/JCI117440

38. Zeng Z, Tang X, Yang D, Li H, Zhang R, Zeng Q, Li M, Chen J, Lu Z, Demura H, et al. Immunoreactive Endothelin-1 and Its Receptors in Human Adrenal Tissues: *J Cardiovasc Pharmacol* (1998) 31:S212–S214. doi: 10.1097/00005344-199800001-00059

39. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige J-J. Role of adrenocorticotropic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* (2003) 61:247–251. doi: 10.1002/jemt.10333

40. Ryan US, Ryan JW, Smith DS, Winkler H. Fenestrated endothelium of the adrenal gland: freeze-fracture studies. *Tissue Cell* (1975) 7:181–190. doi: 10.1016/s0040-8166(75)80015-2

41. Sasano H, Ohashi Y, Suzuki T, Nagura H. Vascularity in human adrenal cortex. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* (1998) 11:329–333.

42. Vittet D, Ciais D, Keramidas M, Fraipont FD, Feige JJ. Paracrine Control of the Adult Adrenal Cortex Vasculature by Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocr Res* (2000) 26:843–852. doi: 10.3109/07435800009048607

43. Ishimoto H, Jaffe RB. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. *Endocr Rev* (2011) 32:317–355. doi: 10.1210/er.2010-0001

44. Weir M. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension

In review

management. *Am J Hypertens* (1999) 12:205–213. doi: 10.1016/S0895-7061(99)00103-X

45. Pueyo ME, Arnal J-F, Rami J, Michel J-B. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol-Cell Physiol* (1998) 274:C214–C220. doi: 10.1152/ajpcell.1998.274.1.C214

46. Zhang DX, Gauthier KM, Falck JR, Siddam A, Campbell WB. Steroid-Producing Cells Regulate Arterial Tone of Adrenal Cortical Arteries. *Endocrinology* (2007) 148:3569–3576. doi: 10.1210/en.2007-0169

47. 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) 121:253–260. doi: 10.1677/joe.0.1210253

48. Danik M, Chinn AM, Lafeuillade B, Keramidas M, Aguesse-Germon S, Penhoat A, Chen H, Mosher DF, Chambaz EM, Feige JJ. Bovine thrombospondin-2: complete complementary deoxyribonucleic acid sequence and immunolocalization in the external zones of the adrenal cortex. *Endocrinology* (1999) 140:2771–2780. doi: 10.1210/endo.140.6.6835

49. Volpert OV, Tolsma SS, Pellerin S, Feige JJ, Chen H, Mosher DF, Bouck N. Inhibition of Angiogenesis by Thrombospondin-2. *Biochem Biophys Res Commun* (1995) 217:326–332. doi: 10.1006/bbrc.1995.2780

50. MacLauchlan S, Yu J, Parrish M, Asoulin TA, Schleicher M, Krady MM, Zeng J, Huang PL, Sessa WC, Kyriakides TR. Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2. *Proc Natl Acad Sci* (2011) 108:E1137–E1145. doi: 10.1073/pnas.1104357108

51. Stenina-Adognravi O. Thrombospondins: old players, new games. *Curr Opin Lipidol* (2013) 24:401–409. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283642912

52. Kyriakides TR, Zhu Y-H, Yang Z, Bornstein P. The Distribution of the Matricellular Protein Thrombospondin 2 in Tissues of Embryonic and Adult Mice. *J Histochem Cytochem* (1998) 46:1007–1015. doi: 10.1177/002215549804600904

53. Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, et al. Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol* (1998) 140:419–430. doi: 10.1083/jcb.140.2.419

54. Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A, Feige J-J. Antagonistic Functions of Tetradecanoyl Phorbol Acetate-Inducible-Sequence 11b and HuR in the Hormonal Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid Stability by Adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol* (2006) 20:916–930. doi: 10.1210/me.2005-0121

55. Thomas M, Keramidas M, Monchaux E, Feige J-J. Role of adrenocorticotropic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microsc Res Tech* (2003) 61:247–251. doi: 10.1002/jemt.10333

56. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol* (2016) 6: doi: 10.3389/fimmu.2015.00620

57. 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: doi: 10.3389/fendo.2016.00098

58. Lefebvre H, Thomas M, Duparc C, Bertherat J, Louiset E. Role of ACTH in the

In review

573 Interactive/Paracrine Regulation of Adrenal Steroid Secretion in Physiological and Pathophysiological
574 Conditions. *Front Endocrinol* (2016) 7:98. doi: 10.3389/fendo.2016.00098

575 59. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* (2002) 420:860–867. doi:
576 10.1038/nature01322

577 60. Norrby K. Mast cells and angiogenesis. Review article. *APMIS* (2002) 110:355–371. doi:
578 10.1034/j.1600-0463.2002.100501.x

579 61. Lefebvre H, Prévost G, Louiset E. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY:
580 Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary
581 adrenal hypercorticism. *Eur J Endocrinol* (2013) 169:R115–R138. doi: 10.1530/EJE-13-0308

582 62. Yates R, Katugampola H, Cavlan D, Cogger K, Meimaridou E, Hughes C, Metherell L, Guasti
583 L, King P. "Adrenocortical Development, Maintenance, and Disease.," *Current Topics in*
584 *Developmental Biology*. Elsevier (2013). p. 239–312 doi: 10.1016/B978-0-12-416021-7.00007-9

585 63. Pereira SS, Oliveira S, Monteiro MP, Pignatelli D. Angiogenesis in the Normal Adrenal Fetal
586 Cortex and Adrenocortical Tumors. *Cancers* (2021) 13:1030. doi: 10.3390/cancers13051030

587 64. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. Corticotropin Regulates Vascular
588 Endothelial Growth Factor Expression in Human Fetal Adrenal Cortical Cells1. *J Clin Endocrinol*
589 *Metab* (1998) 83:1342–1347. doi: 10.1210/jcem.83.4.4730

590 65. Ishimoto H, Ginzinger DG, Jaffe RB. Adrenocorticotropin Preferentially Up-Regulates
591 Angiopoietin 2 in the Human Fetal Adrenal Gland: Implications for Coordinated Adrenal Organ
592 Growth and Angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91:1909–1915. doi: 10.1210/jc.2005-2252

593 66. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiopoietin-2 displays VEGF-dependent modulation of
594 capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci* (2002) 99:11205–11210.
595 doi: 10.1073/pnas.172161899

596 67. Ferraz-de-Souza B, Lin L, Shah S, Jina N, Hubank M, Dattani MT, Achermann JC. ChIP-on-
597 chip analysis reveals angiopoietin 2 (Ang2, ANGPT2) as a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-
598 1, NR5A1) in the human adrenal gland. *FASEB J* (2011) 25:1166–1175. doi: 10.1096/fj.10-170522

599 68. Ozisik G, Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL. SF1 in the Development of the Adrenal
600 Gland and Gonads. *Horm Res Paediatr* (2003) 59:94–98. doi: 10.1159/000067831

601 69. McEwan PE, Vinson GP, Kenyon CJ. Control of adrenal cell proliferation by AT_1 receptors in
602 response to angiotensin II and low-sodium diet. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* (1999) 276:E303–
603 E309. doi: 10.1152/ajpendo.1999.276.2.E303

604 70. Freedman BD, Kempna PB, Carlone DL, Shah MS, Guagliardo NA, Barrett PQ, Gomez-
605 Sanchez CE, Majzoub JA, Breault DT. Adrenocortical Zonation Results from Lineage Conversion of
606 Differentiated Zona Glomerulosa Cells. *Dev Cell* (2013) 26:666–673. doi:
607 10.1016/j.devcel.2013.07.016

608 71. Ishimoto H, Minegishi K, Higuchi T, Furuya M, Asai S, Kim SH, Tanaka M, Yoshimura Y,
609 Jaffe RB. The Periphery of the Human Fetal Adrenal Gland Is a Site of Angiogenesis: Zonal
610 Differential Expression and Regulation of Angiogenic Factors. *J Clin Endocrinol Metab* (2008)
611 93:2402–2408. doi: 10.1210/jc.2007-2509

612 72. Gennari-Moser C, Khankin EV, Escher G, Burkhard F, Frey BM, Karumanchi SA, Frey FJ,
613 Mohaupt MG. Vascular Endothelial Growth Factor-A and Aldosterone: Relevance to Normal
614 Pregnancy and Preeclampsia. *Hypertension* (2013) 61:1111–1117. doi:
615 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00575

In review

73. Ansurudeen I, Kopprasch S, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Willenberg HS. Endothelial cell-mediated regulation of aldosterone release from human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol* (2007) 265–266:150–156. doi: 10.1016/j.mce.2006.12.011

74. Willenberg H, Schinner S, Ansurudeen I. New Mechanisms to Control Aldosterone Synthesis. *Horm Metab Res* (2008) 40:435–441. doi: 10.1055/s-2008-1065336

75. Rossi GP, Andreis PG, Colonna S, Albertin G, Aragona F, Belloni AS, Nussdorfer GG. Endothelin-1[1–31]: A Novel Autocrine-Paracrine Regulator of Human Adrenal Cortex Secretion and Growth. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87:322–328. doi: 10.1210/jcem.87.1.8134

76. Mazzocchi G, Rebuffat P, Gottardo G, Meneghelli V, Nussdorfer GG. Evidence that both ETA and ETB receptor subtypes are involved in the in vivo aldosterone secretagogue effect of endothelin-1 in rats. *Res Exp Med (Berl)* (1996) 196:145–152. doi: 10.1007/BF02576836

77. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EAG, McMahon EG, Delyani JA. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol* (2002) 283:H1802–H1810. doi: 10.1152/ajpheart.01096.2001

78. Rocha R, Martin-Berger CL, Yang P, Scherrer R, Delyani J, McMahon E. Selective Aldosterone Blockade Prevents Angiotensin II/Salt-Induced Vascular Inflammation in the Rat Heart. *Endocrinology* (2002) 143:4828–4836. doi: 10.1210/en.2002-220120

79. Nishizaka MK, Zaman MA, Green SA, Renfroe KY, Calhoun DA. Impaired Endothelium-Dependent Flow-Mediated Vasodilation in Hypertensive Subjects With Hyperaldosteronism. *Circulation* (2004) 109:2857–2861. doi: 10.1161/01.CIR.0000129307.26791.8E

80. Krug AW, Kopprasch S, Ziegler CG, Dippong S, Catar RA, Bornstein SR, Morawietz H, Gekle M. Aldosterone Rapidly Induces Leukocyte Adhesion to Endothelial Cells: A New Link Between Aldosterone and Arteriosclerosis? *Hypertension* (2007) 50: doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099531

81. Caprio M, Newfell BG, la Sala A, Baur W, Fabbri A, Rosano G, Mendelsohn ME, Jaffe IZ. Functional Mineralocorticoid Receptors in Human Vascular Endothelial Cells Regulate Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression and Promote Leukocyte Adhesion. *Circ Res* (2008) 102:1359–1367. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.174235

82. Hashikabe Y, Suzuki K, Jojima T, Uchida K, Hattori Y. Aldosterone Impairs Vascular Endothelial Cell Function. *J Cardiovasc Pharmacol* (2006) 47:609–613. doi: 10.1097/01.fjc.0000211738.63207.c3

83. Oberleithner H. Aldosterone makes human endothelium stiff and vulnerable. *Kidney Int* (2005) 67:1680–1682. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00263.x

84. Michel F, Ambroisine M-L, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre J-S. Aldosterone Enhances Ischemia-Induced Neovascularization Through Angiotensin II–Dependent Pathway. *Circulation* (2004) 109:1933–1937. doi: 10.1161/01.CIR.0000127112.36796.9B

85. Jaffe IZ, Newfell BG, Aronovitz M, Mohammad NN, McGraw AP, Perreault RE, Carmeliet P, Ehsan A, Mendelsohn ME. Placental growth factor mediates aldosterone-dependent vascular injury in mice. *J Clin Invest* (2010) 120:3891–3900. doi: 10.1172/JCI40205

86. Walczak C, Gaignier F, Gilet A, Zou F, Thornton SN, Ropars A. Aldosterone increases VEGF-A production in human neutrophils through PI3K, ERK1/2 and p38 pathways. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* (2011) 1813:2125–2132. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.07.010

87. Boulkroun S, Samson-Couterie B, Dzib J-FG, Lefebvre H, Louiset E, Amar L, Plouin P-F,

In Review

Lalli E, Jeunemaitre X, Benecke A, et al. Adrenal Cortex Remodeling and Functional Zona Glomerulosa Hyperplasia in Primary Aldosteronism. *Hypertension* (2010) 56:885–892. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158543

88. Nanba K, Vaidya A, Williams GH, Zheng I, Else T, Rainey WE. Age-Related Autonomous Aldosteronism. *Circulation* (2017) 136:347–355. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028201

89. Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, Cani AK, Giordano TJ, Hovelson DH, Liu C-J, Sanjanwala AR, Edwards MA, Gomez-Sanchez CE, et al. Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *Proc Natl Acad Sci* (2015) 112:E4591–E4599. doi: 10.1073/pnas.1505529112

90. Nishimoto K, Seki T, Hayashi Y, Mikami S, Al-Eyd G, Nakagawa K, Morita S, Kosaka T, Oya M, Mitani F, et al. Human Adrenocortical Remodeling Leading to Aldosterone-Producing Cell Cluster Generation. *Int J Endocrinol* (2016) 2016:7834356. doi: 10.1155/2016/7834356

91. El Zein RM, Soria AH, Golib Dzib JF, Rickard AJ, Fernandes-Rosa FL, Samson-Couterie B, Giscos-Douriez I, Rocha A, Poglitsch M, Gomez-Sanchez CE, et al. Retinoic acid receptor α as a novel contributor to adrenal cortex structure and function through interactions with Wnt and Vegfa signalling. *Sci Rep* (2019) 9:14677. doi: 10.1038/s41598-019-50988-2

92. Morello F, Schiavone D, Mengozzi G, Bertello C, Liew CC, Bisbocci D, Mulatero P, Veglio F. Adrenal endothelin-1 levels are not associated with aldosterone secretion in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol* (2009) 160:453–458. doi: 10.1530/EJE-08-0828

93. Rossi GP, Belloni AS, Nussdorfer GG, Pessina AC. Endothelin-1 and the Adrenal Gland: *J Cardiovasc Pharmacol* (2000) 35:S17–S20. doi: 10.1097/00005344-200000002-00005

94. Rossi G. Endothelin receptor blockade lowers plasma aldosterone levels via different mechanisms in primary aldosteronism and high-to-normal renin hypertension. *Cardiovasc Res* (2003) 57:277–283. doi: 10.1016/S0008-6363(02)00658-2

95. De Sousa K, Abdellatif AB, Giscos-Douriez I, Meatchi T, Amar L, Fernandes-Rosa FL, Boulkroun S, Zennaro M-C. Colocalization of Wnt/β-Catenin and ACTH Signaling Pathways and Paracrine Regulation in Aldosterone-Producing Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* (2021)dgab707. doi: 10.1210/clinem/dgab707

96. Kolomecki K, Stepien H, Bartos M, Kuzdak K. Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. *Endocr Regul* (2001) 35:9–16.

97. Zacharieva S, Atanassova I, Orbetzova M, Nachev E, Kalinov K, Kirilov G, Shigarminova R, Ivanova R, Dashev G. Circulating vascular endothelial growth factor and active renin concentrations and prostaglandin E2 urinary excretion in patients with adrenal tumours. *Eur J Endocrinol* (2004)345–349. doi: 10.1530/eje.0.1500345

98. Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iacconi P, Miccoli P, Salvetti A. Angiogenesis in Human Normal and Pathologic Adrenal Cortex. *J Clin Endocrinol Metab* (2002) 87:4961–4965. doi: 10.1210/jc.2001-011799

In review

Figure legends

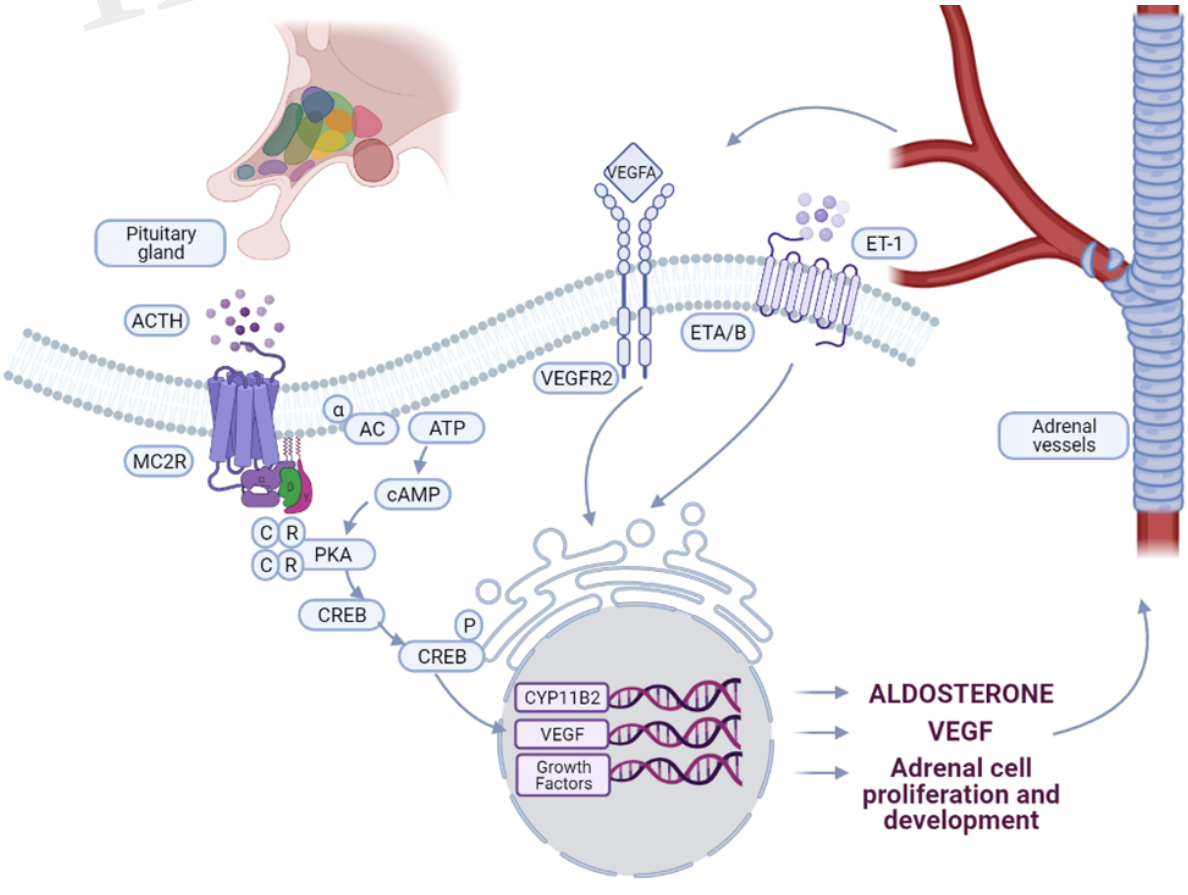
Figure 1. Interaction between vascular and steroidogenic cells in adrenal.

ACTH, produced by the pituitary gland, controls the interactions between steroidogenic cells and vessels. Binding of ACTH to MC2R leads to the activation of PKA signaling pathway, stimulating CYP11B2 expression and aldosterone biosynthesis. ACTH stimulates also the expression of VEGF-A and specific growth factors by adrenal cells leading to vessel growth. By binding to VEGFR2, VEGF-A stimulates on one hand endothelial cell growth and on the other hand expression of growth factors involved in the maintenance and function of the adrenal cortex. Aldosterone biosynthesis is also induced by ET-1 through binding to the endothelin receptor ETA and ETB, expressed in the ZG of the adrenal cortex.

In review

Figure 1.TIF

In review



2- Revue: Molecular mechanisms in primary aldosteronism

Kelly De Sousa[1], Alaa B Abdellatif[1], Rami M El Zein[1], Maria-Christina Zennaro[1,2]

[1]Université Paris Cité, INSERM, PARCC, F-75015, France,

[2]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, France

Journal of Endocrinology

REVIEW

Molecular mechanisms in primary aldosteronism

Kelly De Sousa[1,2], **Alaa B Abdellatif**[1,2], **Rami M El Zein**[1,2] and **Maria-Christina Zennaro**[1,2,3]

[1]INSERM, UMRS_970, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France
[2]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France
[3]Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Génétique, Paris, France

Correspondence should be addressed to M-C Zennaro: maria-christina.zennaro@inserm.fr

Abstract

Primary aldosteronism (PA) is the most common form and an under-diagnosed cause of secondary arterial hypertension, accounting for up to 10% of hypertensive cases and associated to increased cardiovascular risk. PA is caused by autonomous overproduction of aldosterone by the adrenal cortex. It is mainly caused by a unilateral aldosterone-producing adenoma (APA) or bilateral adrenal hyperplasia. Excess aldosterone leads to arterial hypertension with suppressed renin, frequently associated to hypokalemia. Mutations in genes coding for ion channels and ATPases have been identified in APA, explaining the pathophysiology of increased aldosterone production. Different inherited genetic abnormalities led to the distinction of four forms of familial hyperaldosteronism (type I to IV) and other genetic defects very likely remain to be identified. Somatic mutations are identified in APA, but also in aldosterone-producing cell clusters (APCCs) in normal adrenals, in image-negative unilateral hyperplasia, in transitional lesions and in APCC from adrenals with bilateral adrenal hyperplasia (BAH). Whether these structures are precursors of APA or whether somatic mutations occur in a proliferative adrenal cortex, is still a matter of debate. This review will summarize our knowledge on the molecular mechanisms responsible for PA and the recent discovery of new genes related to early-onset and familial forms of the disease. We will also address new issues concerning genomic and proteomic changes in adrenals with APA and discuss adrenal pathophysiology in relation to aldosterone-producing structures in the adrenal cortex.

Key Words
- hypertension
- adrenal
- primary aldosteronism
- ion channels
- calcium

Journal of Endocrinology (2019) **242**, R67–R79

Introduction

Primary aldosteronism (PA) is due to excessive and autonomous aldosterone production by the adrenal cortex. It is the most frequent form of secondary hypertension with an estimated prevalence up to 10% in referred patients, 4% in primary care (Hannemann & Wallaschofski 2012, Monticone *et al.* 2017) and 20% in patients with resistant hypertension (Calhoun *et al.* 2002, Douma *et al.* 2008). PA is characterized by an increased aldosterone-to-renin ratio, which is the principal feature used for screening, often hypokalemia and metabolic alkalosis and an increased risk of cardiovascular complications. The prevalence of left ventricular hypertrophy is higher in patients with PA even after adjustment for hypertension duration (Rossi *et al.* 1996). Moreover, PA patients have a significantly higher prevalence of coronary artery disease, nonfatal myocardial infarction, heart failure and atrial fibrillation (Savard *et al.* 2013). The two major causes of PA are APA and BAH, also called idiopathic hyperaldosteronism (IHA). Although guidelines for the management of PA have been published and are

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193

© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

widely used in reference centers (Funder *et al.* 2016), improvements for better diagnosis, subtype identification and treatment for non-operable patients are urgently required to allow for improved care and prevention of cardiovascular complications.

Recently, whole exome sequencing had allowed identifying several somatic genetic abnormalities in APA, providing a pathogenic model for PA development. Recurrent somatic mutations were identified in genes coding for ion channels (*KCNJ5* Choi *et al.* 2011 and *CACNA1D* Azizan *et al.* 2013, Scholl *et al.* 2013) and ATPases (*ATP1A1* and *ATP2B3*, Azizan *et al.* 2013, Beuschlein *et al.* 2013) regulating intracellular ionic homeostasis and cell membrane potential. Germline mutations were identified in familial forms of PA, allowing to distinguish four different forms of familial hyperaldosteronism (FH), based on the underlying genetic defect (Fernandes-Rosa *et al.* 2018, Scholl *et al.* 2018, Zennaro 2019). These mutations increase intracellular calcium concentrations, leading to the activation of the calcium signaling pathway and to increased aldosterone production by increasing the expression of *CYP11B2*, coding for aldosterone synthase. In addition, somatic mutations were also identified in *CTNNB1* coding for b-catenin in a small proportion of APA (Teo *et al.* 2015, Scholl *et al.* 2015*a*, Akerstrom *et al.* 2016) and mutations in *PRKACA* (encoding protein kinase cAMP-activated catalytic subunit α) have been described in two cases (Rhayem *et al.* 2016).

Even though the consequences of these mutations on aldosterone production are well demonstrated, their impact on cell proliferation and APA formation is not well understood. Different pathogenic mechanisms have been proposed, including different hits being responsible for adrenocortical cell proliferation and hormonal secretion or the development of APA from aldosterone-producing cell clusters (APCC) of the adrenal cortex.

Steroid biosynthesis in the adrenal cortex

The adrenal cortex is composed of three separate layers, the zona glomerulosa, the zona fasciculata and the zona reticularis. This zonation is functional, each zone producing specific steroid hormones due to the zone-specific expression of two enzymes, the aldosterone synthase and the 11β-hydroxylase. Cholesterol is the common precursor in steroid hormone biosynthesis through a process that implicates multiple enzymatic steps, the major effectors being enzymes belonging to the cytochrome P450 family. In zona glomerulosa, where aldosterone is produced, cholesterol is converted into 11-deoxycorticosterone through the successive actions of the cytochrome P450 side-chain cleavage (*CYP11A1*), the 3β-hydroxysteroid dehydrogenase type II (*HSD3B2*) and the 21α-hydroxylase (*CYP21A2*). Aldosterone synthase (encoded by the *CYP11B2* gene) catalyzes the three final steps in aldosterone biosynthesis. The first step consists in the hydroxylation at the C11 position of the intermediate steroid deoxycorticosterone into corticosterone, followed by a hydroxylation at the C18 position and the formation of 18-hydroxy-corticosterone. The last step is the oxidation of the hydroxyl group on C18, finally resulting in the production of aldosterone (Connell & Davies 2005).

Cortisol biosynthesis occurs in the zona fasciculata, where 17α-hydroxylase is expressed. This enzyme is responsible for the conversion of pregnenolone and progesterone to 17-OH-pregnenolone and 17-OH-progesterone, precursors of cortisol, whereas 21-hydroxylase induces a hydroxylation in the C11 position of the 17OH-progesterone producing 11-deoxycortisol. The final step of cortisol biosynthesis is the hydroxylation in the C21 position of 11-deoxycortisol by 11β-hydroxylase, encoded by *CYP11B1* and specifically expressed in the zona fasciculata and reticularis (Connell & Davies 2005).

Aldosterone production is mainly regulated by the renin angiotensin system and potassium concentrations and, to a lesser extent, by the adrenocorticotropic hormone (ACTH) (Connell & Davies 2005). The renin angiotensin system plays a major role in sodium homeostasis. In response to a decrease in blood volume, dehydration or hyponatremia, renin is secreted by the juxta-glomerulus apparatus of the kidney and cleaves the angiotensinogen produced in the liver to produce angiotensin I. In the lungs, angiotensin I in converted by the angiotensin-converting enzyme (ACE) to angiotensin II (Ang II). Ang II acts via its AT1 receptor expressed in zona glomerulosa cells, activating a Gαq-phospholipase C-mediated pathway, inducing the production of inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) and 1,2-diacylglycerol. IP3 binding to its receptor leads to calcium release from the endoplasmic reticulum, thus increasing intracellular calcium concentrations. In parallel, Ang II also inhibits the potassium channels TASK (TWIK-related acid-sensitive potassium channel) and GIRK4 (G-protein-activated inward rectifier potassium channel) and the Na^+/K^+ ATPase, therefore inducing cell membrane depolarization, and the opening of voltage-dependent membrane calcium channels, leading to calcium influx into the cell and activation of calcium signaling (Spat & Hunyady 2004, Oki *et al.* 2012*a*) (Fig. 1A and B).

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

Activation of calcium signaling increases the availability of cholesterol in the cell, by stimulating the activity of the enzyme cholesterol ester hydrolase, but also by increasing the expression of StAR (steroid acute regulatory protein), which is responsible for cholesterol transport into the mitochondria, and of other steroidogenic enzymes (Spat & Hunyady 2004). Calcium/calmodulin-dependent protein kinases also activate transcription factors such as nuclear receptor subfamily 4 group A members 1 and 2 (NUR77/NGF1B and NURR1 encoded by NR4A1 and NR4A2 respectively), which increase transcription of the *CYP11B2* gene (Bassett *et al.* 2004*b*).

Cortisol production is regulated by the hypothalamic–pituitary–adrenal axis via ACTH. ACTH binds to the melanocortin receptor 2 (MC2R), inducing an increase in intracellular cAMP levels via the activation of a Gαs protein. cAMP activates PKA signaling following its binding to the regulatory subunits of PKA (Ruggiero & Lalli 2016). The duration of ACTH stimulation affects its role in the biosynthesis of steroids. Short-term stimulation increases the availability of intracellular cholesterol and its transfer to the internal membrane of the mitochondria, primarily through the phosphorylation of StAR at the Ser195 position; it also induces the expression of steroidogenic enzymes. However, long-term stimulation by ACTH induces transcriptional regulation of StAR and steroidogenic enzymes. Particularly, PKA signaling activates transcription factors such as steroidogenic

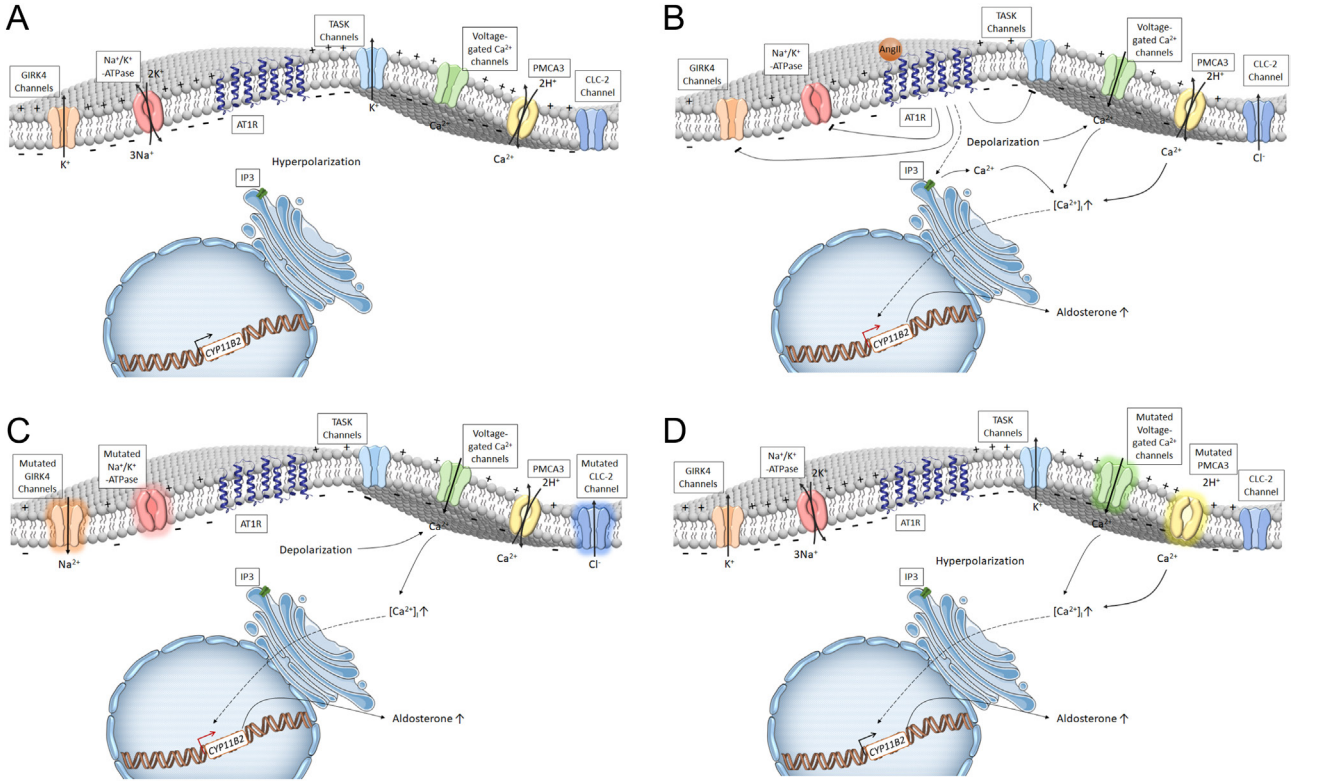


Figure 1

Regulation of aldosterone biosynthesis in normal conditions and in PA. (A) In unstimulated conditions, zona glomerulosa cells are hyperpolarized. This state is maintained by the activity of potassium channels such as TASK and GIRK4 and the NA^+/K^+ ATPase pump. (B) Increases in extracellular potassium levels inhibit K^+ currents of TASK channels and lead to cell membrane depolarization. Activation of AngII signaling through its receptor (AT1R) on the surface of ZG cells inhibits K^+ channels and the Na^+/K^+ ATPase, which leads to cell membrane depolarization, opening of voltage-gated Ca^{2+} channels and increased intracellular calcium concentrations. Intracellular calcium activates signaling pathways leading to *CYP11B2* expression and thus increasing aldosterone biosynthesis. Activation of AT1R also activates a Gαq-phospholipase C-mediated pathway, inducing an increase in the concentration of inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), which binds to its receptor expressed on the endoplasmic reticulum, inducing the release of calcium from intracellular stores. (C) Mutations in *KCNJ5* encoding the potassium channel GIRK4 are responsible for a loss of selectivity of the channel and lead to sodium influx into the cell; mutations in *ATP1A1* encoding the α1 subunit of the Na^+/K^+ ATPase increase intracellular Na^+ and H^+ concentrations; mutations in *CLCN2*, encoding the chloride channel ClC-2, increase chloride conductance at resting potentials; all these abnormalities lead to membrane depolarization of glomerulosa cells. Cell membrane depolarization induces opening of voltage-gated calcium channels, increased intracellular calcium concentrations and activation of calcium signaling, triggering increased expression of *CYP11B2* and aldosterone production. (D) Mutations in *CACNA1H* and *CACNA1D* encoding the voltage-gated calcium channels Cav3.2 and Cav1.3 as well as mutations in *ATP2B3*, encoding the Ca^{2+} pump PMCA3, directly increase intracellular calcium concentrations and lead to increased aldosterone biosynthesis through activation of calcium signaling.

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

factor 1 (SF-1), cAMP-responsive element-binding protein (CREB), cAMP-responsive element modulator and CCAAT/enhancer-binding protein and activator protein 1, which regulate the expression of steroidogenic genes (Ruggiero & Lalli 2016).

ACTH stimulation also induces aldosterone production by similar mechanisms. Moreover, ACTH stimulates calcium flow into zona glomerulosa cells by activating L-type calcium channels. However, in the case of a chronic ACTH stimulation, *CYP11B2* expression is inhibited, which causes a reduction in aldosterone production, as opposed to the expression of *CYP11B1* which is responsible of cortisol production (Vinson 2016).

There exist other factors that regulate aldosterone production in a paracrine fashion. Among them, serotonin (5-HT) produced by mastocytes stimulates steroid production (El Ghorayeb *et al.* 2016) through mechanisms involving the 5-HT receptor type 4 (HTR4) (Lefebvre *et al.* 1993, Lefebvre *et al.* 2001) which is expressed in adrenocortical cells. Activation of HTR4 activates adenylyl cyclase and induces calcium influx into the cell through T-type channels, thus regulating cortisol and aldosterone production (Louiset *et al.* 2017). Remarkably, activation of 5-HT4 by agonists such as cisapride or zacopride induces aldosterone production in healthy volunteers (Lefebvre *et al.* 2000).

Genetic alterations in PA

The mechanisms that regulate aldosterone production are severely altered in PA. PA is the most common form of secondary arterial hypertension, with an estimated prevalence of 10% in referred patients in specialized centers and up to 5% in the general hypertensive population (Rossi *et al.* 2006, Hannemann & Wallaschofski 2012, Monticone *et al.* 2017). Although the majority of cases are sporadic, PA may be transmitted as a Mendelian trait in familial forms of the disease. Familial forms of PA account for 1–5% of cases and are transmitted as autosomal dominant traits. Four different forms have been described, based on the underlying genetic defect. Similarly, recurrent somatic mutations in different genes have been identified in up to 88% of APA (Nanba *et al.* 2018).

Germline mutations in FH

FH type I

FH-I or glucocorticoid-remediable aldosteronism (GRA) is an autosomal dominant disease that accounts for 0.5–1% of PA in adult patients, but up to 3% in pediatric cohorts (Medeau *et al.* 2005, Aglony *et al.* 2011, Mulatero *et al.* 2011, Pallauf *et al.* 2012). It is characterized by early and severe hypertension, often associated to hypokalemia. Peculiar features of FH-I are the presence of hybrid steroids 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol in the urines and the suppression of aldosterone by dexamethasone (Sutherland *et al.* 1966). These features are a consequence of the underlying genetic defect, which consists in the formation of a chimeric gene between the regulatory regions of *CYP11B1* and the coding regions of *CYP11B2* due to unequal crossing over during meiosis. This results in ectopic expression of *CYP11B2* in the zona fasciculata of the adrenal cortex, and ACTH-regulated expression of aldosterone synthase (Lifton *et al.* 1992, Stowasser *et al.* 2000). Those patients can be efficiently treated with low-dose glucocorticoids (Stowasser *et al.* 2000); however, cardiovascular consequences of high aldosterone excess may manifest even in young normotensive patients (Stowasser *et al.* 2005) and patients with FH-I are at increased cardiovascular risk, with increased number of cerebrovascular events at a young age (Litchfield *et al.* 1998).

FH type II

FH-II is a non-glucocorticoid-remediable form of familial hyperaldosteronism, transmitted in an autosomal dominant fashion, found in 1.2–6% of adult patients with PA. Patients display a familial history of PA, and different subtypes of the disease (APA or BAH) may be present within the same family (Stowasser & Gordon 2001, Medeau *et al.* 2005, Mulatero *et al.* 2011, Pallauf *et al.* 2012). FH-II is not distinguishable from other sporadic forms of PA, the diagnosis is based on the identification of two or more affected family members. While a genetic locus was associated with FH-II on 7p22 (Lafferty *et al.* 2000), no pathogenic mutations were identified in several candidate genes located in this chromosomal region. It is only very recently that use of whole exome sequencing allowed the discovery of a new gene associated to FH-II. Two groups have indeed identified several gain-of-function mutations in the *CLCN2* gene coding for the CLC-2 chloride channel in patients with FH-II and early-onset PA and described for the first time the implication of a chloride channel in the regulation of aldosterone production (Fig. 1C).

In one study, a *de novo* heterozygous p.Gly24Asp mutation in the *CLCN2* gene was identified in a patient diagnosed at 9 years of age with hypertension due to PA, associated to profound hypokalemia (Fernandes-Rosa *et al.* 2018). This gain-of-function mutation affects a highly

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

conserved region in the ClC-2 chloride channel, in which mutations lead to constitutive activation of the channel (Grunder *et al.* 1992). The channel is highly expressed in the human and mouse adrenal zona glomerulosa and patch clamp analyses of zona glomerulosa cells from mouse adrenal gland slices show *bona fide* chloride currents, which are abolished in *Clcn2* knockout mice, indicating that ClC-2 is the foremost chloride channel in the adrenal zona glomerulosa (Fernandes-Rosa *et al.* 2018). Expression of the mutated ClC-2 in adrenocortical cells leads to increased chloride currents and depolarization of the zona glomerulosa cell membrane, opening voltage-gated calcium channels and triggering autonomous aldosterone production (Fig. 1C). This work indicates for the first time the implication of an anion channel in the regulation of aldosterone biosynthesis, PA and hypertension (Fernandes-Rosa *et al.* 2018).

In the other study, whole exome sequencing of three members of a large Australian family with FH-II previously described by Stowasser *et al.* (Stowasser *et al.* 1992, Lafferty *et al.* 2000) allowed the identification of a germline mutation in the *CLCN2* gene, p.Arg172Gln, in affected family members. The same mutation was identified in three additional cases with early-onset PA, one within a familial context, another occurring *de novo*. Furthermore, the authors identified four additional germline *ClC-2* variants, p.Met22Lys, p.Tyr26Asn, p.Lys362del and p.Ser865Arg in four unrelated patients with early-onset PA (Scholl *et al.* 2018). Immunohistochemistry confirmed the expression of ClC-2 in human adrenal zona glomerulosa. Mutant channels showed gain of function, with higher open probabilities at the glomerulosa resting potential.

Altogether, these results indicate that *CLCN2* should be included in the panel of genes that are screened in patients who develop early-onset PA and in families with a diagnosis of FH-II. Mutations may be located in different domains of ClC-2 and therefore affect channel function at different degrees, which explains phenotypic heterogeneity and the presence of relatively mild cases.

FH type III and germline KCNJ5 mutations

FH-III is a non-glucocorticoid-remediable form of FH, showing early-onset severe hypertension, hyperaldosteronism, profound hypokalemia and high levels of the hybrid steroids 18-oxocortisol and 18-hydroxycortisol (Geller *et al.* 2008). Patients require bilateral adrenalectomy to control blood pressure, which shows massive bilateral hyperplasia of the adrenal cortex, although mild forms have also been described. Recurrent germline mutations in the *KCNJ5* gene (coding for the potassium channel GIRK4) have been identified in FH-III (Choi *et al.* 2011). *KCNJ5* codes for the G protein-activated inward rectifier potassium channel 4 (GIRK4), which is composed of two membrane-spanning domains (M1 and M2), one pore-forming region (H5) and cytoplasmic N- and C-termini that participate in the formation of pore structure. The mutations are located in a highly conserved domain within or near the channel selectivity filter. They induce a gain of function, with a loss of potassium selectivity in favor of an increased unspecific sodium influx into the cytoplasm. This results in cell membrane depolarization, increased intracellular calcium concentrations, activation of Ca^{2+} signaling and autonomous aldosterone biosynthesis (Choi *et al.* 2011, Oki *et al.* 2012*b*) (Fig. 1C). Different *KCNJ5* mutations have been described in the literature, which not all are associated with severe PA (Mulatero *et al.* 2013). Indeed, *KCNJ5* mutations were also identified in patients diagnosed with mild PA in a context of FH-II, with no BAH at imaging and blood pressure controlled by conventional medication. The genetic diagnosis allowed reclassifying those patients into mild forms of FH-III. Remarkably, mutations associated with milder phenotypes have more pronounced functional effects *in vitro*. In particular, the channel's selectivity was less affected by the p.Thr158Ala mutation compared to the channels carrying the other mutations (p.Leu168Arg and p.Gly151Arg) (Choi *et al.* 2011). The p.Gly151Glu mutation, identified in mild cases diagnosed as FH-II, generates significantly larger Na^+ currents than the p.Gly151Arg mutation and leads to sodium-dependent cell death (Scholl *et al.* 2012), with strong depolarization of adrenocortical cells expressing the mutated channel (Mulatero *et al.* 2012).

FH type IV and germline CACNA1H mutations

FH-IV is a non-glucocorticoid-remediable form of FH, which has been attributed to germline *CACNA1H* mutations. Familial analysis showed that despite autosomal dominant transmission of the mutation, differences could be observed within family members on a clinical level, indicating incomplete penetrance of the disease (Scholl *et al.* 2015*b*).

CACNA1H codes for the α1 subunit of the voltage-gated T-type calcium channel Cav3.2. The structure of this subunit consists of four homologous domains (named from I to IV) where each domain contains six transmembrane helices (S1–S6). A recurrent p.Met1549Val mutation in *CACNA1H* was first identified in five patients

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

with hypertension due to PA by age 10 years and their relatives. The mutation affects the electrophysiological properties of the channel, inducing specifically a shift in the voltage sensitivity of the channel to a more negative current and a modification of its inactivating properties, which triggers an opening of the channel at more negative membrane potentials, allowing activation of calcium signaling in the absence of stimulation (Scholl *et al.* 2015*b*) (Fig. 1D). Scholl *et al.* demonstrated in their study that cells transfected with the Cav3.2 1549Val had more aldosterone biosynthesis as well as higher *CYP11B2* expression when compared to cells transfected with the WT Cav3.2 channel (Reimer *et al.* 2016).

In a similar study, Daniil *et al.* identified four germline mutations in the *CACNA1H* gene in PA patients with different phenotypic presentations. Two of the variants (p.Val1951Glu and p.Pro2083Leu) in this study are located in the cytoplasmic C terminus of the channel. A p.Ser196Leu variant was located in the S4 segment of domain I of the channel, and one mutation, p.Met1549Ile, is located in the S6 segment of domain III. The p.Met1549Ile mutation, affecting the same amino acid described by Scholl *et al.* in patients with FH-IV, was identified in a patient with early-onset PA and multiplex developmental disorder. Cav3.2 p.Ser196Leu and p.Pro2083Leu were found in two patients with FH-II, and p.Val1951Glu was identified in one patient with APA. Electrophysiological analysis revealed significant changes in the Ca^{2+} current properties for all mutants, suggesting a gain-of-function phenotype. Moreover, transfection of the mutant Cav3.2 in the adrenocortical cell line H295R-S2 led to increased aldosterone production and increases the expression of steroidogenic enzymes following potassium stimulation (Daniil *et al.* 2016).

Germline CACNA1D mutations in PA

CACNA1D mutations have been described in two children with PASNA (primary aldosteronism, seizures and neurological abnormalities) (Scholl *et al.* 2013). *CACNA1D* codes for the α1 subunit of the voltage-gated L-type calcium channel Cav1.3. Again, these mutations induce a gain of function, with the channel opening at lower voltages. This leads to excessive aldosterone production by increasing Ca^{2+} entry that causes an increased intracellular Ca^{2+}-mediated signaling with induction of aldosterone biosynthesis (Azizan *et al.* 2013, Scholl *et al.* 2013).

The first case was identified in a 3-year-old female who suffered severe hypertension, biventricular hypertrophy, neurological abnormalities and aldosteronism as a newborn, associated with high aldosterone levels, a high aldosterone-to-renin ratio and hypokalemia. Genetic analyses identified a germline mutation in *CACNA1D* (p.Gly403Asp), a variant that had also been identified in APA (Scholl *et al.* 2013, 2015*a*). The second subject exhibited cerebral palsy and complex seizures just after birth, with HT and hyperaldosteronism with hyperkalemia at age 5 years. Genetic analysis leads to the identification of a *CACNA1D* mutation (p.Ile770Met) also found as recurrent mutation in APA (Scholl *et al.* 2013, Korah & Scholl 2015) (see below).

Somatic mutations in APA

Numerous recurrent somatic mutations have been identified in APA. These affect genes coding for ion channels (*KCNJ5* Choi *et al.* 2011 and *CACNA1D* Azizan *et al.* 2013, Scholl *et al.* 2013) also involved in inherited forms. In addition, recurrent mutations have been identified in genes coding for ATPases (*ATP1A1* which codes for the α1 subunit of the Na^+/K^+-ATPase Azizan *et al.* 2013, Beuschlein *et al.* 2013 and *ATP2B3* encoding the plasma membrane calcium-transporting ATPase 3 (PMCA3) Beuschlein *et al.* 2013) that regulate the intracellular ionic homeostasis and membrane potential. Na^+/K^+-ATPase and PMCA3 are members of the P-type family of ATPases and are composed of ten transmembrane domains (M1–M10) with intracellular N- and C-tails. *ATP1A1* mutations affect amino acids in the transmembrane helices M1, M4, and M9 of the α1 subunit. They lead to a loss of pump activity and a reduction in its affinity for potassium as well as an inward leakage of sodium, inducing membrane depolarization (Azizan *et al.* 2013, Beuschlein *et al.* 2013). In addition, mutant pumps may induce a proton leak (Azizan *et al.* 2013), leading to intracellular acidification which contributes to aldosterone production. Indeed, expression of mutant α1 subunits of the Na^+/K^+ ATPase carrying the L104R, V332G and G99R mutations in adrenocortical NCI-H295R cells failed to increase intracellular Ca^{2+} concentrations, but showed intracellular acidification, which caused increased aldosterone production (Stindl *et al.* 2015). Under physiological conditions, the PMCA3 extrudes one cytosolic Ca^{2+} in exchange for two H^+. PMCA3 mutations occur in the transmembrane domain M4 and induce the deletion of a stretch of amino acids between Leu425 and Leu433 (Beuschlein *et al.* 2013, Fernandes-Rosa *et al.* 2014). Cells expressing the mutant PMCA3 have a reduced capacity to export Ca^{2+}, suggesting a loss

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

of the physiological pump function. In addition, they induce an increased Ca^{2+} influx possibly due to opening of depolarization-activated Ca^{2+} channels or to Ca^{2+} leak through the mutated pump (Tauber *et al.* 2016). All these mutations induce an increase in intracellular calcium levels, followed by an activation of calcium signaling and therefore increase the biosynthesis of aldosterone.

A study on 474 subjects presenting an APA, performed within the European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENS@T), found mutations in 54.2% of APA, where 38% of these were found in the *KCNJ5* gene, 9.3% in *CACNA1D*, 5.3% in *ATP1A1* and 1.7% in *ATP2B3* (Fernandes-Rosa *et al.* 2014). Patients presenting mutations in *KCNJ5* were mostly women and younger patients, while APA with *CACNA1D* mutations were smaller than the other mutational groups (Fernandes-Rosa *et al.* 2014). A recent meta-analysis on 1636 patients from 13 studies showed a prevalence of *KCNJ5* mutations of 43%, with much higher frequencies (up to 77%) in populations from East Asia in comparison to studies performed on European populations. APA harboring *KCNJ5* mutations were more frequent in women and associated with larger tumors and a higher plasma aldosterone concentration when compared with mutation-negative APA. APA where *KCNJ5* mutations are present are also associated with APA composed mainly of ZF-like cells. Other mutations were associated mainly with male gender and smaller tumors (Lenzini *et al.* 2015).

In a recent study, Nanba *et al.* performed CYP11B2 immunohistochemistry on 75 adrenal samples from white American patients, in order to identify APA and other aldosterone-producing regions prior to genetic analysis. DNA was then extracted directly from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue, positive for CYP11B2 expression. Complete next-generation sequencing of all genes involved in PA identified somatic mutations in 88% of APA (Nanba *et al.* 2018). Again, *KCNJ5* mutations were the most frequent mutational events (43%), followed by *CACNA1D* (21%), *ATP1A1* (17%), *ATP2B3* (4%) and *CTNNB1* (3%) mutations. Also, *KCNJ5* mutations were more frequent in women (70 vs 24% in men). This study shows that CYP11B2 immunohistochemistry-guided next-generation sequencing allows the identification of a larger portion of somatic mutations in APA. Similar results were obtained by analyzing adrenocortical adenomas from 79 black patients with PA. Somatic mutations in aldosterone driver genes were found in 89% of APAs. Interestingly, *CACNA1D* mutations were the most frequent (42%) ones in APA from patients with African ancestry, followed by *KCNJ5* (34%), *ATP1A1* (8%) and *ATP2B3* mutations (4%) (Nanba *et al.* 2019).

Other less frequent mutations that play an important role in APA were identified in *CTNNB1* and *PRKACA*. *CTNNB1* codes for β-catenin. This protein is a central element of the Wnt/β-catenin signaling pathway, which has an essential role in the development of the adrenal cortex, in the differentiation of the zona glomerulosa and steroid hormone biosynthesis (El Wakil & Lalli 2011). In unstimulated conditions, β-catenin is present in the cytoplasm and is associated to the degradation complex with adaptor proteins such as axin, APC (adenomatous polyposis coli), two serine/threonine kinases, caseine kinase 1 (CK1α) and glycogen synthase kinase 3β (GSK3β). This complex phosphorylates β-catenin, which is then recognized by the ubiquitin ligase E3 that results in its destruction by the proteasome, thus preventing its translocation into the nucleus and the activation of different Wnt target genes. Activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway by binding of Wnt to its receptor frizzled inhibits the phosphorylation of β-catenin which dissociates from the axin complex and translocates to the nucleus where it induces the expression of Wnt target genes, by binding to the transcription factors TCF (T-cell factor) and LEF (lymphocyte enhancer factor) as a transcriptional co-activator (MacDonald *et al.* 2009). It has been shown that β-catenin indirectly regulates *CYP11B2* expression via transcriptional induction of the nuclear receptors NURR1 and NUR77 (Berthon *et al.* 2014). The Wnt/β-catenin signaling pathway has been shown to be constitutively active in 70% of APA (Berthon *et al.* 2014). Mutations in *CTNNB1* have been found in 2–5% of APA and are more frequent in women (Teo *et al.* 2015, Scholl *et al.* 2015*a*, Akerstrom *et al.* 2016). Mutations specifically occur in exon 3, which codes for the serine/threonine residue which when phosphorylated results in the degradation of β-catenin (Berthon *et al.* 2010). To a much lesser extent, somatic mutations in *PRKACA*, which codes for the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit α, have been described in APA (Rhayem *et al.* 2016). A study performed on a cohort of 12 patients showed a prevalence of 1.6% of this mutation. One of the described mutations in this study was new (p.His88Asp) (Rhayem *et al.* 2016), whereas the other mutation, p.Leu206Arg, had been previously described as a recurrent somatic mutation in patients with cortisol-producing adenoma and Cushing's syndrome (Goh *et al.* 2014). Mutations in both *PRKACA* and *CTNNB1* have been mainly associated with cortisol-producing adenomas and/or adrenocortical

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

cancer. Therefore, the mechanisms explaining how the same mutations result in two different hormonal phenotypes remain to be established.

Genomic and proteomic alterations in APA

Despite the major advances on the genetics of PA, many questions remain open concerning the pathophysiology of the disease, in particular, the mechanisms and dynamics of adenoma formation. Several studies have explored genomic and proteomic alterations in APA, to better understand the mechanisms involved in its development. A recent extremely original work performed deep quantitative proteomic and phosphoproteomic profiling on APA and adjacent non-tumoral adrenal cortex from six patients with PA. The authors identified, out of 5555 proteins common to all samples, 18 which were significantly downregulated and 11 significantly upregulated in all APA. Proteome data confirmed that upregulation of the steroidogenic enzymes HSD3B2, CYP21A2, CYP11B2 and of proteins involved in cholesterol uptake (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR)) is involved in the increase of steroidogenesis in APA (Swierczynska *et al.* 2019). This study also showed that steroidogenic enzymes are regulated by phosphorylation; in particular, HSD3B2 is phosphorylated at Ser95 or 96 and CYP21A2 has a novel phosphorylation site at Ser489. An altered composition of the extracellular matrix (ECM) was also revealed in APA, with reduction in proteins related to collagen and collagen fibril assembly, enzymes involved in extracellular matrix turnover and structural components of the extracellular matrix. The deregulation of kinases affecting cytoskeleton remodeling and axonal guidance-related pathways suggests that APA development may be accompanied or be related to changes in cytoskeleton rearrangements and possibly innervation. Remarkably, the GTPase RHOC controlling actin organization, which was upregulated in APA, significantly increased the expression of *CYP11B2* at the transcriptional level in transfected adrenocortical H295R cells.

APA also showed higher levels of proteins involved in N-glycosylation and enzymes involved in GABA degradation. Remarkably, the activity of the main regulators of steroidogenesis, MC2R (receptor for ACTH) and AT1R (receptor for Ang II) is affected by N-glycosylation and the level and the activity of N-glycoproteins like lipoprotein receptors (LDLR and SR-B1) and many ion channels (TASK1, TASK3, TREK1, Kv1.4, CACNA1D) are affected by N-glycosylation. The inhibition of TASK1, TASK3 and KV1.4 glycosylation decreases the number of cell-surface channels, leading to a reduced current flow, protein instability and intracellular channel retention (Watanabe *et al.* 2004, Mant *et al.* 2013, Swierczynska *et al.* 2019). Reduced GABAergic signaling in APA may also modulate aldosterone production. Indeed, in physiological conditions, GABAergic signaling mediates a decrease of steroidogenesis *in vivo* in the rat adrenal cortex (Mishunina & Kononenko 2002). Finally, one of the most dysregulated pathways in APAs appeared to be the mTORC1 signaling pathway. Its activity was increased in APA; this pathway is involved in cell proliferation and steroidogenesis in APA cells and immortalized adrenocortical cells. Thus, the increase of its activation may lead to an increased steroidogenic output and adenoma development. This opens new perspectives on the benefits of inhibiting mTORC1 in patients with APA (Su *et al.* 2013, Swierczynska *et al.* 2019).

Similarly, gene expression profiling of APA allowed identifying genes and intracellular signaling pathways involved in the pathogenesis and pathophysiology of this tumor. As expected, microarray studies and SAGE (serial analysis of gene expression) showed higher expression of *CYP11B2* in APA compared to normal adrenals and adjacent cortical tissue (Assie *et al.* 2005, Williams *et al.* 2010), although other studies report a subgroup of APA with reduced expression of aldosterone synthase (Lenzini *et al.* 2007). However, these data require to be reevaluated in the context of recent work showing that in a certain number of multinodular adrenals some of the larger nodules do not express *CYP11B2*, which is localized to smaller nodules or APCC (Fernandes-Rosa *et al.* 2015, Nanba *et al.* 2018); this finding may have led to some sample biases in earlier studies. Despite this, APA show a genotype–phenotype correlation indicating that transcriptional signatures may be influenced by APA genotype, although different studies report slightly different results. Indeed, APA with different gene mutations show distinct expression profiles (Azizan *et al.* 2012). While some studies reported a higher *CYP11B2* expression in APA with *KCNJ5* mutations compared to APA without *KCNJ5* mutation (Monticone *et al.* 2012, Seccia *et al.* 2012), a higher expression of *CYP11B2* was reported in APA with *ATP1A1* and *ATP2B3* mutations, compared to KCNJ5-mutated tumors (Akerstrom *et al.* 2015). In a large transcriptome analysis performed on 102 samples, *KCNJ5*-mutated APA did not show differential clustering compared to tumors not harboring *KCNJ5* mutations (Boulkroun *et al.* 2012, Zennaro 2019).

Several studies revealed an upregulation of genes encoding transcription factors (NURR1 and NGF1B)

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

that regulate the transcription of *CYP11B2* (Bassett *et al.* 2004*a*), genes encoding the transcription factors SF-1 (*NR5A1*) and DAX1 (*NR0B1*) that play an essential role in adrenal development and steroidogenesis (Bassett *et al.* 2005) and a target gene of SF-1, *VSNL1*, which increases aldosterone production in the NCI H295R cells (Williams *et al.* 2012). Furthermore, Azizan *et al.* reported higher *CYP17A1* expression in APA composed of cells resembling to the zona fasciculata carrying *KCNJ5* mutations (Azizan *et al.* 2012). This result was also confirmed in *KCNJ5*-mutated tumors compared with *ATP1A1*/*CACNA1D* mutant adenomas by immunohistochemistry (Tan *et al.* 2017).

Finally, a recent methylome analysis revealed hypomethylation of *CYP11B2* in APA and a higher demethylation of G protein-coupled receptors (GPCRs) and GPCR-related genes (Itcho *et al.* 2018). Thus, this hypomethylation may stimulate aldosterone production in APA through receptors that would regulate gene transcription like ACTH, glucagon, somatostatin, parathyroid hormone and glutamate metabotropic receptors. Remarkably, HTR4, MC2R and PTGER1 (prostaglandin E receptor 1), which all regulate aldosterone biosynthesis, showed hypomethylation and upregulation of their mRNA in APA.

APCC and the development of APA

Different studies showed the existence of APCC in the subcapsular portion of the normal human adrenal gland. These APCC, which are suggested to autonomously produce aldosterone, are characterized by the presence of subcapsular zona glomerulosa-like cells and inner zona fasciculata-like cells (Nishimoto *et al.* 2010) and a uniform CYP11B2, but absent CYP11B1 expression (Nishimoto *et al.* 2016). Therefore, APCC and APA are distinctive in their sizes, cellular arrangements and enzyme expression profiles, as APA may consist of heterogeneous cell types expressing either CYP11B1 or CYP11B2. In the human adrenal gland, aldosterone synthase staining is continuous in the zona glomerulosa at young age between 0 and 11 years, whereas with increasing age, the adrenal cortex loses the continuous staining of aldosterone synthase and acquires a variegated zonation with increased number of CYP11B2 expressing APCC (Omata *et al.* 2017). The discontinuous CYP11B2 expression is suggested to be the consequence of a negative feedback produced by the autonomous aldosterone production by APCC.

Even though there is no sex difference in APA prevalence, a higher APCC score was described in female adrenals (Nishimoto *et al.* 2015). Transcriptome analyses identified markers for APCC in addition to CYP11B2, which showed significantly higher transcript expressions in APCC compared to zona glomerulosa or fasciculata. These genes code for proteins playing a role in glucose transport (SLC35F1), aldosterone production (MC2R) and regulation of intracellular phosphorylation and dephosphorylation (PPP4R4) (Nishimoto *et al.* 2015).

Different somatic mutations leading to autonomous aldosterone production were identified in APCC from normal subjects, supporting a pathological behavior of APCC (Nishimoto *et al.* 2015). Next-generation sequencing of 23 APCC samples from FFPE and frozen tissues from normal adrenals showed that 35% of APCC harbored mutations observed in APA and known to cause aldosterone overproduction in *CACNA1D* (26%) and *ATP1A1* (6%). No mutations in *KCNJ5* have been identified in APCC so far. Different explanations are given for this observation, including that APCC with *KCNJ5* mutations may rapidly progress into APA (Nishimoto *et al.* 2015).

Omata *et al.* demonstrated that the accumulation of APCC is a cellular and molecular cause of IHA. Examination of a cohort of 15 adrenals with IHA with CYP11B2 immunohistochemistry and next-generation sequencing showed that the adrenal cortex of all IHA adrenals harbored at least one CYP11B2-positive APCC or aldosterone-producing microadenomas. IHA adrenals had a significantly larger number of APCC than normotensive controls. Somatic mutations were identified in *CACNA1D* in 58% of cases and only in one case in *KCNJ5*. These findings suggest that not only hyperplasia but also the enlargement of APCC with somatic aldosterone driver gene mutations (most likely *CACNA1D*) are responsible for IHA (Omata *et al.* 2018).

Finally, transitional structures were described showing a subcapsular APCC-like portion and inner APA-like portion (Nishimoto *et al.* 2016). These structures are called pAATL, possible APCC-to-APA transitional lesions. These pAATL are characterized by the presence of mutations in APA driver genes, in particular *KCNJ5* and ATP1A1, with *KCNJ5* mutations identified exclusively in the APA-like portion of the structure (Nishimoto *et al.* 2016).

Conclusion

Although much progress has been made over the last ten years in our understanding of the molecular mechanisms leading to PA, there still remain a number of open

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-19-0193
© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

questions which need to be addressed. In particular, in a certain number of familial cases, diagnosed mainly as FH-II, no genetic abnormality has been identified in known genes. This is also the case for a small proportion of APA, in which even CYP11B2-guided next-generation sequencing of all coding exons of all APA driver genes fails identifying somatic mutations. This suggests that additional genes may be involved in the disease, which remain to be discovered. Another question relates to the mechanisms leading to APA development. Indeed, germline mutations identified in familial forms lead to adrenal cortex hyperplasia, but not to APA. Whether nodule formation requires an additional genetic hit favoring increased proliferation, or whether APA derive from APCC carrying somatic mutations remains to be clarified. A related question is how do APCC develop, in particular how and when do somatic mutations occur and whether there is any difference between APCC with and without somatic mutations. Future work addressing these issues will allow progress in our knowledge on the molecular mechanisms involved in normal aldosterone physiology and development of PA and possibly provide new tools for the development of better diagnostic and therapeutic approaches.

Declaration of interest

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

Funding

The laboratory of Dr Maria-Christina Zennaro is supported through institutional funding from INSERM, by the Agence Nationale pour la Recherche (ANR-15-CE14-0017-03; ANR-18-CE93-0003-01), the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20140329556) and the H2020 project ENSAT-HT grant No 633983.

References

Aglony M, Martinez-Aguayo A, Carvajal CA, Campino C, Garcia H, Bancalari R, Bolte L, Avalos C, Loureiro C, Trejo P, *et al*. 2011 Frequency of familial hyperaldosteronism type 1 in a hypertensive pediatric population: clinical and biochemical presentation. *Hypertension* **57** 1117–1121. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168740)

Akerstrom T, Willenberg HS, Cupisti K, Ip J, Backman S, Moser A, Maharjan R, Robinson B, Iwen KA, Dralle H, *et al*. 2015 Novel somatic mutations and distinct molecular signature in aldosterone-producing adenomas. *Endocrine-Related Cancer* **22** 735–744. (https://doi.org/10.1530/ERC-15-0321)

Akerstrom T, Maharjan R, Sven Willenberg H, Cupisti K, Ip J, Moser A, Stalberg P, Robinson B, Alexander Iwen K, Dralle H, *et al*. 2016 Activating mutations in CTNNB1 in aldosterone producing adenomas. *Scientific Reports* **6** 19546. (https://doi.org/10.1038/srep19546)

Assie G, Auzan C, Gasc JM, Baviera E, Balaton A, Elalouf JM, Jeunemaitre X, Plouin PF, Corvol P & Clauser E 2005 Steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revisited by transcriptome analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 6638–6649. (https://doi.org/10.1210/jc.2005-1309)

Azizan EA, Lam BY, Newhouse SJ, Zhou J, Kuc RE, Clarke J, Happerfield L, Marker A, Hoffman GJ & Brown MJ 2012 Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** E819–E829. (https://doi.org/10.1210/jc.2011-2965)

Azizan EA, Poulsen H, Tuluc P, Zhou J, Clausen MV, Lieb A, Maniero C, Garg S, Bochukova EG, Zhao W, *et al*. 2013 Somatic mutations in ATP1A1 and CACNA1D underlie a common subtype of adrenal hypertension. *Nature Genetics* **45** 1055–1060. (https://doi.org/10.1038/ng.2716)

Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC & Rainey WE 2004*a* The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Molecular Endocrinology* **18** 279–290. (https://doi.org/10.1210/me.2003-0005)

Bassett MH, White PC & Rainey WE 2004*b* The regulation of aldosterone synthase expression. *Molecular and Cellular Endocrinology* **217** 67–74. (https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.10.011)

Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, Stewart PM, Bujalska I & Rainey WE 2005 Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 5446–5455. (https://doi.org/10.1210/jc.2005-0836)

Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrancois-Martinez AM, *et al*. 2010 Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Human Molecular Genetics* **19** 1561–1576. (https://doi.org/10.1093/hmg/ddq029)

Berthon A, Drelon C, Ragazzon B, Boulkroun S, Tissier F, Amar L, Samson-Couterie B, Zennaro MC, Plouin PF, Skah S, *et al*. 2014 WNT/beta-catenin signalling is activated in aldosterone-producing adenomas and controls aldosterone production. *Human Molecular Genetics* **23** 889–905. (https://doi.org/10.1093/hmg/ddt484)

Beuschlein F, Boulkroun S, Osswald A, Wieland T, Nielsen HN, Lichtenauer UD, Penton D, Schack VR, Amar L, Fischer E, *et al*. 2013 Somatic mutations in ATP1A1 and ATP2B3 lead to aldosterone-producing adenomas and secondary hypertension. *Nature Genetics* **45** 440–4, 444e1. (https://doi.org/10.1038/ng.2550)

Boulkroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, Amar L, Mulatero P, Samson-Couterie B, Hahner S, Quinkler M, *et al*. 2012 Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism. *Hypertension* **59** 592–598. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.186478)

Calhoun DA, Nishizaka MK, Zaman MA, Thakkar RB & Weissmann P 2002 Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension. *Hypertension* **40** 892–896. (https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000040261.30455.B6)

Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, *et al*. 2011 K+ Channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* **331** 768–772. (https://doi.org/10.1126/science.1198785)

Connell JM & Davies E 2005 The new biology of aldosterone. *Journal of Endocrinology* **186** 1–20. (https://doi.org/10.1677/joe.1.06017)

Daniil G, Fernandes-Rosa FL, Chemin J, Blesneac I, Beltrand J, Polak M, Jeunemaitre X, Boulkroun S, Amar L, Strom TM, *et al*. 2016 CACNA1H mutations are associated With different forms of primary

© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

aldosteronism. *EBiomedicine* **13** 225–236. (https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.10.002)

Douma S, Petidis K, Doumas M, Papaefthimiou P, Triantafyllou A, Kartali N, Papadopoulos N, Vogiatzis K & Zamboulis C 2008 Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study. *Lancet* **371** 1921–1926. (https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60834-X)

El Ghorayeb N, Bourdeau I & Lacroix A 2016 Role of ACTH and other hormones in the regulation of aldosterone production in primary aldosteronism. *Frontiers in Endocrinology* **7** 72. (https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00072)

El Wakil A & Lalli E 2011 The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology* **332** 32–37. (https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.11.014)

Fernandes-Rosa FL, Williams TA, Riester A, Steichen O, Beuschlein F, Boulkroun S, Strom TM, Monticone S, Amar L, Meatchi T, *et al*. 2014 Genetic spectrum and clinical correlates of somatic mutations in aldosterone-producing adenoma. *Hypertension* **64** 354–361. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03419)

Fernandes-Rosa FL, Giscos-Douriez I, Amar L, Gomez-Sanchez CE, Meatchi T, Boulkroun S & Zennaro MC 2015 Different somatic mutations in multinodular adrenals with aldosterone-producing adenoma. *Hypertension* **66** 1014–1022. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05993)

Fernandes-Rosa FL, Daniil G, Orozco IJ, Goppner C, El Zein R, Jain V, Boulkroun S, Jeunemaitre X, Amar L, Lefebvre H, *et al*. 2018 A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nature Genetics* **50** 355–361. (https://doi.org/10.1038/s41588-018-0053-8)

Funder JW, Carey RM, Mantero F, Murad MH, Reincke M, Shibata H, Stowasser M & Young WF, Jr 2016 The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an Endocrine Society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101** 1889–1916. (https://doi.org/10.1210/jc.2015-4061)

Geller DS, Zhang J, Wisgerhof MV, Shackleton C, Kashgarian M & Lifton RP 2008 A novel form of human Mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93** 3117–3123. (https://doi.org/10.1210/jc.2008-0594)

Goh G, Scholl UI, Healy JM, Choi M, Prasad ML, Nelson-Williams C, Kunstman JW, Korah R, Suttorp AC, Dietrich D, *et al*. 2014 Recurrent activating mutation in PRKACA in cortisol-producing adrenal tumors. *Nature Genetics* **46** 613–617. (https://doi.org/10.1038/ng.2956)

Grunder S, Thiemann A, Pusch M & Jentsch TJ 1992 Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* **360** 759–762. (https://doi.org/10.1038/360759a0)

Hannemann A & Wallaschofski H 2012 Prevalence of primary aldosteronism in patient's cohorts and in population-based studies--a review of the current literature. *Hormone and Metabolic Research* **44** 157–162. (https://doi.org/10.1055/s-0031-1295438)

Itcho K, Oki K, Kobuke K, Yoshii Y, Ohno H, Yoneda M & Hattori N 2018 Aberrant G protein-receptor expression is associated with DNA methylation in aldosterone-producing adenoma. *Molecular and Cellular Endocrinology* **461** 100–104. (https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.019)

Korah HE & Scholl UI 2015 An update on familial hyperaldosteronism. *Hormone and Metabolic Research* **47** 941–946. (https://doi.org/10.1055/s-0035-1564166)

Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD & Stratakis CA 2000 A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22). *Journal of Medical Genetics* **37** 831–835. (https://doi.org/10.1136/jmg.37.11.831)

Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Soubrane C, Legrand A, Kuhn JM, Wolf LM & Vaudry H 1993 Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **77** 1662–1666. (https://doi.org/10.1210/jcem.77.6.8263156)

Lefebvre H, Cartier D, Duparc C, Contesse V, Lihrmann I, Delarue C, Vaudry H, Fischmeister R & Kuhn JM 2000 Effect of serotonin4 (5-HT4) receptor agonists on aldosterone secretion in idiopathic hyperaldosteronism. *Endocrine Research* **26** 583–587. (https://doi.org/10.3109/07435800009048575)

Lefebvre H, Compagnon P, Contesse V, Delarue C, Thuillez C, Vaudry H & Kuhn JM 2001 Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 5001–5007. (https://doi.org/10.1210/jcem.86.10.7917)

Lenzini L, Seccia TM, Aldighieri E, Belloni AS, Bernante P, Giuliani L, Nussdorfer GG, Pessina AC & Rossi GP 2007 Heterogeneity of aldosterone-producing adenomas revealed by a whole transcriptome analysis. *Hypertension* **50** 1106–1113. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100438)

Lenzini L, Rossitto G, Maiolino G, Letizia C, Funder JW & Rossi GP 2015 A meta-analysis of somatic KCNJ5 K(+) channel mutations in 1636 patients With an aldosterone-producing adenoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100** E1089–E1095. (https://doi.org/10.1210/jc.2015-2149)

Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Cook S, Ulick S & Lalouel JM 1992 A chimaeric 11beta-hydroxylase aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature* **355** 262–265. (https://doi.org/10.1038/355262a0)

Litchfield WR, Anderson BF, Weiss RJ, Lifton RP & Dluhy RG 1998 Intracranial aneurysm and hemorrhagic stroke in glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Hypertension* **31** 445–450. (https://doi.org/10.1161/01.HYP.31.1.445)

Louiset E, Duparc C, Lenglet S, Gomez-Sanchez CE & Lefebvre H 2017 Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **441** 99–107. (https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.008)

MacDonald BT, Tamai K & He X 2009 Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell* **17** 9–26. (https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016)

Mant A, Williams S, Roncoroni L, Lowry E, Johnson D & O'Kelly I 2013 N-glycosylation-dependent control of functional expression of background potassium channels K2P3.1 and K2P9.1. *Journal of Biological Chemistry* **288** 3251–3264. (https://doi.org/10.1074/jbc.M112.405167)

Medeau V, Assie G, Zennaro MC, Clauser E, Plouin PF & Jeunemaitre X 2005 [Familial aspect of primary hyperaldosteronism: analysis of families compatible with primary hyperaldosteronism type 2]. *Annales d'Endocrinologie* **66** 240–246. (https://doi.org/10.1016/S0003-4266(05)81756-1)

Mishunina TM & Kononenko VY 2002 Specific GABA binding in the adrenals and blood corticosteroid levels in stress in intact rats and rats with changes in the functional activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal system. *Neuroscience and Behavioral Physiology* **32** 109–112. (https://doi.org/10.1023/A:1013920722237)

Monticone S, Hattangady NG, Nishimoto K, Mantero F, Rubin B, Cicala MV, Pezzani R, Auchus RJ, Ghayee HK, Shibata H, *et al*. 2012 Effect of KCNJ5 mutations on gene expression in aldosterone-producing adenomas and adrenocortical cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** E1567–E1572. (https://doi.org/10.1210/jc.2011-3132)

Monticone S, Burrello J, Tizzani D, Bertello C, Viola A, Buffolo F, Gabetti L, Mengozzi G, Williams TA, Rabbia F, *et al*. 2017 Prevalence and clinical manifestations of primary aldosteronism encountered in primary care practice. *Journal of the American College of Cardiology* **69** 1811–1820. (https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.01.052)

© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

Mulatero P, Tizzani D, Viola A, Bertello C, Monticone S, Mengozzi G, Schiavone D, Williams TA, Einaudi S, La Grotta A, *et al*. 2011 Prevalence and characteristics of familial hyperaldosteronism: the PATOGEN study (Primary Aldosteronism in TOrino-GENetic forms). *Hypertension* **58** 797–803. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.175083)

Mulatero P, Tauber P, Zennaro MC, Monticone S, Lang K, Beuschlein F, Fischer E, Tizzani D, Pallauf A, Viola A, *et al*. 2012 KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. *Hypertension* **59** 235–240. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.183996)

Mulatero P, Monticone S, Rainey WE, Veglio F & Williams TA 2013 Role of KCNJ5 in familial and sporadic primary aldosteronism. *Nature Reviews. Endocrinology* **9** 104–112. (https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.230)

Nanba K, Omata K, Else T, Beck PCC, Nanba AT, Turcu AF, Miller BS, Giordano TJ, Tomlins SA & Rainey WE 2018 Targeted molecular characterization of aldosterone-producing adenomas in white Americans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **103** 3869–3876. (https://doi.org/10.1210/jc.2018-01004)

Nanba K, Omata K, Gomez-Sanchez CE, Stratakis CA, Demidowich AP, Suzuki M, Thompson LDR, Cohen DL, Luther JM, Gellert L, *et al*. 2019 Genetic characteristics of aldosterone-producing adenomas in blacks. *Hypertension* **73** 885–892. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12070)

Nishimoto K, Nakagawa K, Li D, Kosaka T, Oya M, Mikami S, Shibata H, Itoh H, Mitani F, Yamazaki T, *et al*. 2010 Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 2296–2305. (https://doi.org/10.1210/jc.2009-2010)

Nishimoto K, Tomlins SA, Kuick R, Cani AK, Giordano TJ, Hovelson DH, Liu CJ, Sanjanwala AR, Edwards MA, Gomez-Sanchez CE, *et al*. 2015 Aldosterone-stimulating somatic gene mutations are common in normal adrenal glands. *PNAS* **112** E4591–E4599. (https://doi.org/10.1073/pnas.1505529112)

Nishimoto K, Seki T, Kurihara I, Yokota K, Omura M, Nishikawa T, Shibata H, Kosaka T, Oya M, Suematsu M, *et al*. 2016 Case report: nodule development from subcapsular aldosterone-producing cell clusters causes hyperaldosteronism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101** 6–9. (https://doi.org/10.1210/jc.2015-3285)

Oki K, Plonczynski MW, Lam ML, Gomez-Sanchez EP & Gomez-Sanchez CE 2012*a* The potassium channel, Kir3.4 participates in angiotensin II-stimulated aldosterone production by a human adrenocortical cell line. *Endocrinology* **153** 4328–4335. (https://doi.org/10.1210/en.2012-1241)

Oki K, Plonczynski MW, Luis Lam M, Gomez-Sanchez EP & Gomez-Sanchez CE 2012*b* Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis. *Endocrinology* **153** 1774–1782. (https://doi.org/10.1210/en.2011-1733)

Omata K, Anand SK, Hovelson DH, Liu CJ, Yamazaki Y, Nakamura Y, Ito S, Satoh F, Sasano H, Rainey WE, *et al*. 2017 Aldosterone-producing cell clusters frequently harbor somatic mutations and accumulate With age in normal adrenals. *Journal of the Endocrine Society* **1** 787–799. (https://doi.org/10.1210/js.2017-00134)

Omata K, Satoh F, Morimoto R, Ito S, Yamazaki Y, Nakamura Y, Anand SK, Guo Z, Stowasser M, Sasano H, *et al*. 2018 Cellular and genetic causes of idiopathic hyperaldosteronism. *Hypertension* **72** 874–880. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11086)

Pallauf A, Schirpenbach C, Zwermann O, Fischer E, Morak M, Holinski-Feder E, Hofbauer L, Beuschlein F & Reincke M 2012 The prevalence of familial hyperaldosteronism in apparently sporadic primary aldosteronism in Germany: a single center experience. *Hormone and Metabolic Research* **44** 215–220. (https://doi.org/10.1055/s-0031-1299730)

Reimer EN, Walenda G, Seidel E & Scholl UI 2016 CACNA1HM1549V mutant calcium channel causes autonomous aldosterone production in HAC15 cells and is inhibited by Mibefradil. *Endocrinology* **157** 3016–3022. (https://doi.org/10.1210/en.2016-1170)

Rhayem Y, Perez-Rivas LG, Dietz A, Bathon K, Gebhard C, Riester A, Mauracher B, Gomez-Sanchez C, Eisenhofer G, Schwarzmayr T, *et al*. 2016 PRKACA somatic mutations are rare findings in aldosterone-producing adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101** 3010–3017. (https://doi.org/10.1210/jc.2016-1700)

Rossi GP, Sacchetto A, Visentin P, Canali C, Graniero GR, Palatini P & Pessina AC 1996 Changes in left ventricular anatomy and function in hypertension and primary aldosteronism. *Hypertension* **27** 1039–1045. (https://doi.org/10.1161/01.HYP.27.5.1039)

Rossi GP, Bernini G, Caliumi C, Desideri G, Fabris B, Ferri C, Ganzaroli C, Giacchetti G, Letizia C, Maccario M, *et al*. 2006 A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients. *Journal of the American College of Cardiology* **48** 2293–2300. (https://doi.org/10.1016/j.jacc.2006.07.059)

Ruggiero C & Lalli E 2016 Impact of ACTH signaling on transcriptional regulation of steroidogenic genes. *Frontiers in Endocrinology* **7** 24. (https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00024)

Savard S, Amar L, Plouin PF & Steichen O 2013 Cardiovascular complications associated with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study. *Hypertension* **62** 331–336. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01060)

Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, Couch R, Hammer LK, Harley FL, Farhi A, *et al*. 2012 Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *PNAS* **109** 2533–2538. (https://doi.org/10.1073/pnas.1121407109)

Scholl UI, Goh G, Stolting G, de Oliveira RC, Choi M, Overton JD, Fonseca AL, Korah R, Starker LF, Kunstman JW, *et al*. 2013 Somatic and germline CACNA1D calcium channel mutations in aldosterone-producing adenomas and primary aldosteronism. *Nature Genetics* **45** 1050–1054. (https://doi.org/10.1038/ng.2695)

Scholl UI, Healy JM, Thiel A, Fonseca AL, Brown TC, Kunstman JW, Horne MJ, Dietrich D, Riemer J, Kucukkoylu S, *et al*. 2015*a* Novel somatic mutations in primary hyperaldosteronism are related to the clinical, radiological and pathological phenotype. *Clinical Endocrinology* **83** 779–789. (https://doi.org/10.1111/cen.12873)

Scholl UI, Stolting G, Nelson-Williams C, Vichot AA, Choi M, Loring E, Prasad ML, Goh G, Carling T, Juhlin CC, *et al*. 2015*b* Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *ELife* **4** e06315. (https://doi.org/10.7554/eLife.06315)

Scholl UI, Stolting G, Schewe J, Thiel A, Tan H, Nelson-Williams C, Vichot AA, Jin SC, Loring E, Untiet V, *et al*. 2018 CLCN2 chloride channel mutations in familial hyperaldosteronism type II. *Nature Genetics* **50** 349–354. (https://doi.org/10.1038/s41588-018-0048-5)

Seccia TM, Mantero F, Letizia C, Kuppusamy M, Caroccia B, Barisa M, Cicala MV, Miotto D & Rossi GP 2012 Somatic mutations in the KCNJ5 gene raise the lateralization index: implications for the diagnosis of primary aldosteronism by adrenal vein sampling. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **97** E2307–E2313. (https://doi.org/10.1210/jc.2012-2342)

Spat A & Hunyady L 2004 Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiological Reviews* **84** 489–539. (https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2003)

Stindl J, Tauber P, Sterner C, Tegtmeier I, Warth R & Bandulik S 2015 Pathogenesis of adrenal aldosterone-producing adenomas carrying mutations of the Na(+)/K(+)-ATPase. *Endocrinology* **156** 4582–4591. (https://doi.org/10.1210/en.2015-1466)

Stowasser M & Gordon RD 2001 Familial hyperaldosteronism. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **78** 215–229. (https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00097-8)

Stowasser M, Gordon RD, Tunny TJ, Klemm SA, Finn WL & Krek AL 1992 Familial hyperaldosteronism type II: five families with a new variety of primary aldosteronism. *Clinical and Experimental Pharmacology and*

© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio

Physiology **19** 319–322. (https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1992.tb00462.x)

Stowasser M, Bachmann AW, Huggard PR, Rossetti TR & Gordon RD 2000 Treatment of familial hyperaldosteronism type I: only partial suppression of adrenocorticotropin required to correct hypertension. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85** 3313–3318. (https://doi.org/10.1210/jcem.85.9.6834)

Stowasser M, Sharman J, Leano R, Gordon RD, Ward G, Cowley D & Marwick TH 2005 Evidence for abnormal left ventricular structure and function in normotensive individuals with familial hyperaldosteronism type I. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 5070–5076. (https://doi.org/10.1210/jc.2005-0681)

Su H, Gu Y, Li F, Wang Q, Huang B, Jin X, Ning G & Sun F 2013 The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is overactivated in primary aldosteronism. *PLOS One* **8** e62399. (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062399)

Sutherland DJ, Ruse JL & Laidlaw JC 1966 Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Canadian Medical Association Journal* **95** 1109–1119.

Swierczynska MM, Betz MJ, Colombi M, Dazert E, Jeno P, Moes S, Pfaff C, Glatz K, Reincke M, Beuschlein F, *et al*. 2019 Proteomic landscape of aldosterone-producing adenoma. *Hypertension* **73** 469–480. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11733)

Tan GC, Negro G, Pinggera A, Tizen Laim NMS, Mohamed Rose I, Ceral J, Ryska A, Chin LK, Kamaruddin NA, Mohd Mokhtar N, *et al*. 2017 Aldosterone-producing adenomas: histopathology-genotype correlation and identification of a novel CACNA1D mutation. *Hypertension* **70** 129–136. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.09057)

Tauber P, Aichinger B, Christ C, Stindl J, Rhayem Y, Beuschlein F, Warth R & Bandulik S 2016 Cellular pathophysiology of an adrenal adenoma-associated mutant of the plasma membrane Ca(2+)-ATPase ATP2B3. *Endocrinology* **157** 2489–2499. (https://doi.org/10.1210/en.2015-2029)

Teo AE, Garg S, Shaikh LH, Zhou J, Karet Frankl FE, Gurnell M, Happerfield L, Marker A, Bienz M, Azizan EA, *et al*. 2015 Pregnancy, primary aldosteronism, and adrenal CTNNB1 mutations. *New England Journal of Medicine* **373** 1429–1436. (https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504869)

Vinson GP 2016 Functional zonation of the adult mammalian adrenal cortex. *Frontiers in Neuroscience* **10** 238. (https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00238)

Watanabe I, Zhu J, Recio-Pinto E & Thornhill WB 2004 Glycosylation affects the protein stability and cell surface expression of Kv1.4 but Not Kv1.1 potassium channels. A pore region determinant dictates the effect of glycosylation on trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **279** 8879–8885. (https://doi.org/10.1074/jbc.M309802200)

Williams TA, Monticone S, Morello F, Liew CC, Mengozzi G, Pilon C, Asioli S, Sapino A, Veglio F & Mulatero P 2010 Teratocarcinoma-derived growth factor-1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas and increases aldosterone secretion and inhibits apoptosis in vitro. *Hypertension* **55** 1468–1475. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.150318)

Williams TA, Monticone S, Crudo V, Warth R, Veglio F & Mulatero P 2012 Visinin-like 1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations and protects from calcium-induced apoptosis. *Hypertension* **59** 833–839. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.188532)

Zennaro MC 2019 From transcripts to proteins. *Hypertension* **73** 284–285. (https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11820)

Received in final form 7 June 2019
Accepted 3 July 2019
Accepted Preprint published online 3 July 2019

© 2019 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 02/28/2022 04:46:50PM
via Inserm Disc Ist, Inserm and Insermbiblio