

Université de Montréal

**IDENTIFICATION DES GÈNES RESPONSABLES DES
HYPERPLASIES SURRÉNALIENNES
MACRONODULAIRES BILATÉRALES FAMILIALES AVEC
RÉCEPTEURS ABERRANTS.**

par

Fabien Magne

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales
option Générale

Août, 2011

© Fabien Magne, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

IDENTIFICATION DES GÈNES RESPONSABLES DES
HYPERPLASIES SURRÉNALIENNES MACRONODULAIRES
BILATÉRALES FAMILIALES AVEC RÉCEPTEURS
ABERRANTS.

Présenté par :
Fabien Magne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Sophie Bernard, président-rapporteur
Dr André Lacroix, directeur de recherche
Dr Isabelle Bourdeau, co-directrice
Dr Michèle Brochu, membre du jury

Résumé

La majorité des hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales avec syndrome de Cushing ACTH-indépendant (AIMAH) est due à l'expression aberrante de divers récepteurs hormonaux au niveau du cortex surrénalien. Les gènes responsables des AIMAH familiales avec récepteurs aberrants n'ont pas été identifiés. Le but de ce projet est de les identifier.

Une étude de liaison, visant à identifier la ou les régions du génome comprenant le ou les gènes pouvant être en cause dans les AIMAH familiales, a été réalisée en utilisant l'ADN des membres d'une famille (10 malades et 7 sains) originaire du Québec, atteinte d'AIMAH et syndrome de Cushing et caractérisée par l'expression des récepteurs β -adrénergique et V1-vasopressine. Diverses régions chromosomiques entre les personnes atteintes et non-atteintes de la famille ont été soulignées. Un total de 707453 SNPs a été obtenu, et après analyse statistique, 159 SNPs significatifs, pouvant être associés au phénotype, ont été mis en évidence entre les deux groupes. Il a été constaté que la majorité de ces SNPs se situaient sur les régions chromosomiques 1q32.1 et 16q12.2. Une étude du transcriptome a aussi été réalisée en utilisant l'ADN des tumeurs de deux patients de la famille, ainsi que l'ADN d'autres tumeurs surrénaliennes. Les analyses statistiques ont permis d'identifier 15 gènes susceptibles d'être reliés à la maladie (11 surexprimés et 4 sous-exprimés). En utilisant les données de ces deux études, nous avons ciblé six gènes du chromosome 1 (*ATP2B4*, *PPP1R12B*, *SOX13*, *CACNA1S*, *ADORA1* et *PHLDA3*), un du chromosome 16 (*CHD9*) et un du chromosome 13 (*SPRY2*), afin de rechercher la présence de mutations. Le séquençage n'a révélé aucun changement de nucléotide dans les gènes *PPP1R12B* et *SOX13*. Dans les gènes *ATP2B4*, *CACNA1S*, *ADORA1* et *PHLDA3*, le séquençage a révélé des changements de nucléotides n'entraînant soit pas de changement d'acide aminé soit un changement d'acide aminé jugé « non pertinent », du fait qu'il ne permettait pas de différencier les sujets sains des sujets atteints. Pour ce qui est de *CHD9* et *SPRY2*, le séquençage a permis d'identifier des changements de nucléotides entraînant des

changements d'acides aminés de façon plus fréquente chez les sujets atteints par rapport aux sujets sains.

En conclusion, nos travaux nous ont donc permis d'identifier, par étude de liaison et par analyse du transcriptome, des gènes candidats qui pourraient être responsables de cette pathologie. Le séquençage de ces gènes candidats a révélé des mutations de *CHD9* et *SPRY2*. Ces résultats s'avèrent prometteurs puisque ces deux gènes produisent des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation de la signalisation des protéines kinases. Le phénotypage et le génotypage des patients atteints doivent être poursuivis pour vérification.

Mots-clés : Glandes Surrénales, Cortex Surrénalien, Tumeurs Cortico-surrénales, Hyperplasie Macronodulaire Surrénalienne ACTH-indépendant (AIMAH), Syndrome de Cushing, Récepteurs Aberrants Couplés aux Protéines G, Micropuce à ADN.

Abstract

The majority of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome (AIMAH) is due to the aberrant expression of various receptors in the adrenal cortex. The genes responsible for familial AIMAH with aberrant receptors have not been identified. The aim of this project is to characterize them.

A linkage study to identify the region or regions of the genome comprising the gene or genes that may be involved in familial AIMAH was performed using DNA of family members (10 affected and 7 non affected) born in Quebec and harboring AIMAH and Cushing's syndrome, under the aberrant regulation of B-adrenergic and V1-vasopressin receptors. Various chromosomal regions between patients and non-affected family were highlighted. A total of 707,453 SNPs were obtained, and after statistical analysis, 159 significant SNPs, possibly associated with phenotype, were found between the two groups. It was found that the majority of these SNPs were located on chromosomal regions 1q32.1 and 16q12.2. A transcriptome analysis was conducted using DNA from tumours of two patients of the family, as well as DNA from other adrenal tumours; Statistical analysis identified 15 genes that may be linked to disease (11 up-regulated and 4 under-expressed). Using data from these two studies, we identified six genes on chromosome 1 (*ATP2B4*, *PPP1R12B*, *SOX13*, *ADORA1*, *CACNAIS* and *PHLDA3*), one on chromosome 16 (*CHD9*) and one on chromosome 13 (*SPRY2*), to investigate the presence of mutations. The sequencing revealed no nucleotide changes in gene *PPP1R12B* and *SOX13*. In *ATP2B4*, *CACNAIS*, *ADORA1* and *PHLDA3*, the sequencing not revealed nucleotides changes leading to either amino acid changes or an amino acid changes considered “not-relevant”, because they do not differentiate healthy individuals from affected. The sequencing of *CHD9* and *SPRY2* identified nucleotide changes causing amino acid changes more frequently in patients compared to healthy subjects.

In conclusion, our work has therefore identified by linkage analysis and DNA microarray candidate genes that can be responsible to this disease, and mutations in two of

these genes, *CHD9* and *SPRY2*. These results are promising because these genes produce proteins involved in chromatin remodeling and regulation of signaling protein kinases. Phenotyping and genotyping of patients should be pursued further.

Keywords: Adrenal glands, adrenal cortex, cortico-adrenal tumors, ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH), Cushing's syndrome, Aberrant G-protein coupled receptors, Microarray.

Table des matières

1.	Introduction.....	14
1.1	La Glande Surrénale.....	14
1.1.1	Physiologie de la glande surrénale.....	14
1.1.2	Embryogénèse de la glande surrénale.....	15
1.1.3	Stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien	16
1.1.4	L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien.....	19
1.2	Les Pathologies de la Glande Surrénale.....	20
1.2.1	Syndrome de Cushing.....	20
1.2.1.1	Historique de la Pathologie	20
1.2.1.2	Étiologies de la Pathologie	21
1.2.1.3	Syndrome de Cushing ACTH-Dépendant.....	22
1.2.1.4	Syndrome de Cushing ACTH-Indépendant.....	22
1.2.2	Tumeurs du Cortex Surrénalien	23
1.2.2.1	Tumeurs sécrétant du cortisol.....	24
1.2.2.2	Tumeurs sécrétant de l'aldostérone	24
1.2.2.3	Hyperplasies surrénaliennes macronodulaires	24
1.2.2.4	Syndromes de tumeurs héréditaires.....	24
1.2.2.4.1	Syndrome de Li-Fraumeni	25
1.2.2.4.2	Syndrome de Beckwith-Wiedemann	25
1.2.2.4.3	Complexe de Carney.....	26
1.2.2.4.4	Syndrome des néoplasies endocrines multiples de type 1	27
1.2.2.4.5	Hyperplasies surrénaliennes congénitales	27
1.2.2.4.6	Syndrome de McCune-Albright.....	28
1.3	Hyperplasies Surrénaliennes Macronodulaires ACTH-Indépendantes.....	29
1.3.1	Pathologie	29
1.3.2	Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG).....	30
1.3.2.1	Catécholamines.....	30

1.3.2.2	Sérotonine.....	31
1.3.2.3	Vasopressine.....	32
1.3.2.4	Angiotensine.....	32
1.3.2.5	LH/hCG.....	33
1.3.2.6	GIP.....	33
1.3.3	Facteurs de régulation de l'expression des RCPG.....	34
1.3.4	Les cas Familiaux.....	36
1.3.4.1	Cas #1.....	37
1.3.4.2	Cas #2.....	37
1.3.4.3	Cas #3.....	37
1.3.5	Le rôle des SNPs.....	39
2.	Projet de Recherche.....	41
2.1	Problématique.....	41
2.1.1	Pathologie.....	41
2.1.2	Cas Familial Étudié.....	41
2.2	Hypothèse et Objectifs.....	45
2.3	Matériel et Méthodes.....	45
2.3.1	Puce à SNP.....	45
2.3.2	Micropuce à ADN.....	45
2.3.3	Amplification des exons et Séquençage.....	46
3.	Résultats.....	47
3.1	Puce à SNP.....	47
3.2	Micropuce à ADN.....	49
3.3	Gènes Candidats.....	49
3.3.1	<i>ATP2B4</i>	50
3.3.1.1	Fonction.....	50
3.3.1.2	Résultats.....	51
3.3.2	<i>PPP1R12B</i>	53
3.3.2.1	Fonction.....	53

3.3.2.2 Résultats	53
3.3.3 <i>SOX13</i>	54
3.3.3.1 Fonction	54
3.3.3.2 Résultats	54
3.3.4 <i>CACNAIS</i>	54
3.3.4.1 Fonction.....	54
3.3.4.2 Résultats	55
3.3.5 <i>ADORAI</i>	58
3.3.5.1 Fonction.....	58
3.3.5.2 Résultats	59
3.3.6 <i>CHD9</i>	60
3.3.6.1 Fonction.....	60
3.3.6.2 Résultats	60
3.3.7 <i>SPRY2</i>	65
3.3.7.1 Fonction.....	65
3.3.7.2 Résultats	66
3.3.8 <i>PHLDA3</i>	69
3.3.8.1 Fonction.....	69
3.3.8.2 Résultats	69
3.3.9 Résumé des données de séquençage pour les gènes <i>CHD9</i> et <i>SPRY2</i>	71
4. Discussion	73
Annexe	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : <i>Étiologies du Syndrome de Cushing</i>	21
Tableau 2 : <i>Fréquence des incidentalomes surrénaliens</i>	23
Tableau 3 : <i>Syndromes de tumeurs héréditaires associés aux tumeurs corticosurrénales</i> ..	28
Tableau 4: <i>Ensemble des cas d'AIMAH familiaux décrit dans la littérature</i>	39
Tableau 5 : <i>Protocole des tests dynamiques caractérisant les récepteurs aberrants</i>	42
Tableau 6: <i>Résumé des résultats de séquençage pour le gène ATP2B4</i>	52
Tableau 7: <i>Résumé des résultats de séquençage pour le gène CACNAIS</i>	58
Tableau 8: <i>Résumé des résultats de séquençage pour le gène ADORA1</i>	59
Tableau 9: <i>Résumé des différents SNPs trouvés suite au séquençage du gène CHD9</i>	65
Tableau 10: <i>Résumé des résultats obtenus suite au séquençage du gène SPRY2</i>	68
Tableau 11 : <i>Comparaison des résultats de séquençages pour les deux gènes d'intérêt</i>	71

Liste des figures

Figure 1: Zonation du cortex surrénalien	15
Figure 2: Stéroïdogénèse au niveau du cortex surrénalien.....	17
Figure 3 : Axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien	19
Figure 4 : Pedigree de la famille	44
Figure 5 : Principaux SNPs répertoriés.....	47
Figure 6 : Dissociation de certains SNPs du gène <i>CHD9</i> situé dans la région 16q12.2 entre les individus sains et atteints	48
Figure 7 : Dissociation du SNP du gène <i>SPRY2</i> situé sur la région 13q31.1 entre les individus sains et atteints	48
Figure 8 : Séquence nucléotidique exon 2 du gène <i>ATP2B4</i>	51
Figure 9 : Chromatogrammes exon 2 du gène <i>ATP2B4</i>	52
Figure 10 : Séquence nucléotidique exon 38 du gène <i>CACNAIS</i>	56
Figure 11 : Séquence protéique exon 38 du gène <i>CACNAIS</i>	56
Figure 12 : Séquence nucléotidique exon 44 du gène <i>CACNAIS</i>	57
Figure 13 : Séquence protéique exon 44 du gène <i>CACNAIS</i>	57
Figure 14 : Séquence nucléotidique exon 29 du gène <i>CHD9</i>	61
Figure 15 : Séquence protéique exon 29 du gène <i>CHD9</i>	61
Figure 16 : Séquence nucléotidique exon 31 du gène <i>CHD9</i>	62
Figure 17 : Séquence protéique exon 31 du gène <i>CHD9</i>	62
Figure 18 : Séquence nucléotidique exon 33 du gène <i>CHD9</i>	62
Figure 19 : Séquence protéique exon 33 du gène <i>CHD9</i>	63
Figure 20 : Séquence nucléotidique exon 39 du gène <i>CHD9</i>	63
Figure 21 : Séquence protéique exon 39 du gène <i>CHD9</i>	64
Figure 22: Séquence nucléotidique exon 2 du gène <i>SPRY2</i>	67
Figure 23: Séquence protéique exon 2 du gène <i>SPRY2</i>	67
Figure 24: Chromatogramme exon 1 du gène <i>PHLDA3</i> en anti-sens.....	70
Figure 25 : Séquence protéique exon 1 du gène <i>PHLDA3</i>	70

Figure 26 : Modèle hypothétique des événements génétiques séquentiels menant à la formation de tumeurs corticosurréaliennes unilatérale ou hyperplasies bilatérales avec surexpression de GPCR.....	75
Figure 27 : Fréquences du SNP rs3743771 relatif au gène <i>CHD9</i> (tiré du site HapMap).....	i
Figure 28 : Fréquences du SNP rs504122 relatif au gène <i>SPRY2</i> (tiré du site HapMap)	i

Liste des abréviations utilisées

DHEAS = sulfate de déhydroépiandrosterone

3 β HSD = 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase

CYP21 = 21-hydroxylase

CYP11B1 = 11 β -hydroxylase

ACTH = Hormone adrénocorticotropique

CRH = Hormone de relâche de la corticotropine

SC = Syndrome de Cushing

LFS = Syndrome de Li-Fraumeni

ACC = Cancers du cortex surrénalien

BWS = Syndrome de Beckwith-Wiedemann

CNC = Complexe de Carney

PPNAD = Hyperplasie micronodulaire pigmentaire des glandes surrénales

CAH = Hyperplasie congénitale des surrénales

MAS = Syndrome de McCune Albright

AIMAH = Hyperplasie surrénalienne macronodulaire bilatérale ACTH-indépendante

LH/hCG = Hormone lutéale/Hormone chorionique gonadotrope humaine

GIPR = Récepteur du peptide inhibiteur gastrique

SNP = Polymorphisme d'un seul nucléotide

À tous ceux qui ont cru en mes capacités ...

Remerciements

Mes premiers mots et pensées vont à mes parents, sans qui grâce à leur soutien moral, mais aussi financier, je ne me serais jamais rendu jusqu'à ce niveau d'études. Je vous remercie tout particulièrement. Sans les nommer, j'aimerais aussi remercier ma famille et mes ami(e)s pour leurs appuis et leurs encouragements.

Je voudrais aussi remercier les Dr Françoise Le Moigne et Dr Samir Mesli, qui m'ont permis de me faire découvrir les domaines de la biologie médicale et de la biochimie clinique. J'ai compris grâce à vous que je voulais poursuivre mes études dans ces formidables domaines et cela m'a vraiment aidé pour choisir mon axe d'études supérieures.

J'aimerais adresser mes plus sincères remerciements à mon Directeur de recherche, le Dr André Lacroix, qui m'a fait confiance en m'offrant la chance de poursuivre mes études dans son laboratoire. Je vous en serais toujours très redevable et j'espère vous avoir fait honneur tout au long de ma Maitrise, en ayant essayé de mener au mieux le projet que vous m'aviez confié.

Mes remerciements vont aussi à ma Co-directrice, le Dr Isabelle Bourdeau, pour son encadrement, ses conseils et pour m'avoir guidé dans les différentes phases de mon projet.

Enfin, je voudrais remercier Mme Sylvie Oble pour tous ses conseils, son encadrement et son soutien tout au long de ce projet. Ces années de Maitrise auront été extrêmement agréables et c'est pour une grande partie grâce à toi.

Une attention particulière pour la collaboration de Monsieur Antoine Lampron, Ph.D, et de Monsieur Gilles Corbeil dans la réalisation et l'analyse du génome scan, ainsi que pour la collaboration des Drs Johanne Tremblay et Pavel Hamet dans la réalisation et l'interprétation de cette étude qui fut réalisée grâce à la plateforme de génomique de leur laboratoire, sans qui ce magnifique projet n'aurait pas pu aboutir.

À tous encore une fois, très sincèrement merci.

1. Introduction

1.1 La Glande Surrénale

1.1.1 Physiologie de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont deux organes endocriniens, situés au dessus de chaque rein. Chacune de ces glandes sont constituées de deux parties endocrines, le cortex et la médulla, jouant un rôle précis au niveau de la synthèse d'hormone, entourées d'une capsule et de tissu adipeux. Le cortex, composé de trois zones distinctes superposées (zone glomérulée, zone fasciculée et zone réticulée) provient du mésoderme et synthétise diverses hormones stéroïdiennes. Il constitue la partie externe de la glande. La médulla est composée de cellules chromaffines provenant de la crête neurale, qui synthétisent et relâchent les catécholamines telles que la noradrénaline et l'adrénaline (Figure 1).

Le cortex, constitué de trois zones, sera davantage expliqué compte tenu de notre intérêt par rapport à la pathologie. La zone glomérulée, se trouvant le plus en périphérie de la glande, produit les minéralocorticoïdes, en particulier l'aldostérone. Sous cette zone, se trouve la zone fasciculée, constituant environ 70 % du cortex et est le site de production des glucocorticoïdes, dont le cortisol chez l'humain. Enfin, la dernière zone est la réticulée, située entre la zone fasciculée et la médulla et est le lieu de synthèse des androgènes surrénaliens incluant le sulfate de déhydroépiandrostérone ou DHEAS (1,2).

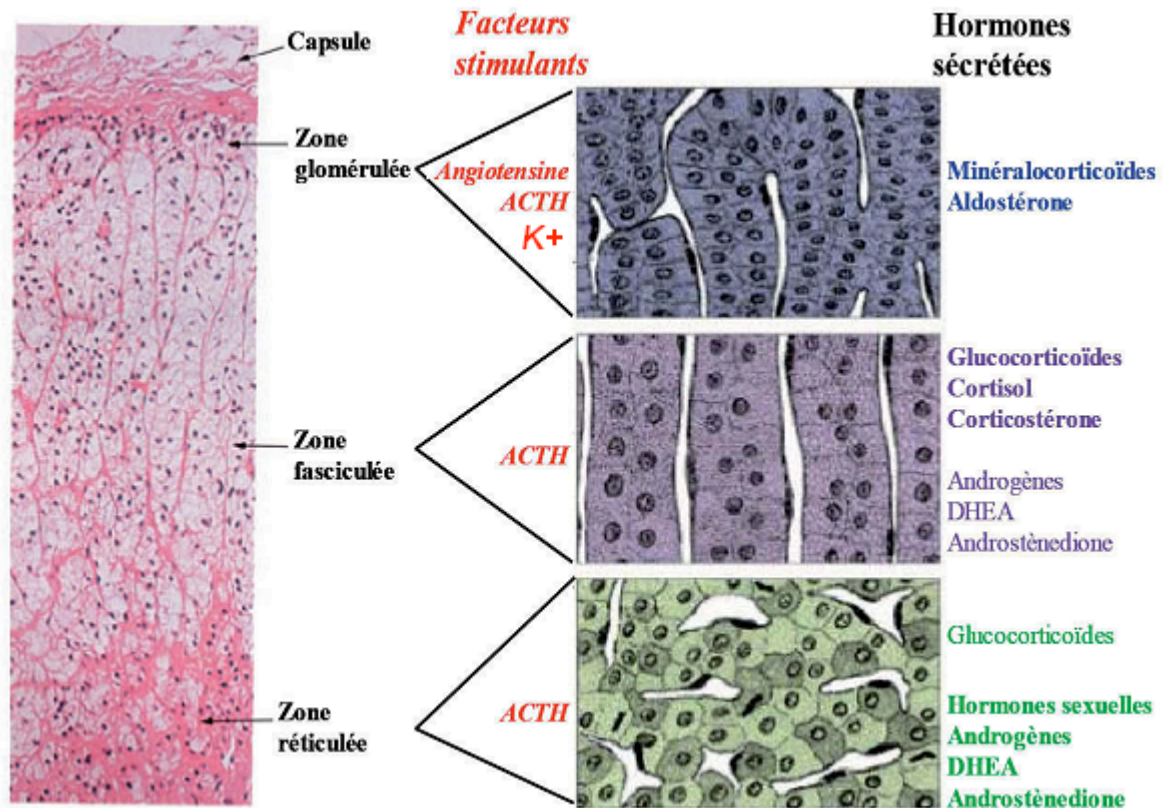


Figure 1: Zonation du cortex surrénalien (modifié de Fulla Y. et al. (3))

1.1.2 Embryogénèse de la glande surrénale

Le développement de la glande surrénale commence tôt au cours de l'embryogenèse et continue jusqu'à l'âge adulte. Le cortex surrénalien fœtal dérive d'un précurseur de la lignée adrenogonadique commun qui permet également le développement des cellules des gonades sécrétant des stéroïdes. Dans les embryons humains, ces progéniteurs adrenogonadiques apparaissent dès la 4^{ème} semaine de gestation. Les cellules destinées à la formation du cortex surrénalien proviennent des cellules du mésenchyme de la cavité cœlomique. Cette glande surrénale fœtale est observable à partir de 8 semaines de

gestation. Peu après, un second groupe de cellules se développe pour former une zone externe des cellules, la zone définitive. Dans le même temps, le cortex surrénalien devient encapsulé et les cellules chromaffines provenant de la crête neurale migrent à travers le cortex fœtal pour former la future médulla surrénalienne. Cette dernière n'est pas d'apparence adulte avant 12-18 mois. Les cellules dérivées de la crête neurale se différencient en cellules chromaffines sécrétant des catécholamines, sous l'action de glucocorticoïdes produites par le cortex. Après la naissance, la glande surrénale se modifie complètement, avec la zone fœtale qui régresse et la zone définitive du cortex formes les différentes zones fonctionnelles, qui sont les zones glomérulée, fasciculée et réticulée (Figure 1). Chacune des zones acquièrent sa spécificité au niveau de production hormonale, tel que décrit précédemment (2, 60).

1.1.3 Stéroïdogénèse dans le cortex surrénalien

Le cortex surrénalien est responsable de la production des minéralocorticoïdes, des glucocorticoïdes mais aussi de certaines hormones sexuelles (1,3). Comme mentionné précédemment, chacune des zones du cortex est responsable de la synthèse d'hormone spécifique, et possède chacune des enzymes propres. La synthèse de chacune de ces hormones stéroïdiennes se fait à partir d'un précurseur commun : le cholestérol (Figure 2).

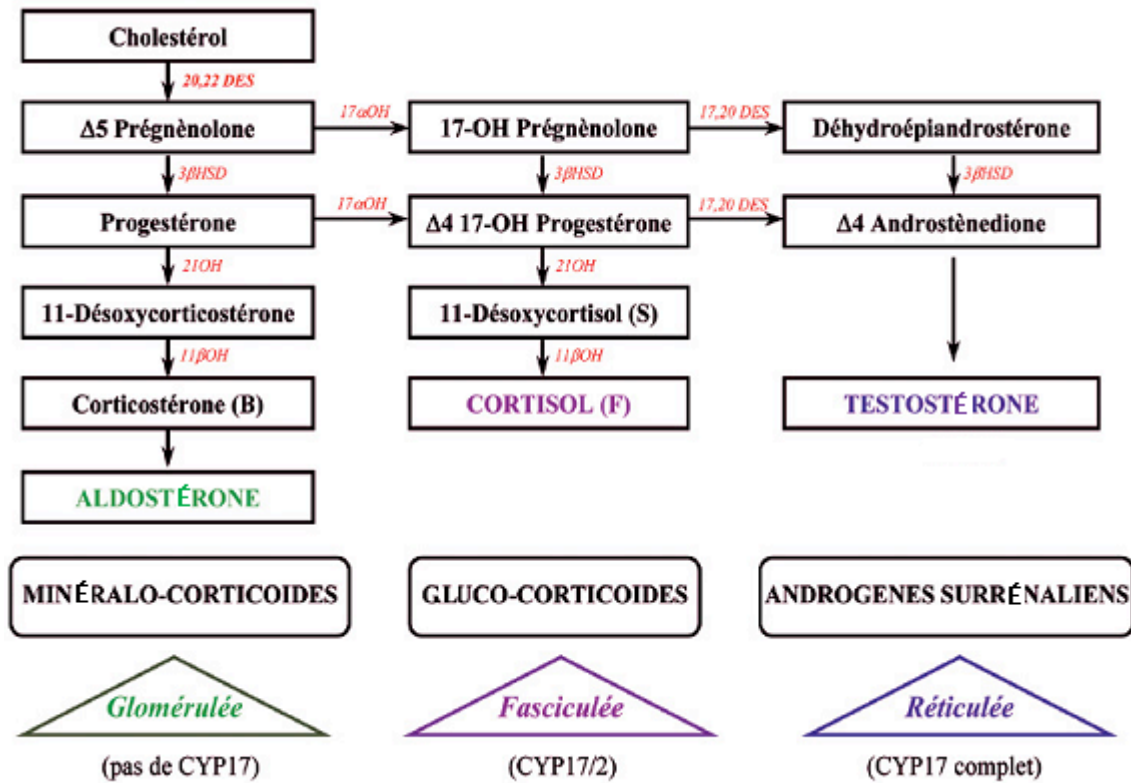


Figure 2: Stéroïdogénèse au niveau du cortex surrénalien (modifié de Fulla Y. et al. (3))

Le précurseur peut provenir de diverses sources ou peut être synthétisé de novo dans les cellules corticales à partir d'acétate ou être transféré des lipoprotéines de faible densité (LDL). Le cholestérol est modifié par diverses enzymes dérivées du cytochrome p450 (17 α , 11 β -, 21-hydroxylases) ainsi que par la 3β HSD (représentées en rouge sur la Figure 2), en commençant au niveau des mitochondries, puis se poursuivant dans le réticulum endoplasmique et se finalisant à nouveau dans les mitochondries. La première étape de synthèse, réalisée par CYP11A1 (ou 20, 22 desmolase), est la plus importante puisqu'elle est l'étape limitante dans la synthèse des hormones stéroïdiennes. Cette étape permet de

convertir le cholestérol en prégnénone, qui est le précurseur des autres hormones stéroïdiennes produites au niveau des trois zones du cortex surrénalien (1,3).

Les minéralocorticoïdes sont synthétisés au niveau de la zone glomérulée. La principale hormone produite est l'aldostérone. La synthèse de celle-ci découle d'une succession de réactions à partir de la prégnénone. Cette dernière est convertie en progestérone par la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), suivie par la 21-hydroxylase (CYP21) qui permet de convertir la progestérone en 11-Désoxycorticostérone. Enfin, cette dernière est transformée en corticostérone par la 11 β -hydroxylase (CYP11B1). L'aldostérone provient de la transformation de la corticostérone par l'aldostérone synthétase (CYP11B2), produite exclusivement dans cette zone du cortex (1,3).

Les glucocorticoïdes sont synthétisés au niveau de la zone fasciculée. L'hormone principale est le cortisol. Sa synthèse est due à la 17 α -hydroxylase, qui n'est produite que dans cette zone, et qui engendre la conversion de la prégnénone en 17 hydroxy-prégnénone. Cette dernière subit deux modifications avant que la 11-Désoxycortisol soit transformée par la 11 β -hydroxylase (CYP11B1) en cortisol (1,3).

Les androgènes puissants et les estrogènes sont produits en grande majorité par les gonades. Les androgènes surrénaliens sont synthétisés, au niveau de la zone réticulée. L'hormone qui est principalement produite est la DHEA et sa forme sulfatée (DHEAS), qui jouent principalement un rôle de précurseur dans la synthèse des androgènes. La testostérone provient, dans un premier temps, de la transformation du DHEA en androstenedione par la 3 β -hydroxy-stéroïde déshydrogénase (3 β HSD). Enfin,

l'androstenedione est transformée en testostérone par la 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17β -HSD) (1,3). La testostérone est produite en faible quantité chez la femme via la conversion des précurseurs dans les tissus périphériques, tandis que chez l'homme, elle est principalement produite par les testicules.

1.1.4 L'axe Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien

La synthèse des glucocorticoïdes, plus particulièrement du cortisol, est due à aux stimulations des différentes hormones sur leurs glandes endocrines respectives (CRH sur l'hypophyse et ACTH sur la surrénale), de l'axe Hypothalamus-Hypophyse-Surrénale (HHS) (Figure 3).

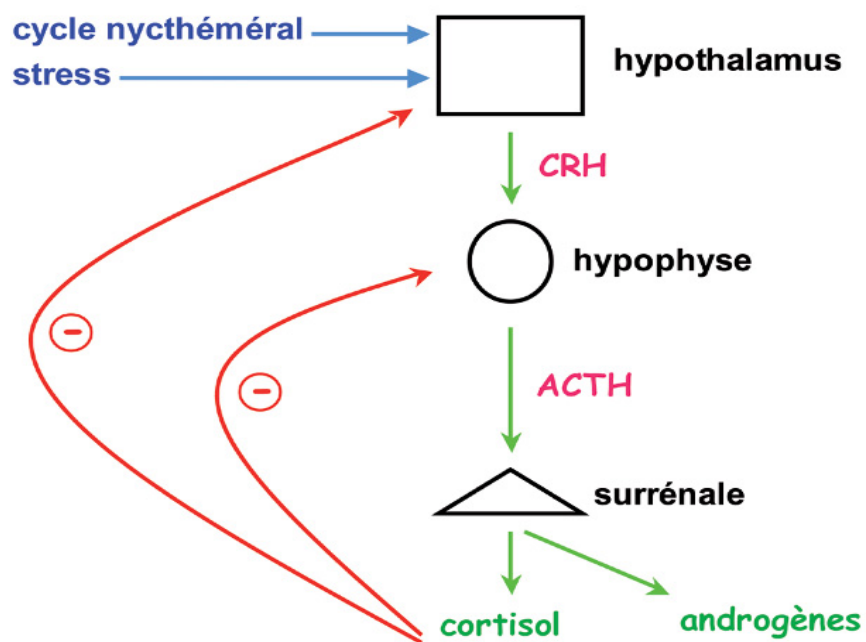


Figure 3 : Axe Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien (tiré de Fulla Y. et al. (3))

En réponse au stress, l'hypothalamus est stimulé, sécrétant une hormone hypothalamique, la corticolibérine ou hormone de relâche de la corticotropine (CRH) et la vasopressine (AVP) en plus faible quantité. Ces deux hormones vont entraîner la relâche de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH), par le lobe antérieur de l'hypophyse. Cette relâche d'ACTH est surtout sous le contrôle de la CRH et moins sous celui de l'AVP. L'ACTH va à son tour agir sur une glande endocrine, les glandes surrénales et plus précisément le cortex surrénalien, entraînant la relâche de cortisol. Cette stimulation et cette production de glucocorticoïdes se fait de façon pulsatile et suivant un rythme nyctéméral (3,4). L'augmentation du taux de glucocorticoïdes produits par les surrénales jouent un rôle de rétrocontrôle négatif aux niveaux de l'hypophyse et de l'hypothalamus, entraînant une diminution de la production d'ACTH, CRH et de vasopressine respectivement (Figure 3).

1.2 Les Pathologies de la Glande Surrénale

1.2.1 Syndrome de Cushing

1.2.1.1 Historique de la Pathologie

Le Syndrome de Cushing (SC) a été décrit pour la première fois par Harvey Cushing en 1912, chez une femme de 23 ans d'origine russe, souffrant de divers symptômes comme un gain de poids, faiblesse musculaire, des douleurs dorsales, des menstruations irrégulières, un visage large et rond avec une hypertrichose et l'hyperpigmentation, un ventre énorme, une diminution du champ visuel et de l'hypertension. Il est pensé à ce moment que l'hypercorticisme est du à un trouble poly-

glandulaire qui pourrait impliquer l'hypophyse, la glande pinéale, glande thyroïde et les glandes surrénales. Après une surrénalectomie de la patiente, il a été constaté que son état de santé était meilleur avec une diminution de la pression artérielle et du poids (5).

1.2.1.2 Étiologies de la Pathologie

Le Syndrome de Cushing défini de façon simple est secondaire à une exposition chronique des tissus à des doses élevées de glucocorticoïdes et se différencie par sa dépendance ou non à l'ACTH (6). Les causes du Syndrome de Cushing peuvent être multiples, venant d'une origine exogène (prise de glucocorticoïdes par médication) ou endogène. L'origine endogène peut provenir de diverses raisons, allant des tumeurs hypophysaires ou surrénaliennes jusqu'aux sources de CRH ou d'ACTH ectopiques. Les étiologies du Syndrome de Cushing sont décrites dans le Tableau 1.

Tableau 1 : *Étiologies du Syndrome de Cushing*

	Fréquence ⁽³⁾	Femme : Homme ⁽⁶⁾
ACTH-Dépendant	≈ 85 %	
Maladie de Cushing (<i>Adénome hypophysaire</i>)	80-85 %	3.5 : 1.5
Syndrome ACTH ectopique	10-15 %	1 : 1
Hyperplasie diffuse des cellules corticotropes	rare	5 : 1
ACTH-Indépendant	≈ 15 %	
Adénome surrénalien	60 %	4 : 1
Carcinome surrénalien	40 %	1 : 1
Hyperplasies macronodulaires (AIMAH)	< 1 %	1 : 1
Dysplasies micronodulaires (PPNAD)	< 1 %	1 : 1

1.2.1.3 Syndrome de Cushing ACTH-Dépendant

Le Syndrome de Cushing ACTH-Dépendant est dû à une production excessive d'ACTH et représente environ 85 % des personnes atteintes par le SC (Tableau 1). Dans 80 à 85 % des cas, il s'agit d'une source hypophysaire avec adénome corticotrope (ou Maladie de Cushing), entraînant une production excessive de glucocorticoïdes (hypercorticisme) et induisant une hyperplasie bilatérale des surrénales (3). Le rétro-contrôle négatif au niveau de l'hypophyse est réduit, tandis qu'il s'exerce toujours au niveau de l'hypothalamus entraînant une diminution de sécrétion et de ce fait un faible taux du CRH.

L'hypercorticisme peut résulter aussi d'autres sources excessives d'ACTH, ou de CRH venant de tumeurs les sécrétant, ne se trouvant pas nécessairement au niveau de l'hypothalamus ou de l'hypophyse mais plutôt d'autres tumeurs bénignes ou malignes pulmonaires ou bronchiques, ou encore de tumeurs endocrines provenant d'autres organes comme les phéochromocytomes par exemple (6).

1.2.1.4 Syndrome de Cushing ACTH-Indépendant

Le Syndrome de Cushing ACTH-Indépendant, représentant environ 15 % des personnes atteintes par le SC, est causé par des tumeurs corticosurrénales, entraînant une production excessive de glucocorticoïdes (Tableau 1). Ce hypercorticisme exerce un puissant rétro-contrôle négatif et de ce fait une suppression du taux de la CRH et de l'ACTH (3). Il existe divers types de tumeurs au niveau des glandes surrénales, comme les adénomes ou carcinomes surrénaux en majorité ou des hyperplasies macronodulaires bilatérales (AIMAH) (6).

1.2.2 Tumeurs du Cortex Surrénalien

Il existe diverses formes de tumeurs du cortex surrénalien, certaines pouvant être bénignes (adénomes) tandis que d'autres sont malignes (carcinomes). Les tumeurs du cortex surrénalien sont assez fréquentes (1,4-8.7 % de la population générale) et à majorité peu ou non sécrétantes. Dans les tumeurs sécrétantes, il y a production de stéroïdes qui sont relâchées et produisent un syndrome clinique selon le stéroïde produit. Ceci se rencontre dans les syndromes de Cushing, les phéochromocytomes ou bien les hyperaldostéronismes primaires (7). En contre partie, certaines tumeurs sont découvertes, de façon inattendue, par des techniques d'imagerie, du fait que ces tumeurs sont bénignes et non-sécrétantes: les incidentalomes (8, 9). Environ 80% des incidentalomes sont bénins et non-sécrétant, et sont retrouvés de façon majoritaire unilatéralement du côté droit, tandis qu'environ 10% sont bilatérales (9, 61).

Tableau 2 : *Fréquence des incidentalomes surrénaux (9)*

Type de tumeurs	Fréquence
Adénomes surrénaux non sécrétant	73,9 %
Tumeurs sécrétantes	
Adénomes sécrétant du cortisol	7 %
Adénomes sécrétant de l'aldostérone	1,2 %
Phéochromocytomes	4,7 %
Carcinomes surrénaux primaire	4,8 %

1.2.2.1 Tumeurs sécrétant du cortisol

Ces types de tumeurs sont caractérisés par la production ACTH-indépendante de glucocorticoïdes et sont l'anomalie la plus commune des anomalies hormonales détectées chez des patients possédants des tumeurs du cortex surrénalien (41). Les taux de cortisol qui en résulte peuvent varier de faibles (sécrétion subclinique) à très élevés, ce qui peut entraîner les différents symptômes retrouvés chez les patients atteints par le Syndrome de Cushing.

1.2.2.2 Tumeurs sécrétant de l'aldostérone

Ces types de tumeurs sont assez courants, 5-10 % des cas d'hypertension artérielle, et sécrètent de façon indépendante de la rénine et de l'angiotensine II un excès d'aldostérone, qui cause l'aldostéronisme primaire. Il existe différentes sortes de tumeurs causant l'hyperaldostéronisme primaire; la cause première est due aux adénomes ou aux hyperplasies de la zone glomérulée surrénalienne. Très rarement, cette sécrétion anormale d'aldostérone est due aux carcinomes du cortex surrénalien (7, 69).

1.2.2.3 Hyperplasies surrénaliennes macronodulaires

Cette partie sera traitée plus en détails dans la section II.3 compte tenu du fait que cette pathologie est le sujet principal du projet de recherche.

1.2.2.4 Syndromes de tumeurs héréditaires

Les tumeurs du cortex surrénalien peuvent faire partie de syndromes de tumeurs héréditaires. Les gènes responsables de ces syndromes ont également été impliqués dans la tumorigénèse de certaines tumeurs sporadiques du cortex surrénalien (10).

1.2.2.4.1 Syndrome de Li-Fraumeni

Le Syndrome de Li-Fraumeni (LFS) est une maladie autosomique dominante familiale caractérisée par l'apparition précoce de tumeurs multiples chez les individus affectés. Les familles avec ce syndrome ont également plusieurs membres de la famille affectés. Les types de tumeurs les plus fréquentes qui se produisent dans le LFS sont des sarcomes des tissus mous, les ostéosarcomes, les cancers du sein, des tumeurs du cerveau, des leucémies et des cancers du cortex surrénalien (ACC). Les ACC ont été rapportés chez 3 à 4% des patients atteints du LFS (Tableau 3), souvent avant l'âge de 20 ans. De plus, il a été constaté que 70 % des cas de LFS sont le résultat d'une mutation germinale du gène *TP53*. Le gène *TP53*, qui est un suppresseur de tumeurs, code pour une protéine p53 impliquée dans le contrôle de la régulation cellulaire, la réparation de l'ADN, ainsi que la sénescence (75). Une autre variante de ce syndrome est causée par une mutation germinale hétérozygote dans le gène *hCHK2*, qui code pour une « kinase checkpoint » dont l'activation en réponse aux dommages à l'ADN empêche l'entrée cellulaire en mitose (10, 11, 12).

1.2.2.4.2 Syndrome de Beckwith-Wiedemann

Le Syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) est une maladie génétique de croissance excessive congénitale, caractérisée par une grosse langue (macroglossie), une hypertrophie des organes, une omphalocèle, une prédisposition à développer des tumeurs chez l'enfant, des anomalies des oreilles et des hypoglycémies. Ces tumeurs comprennent les cancers du cortex surrénalien (ACC), les néphroblastomes, les hépatoblastomes et surviennent dans

5% des patients (Tableau 3). Environ 15% des cas de BWS sont familiaux. Le BWS est lié au locus chromosomique 11p15. Cette région est soumise à des expressions caractérisées selon les allèles des parents, un phénomène génétique dans lequel les gènes spécifiques sont exprimés exclusivement soit de l'allèle maternel ou paternel ; on parle d'empreinte parentale. Les gènes situés sur le locus 11p15 et impliqué dans la pathogénie des BWS sont les gènes du facteur de croissance insuline-like 2 (*IGF2*), *H19* et l'inhibiteur de kinase cycline-dépendantes 1C (*CDKN1C*). Les gènes de ce locus n'expriment qu'un des allèles (maternel ou paternel). *IGF2* est exprimé par le père, alors que *H19* et *CDKN1C* sont exprimés par la mère (10, 13).

1.2.2.4.3 Complexe de Carney

Le Complexe de Carney (CNC) est un syndrome héréditaire dominant caractérisé par des tumeurs cardiaques, endocriniennes, cutanées et des neurones, ainsi que par des lésions pigmentées de la peau et de la muqueuse. L'hyperplasie micronodulaire pigmentaire des glandes surrénales (PPNAD) est une des principales manifestations du CNC et est une cause rare du Syndrome de Cushing ACTH-indépendante pouvant être retrouvée chez les enfants et les adultes. Il existe deux types de CNC: une causée par mutation du gène de la sous-unité régulatrice 1 α de la protéine kinase A (*PRKARIA*), situé sur le locus 17q23-q24, tandis que l'autre type est attribué au locus 2p16 (Tableau 3). De plus, il a été montré que des mutations des phosphodiésterases (*PDE11A* et *PDE8B*) ont été retrouvées chez des cas familiaux de patients atteints d'hyperplasie surrénalienne avec syndrome de Cushing, mais aussi chez des patients atteints de PPNAD (10, 14, 58).

1.2.2.4.4 Syndrome des néoplasies endocrines multiples de type 1

Le Syndrome de néoplasies endocrines multiples de type 1 (MEN1) est un syndrome autosomique dominant caractérisé par l'apparition d'une combinaison de plusieurs tumeurs endocriniennes et des lésions non-endocrines. MEN1 est diagnostiqué par l'association d'au moins deux des trois principales tumeurs endocrines liées à MEN1: adénomes de la parathyroïde, tumeurs endocriniennes des îlots de Langerhans du pancréas ou du tractus digestif et tumeurs de l'hypophyse antérieure. La majorité des cas (90%) sont familiaux et se présentent avec une transmission autosomique dominante. Le gène *MEN1*, situé sur le locus 11q13, code pour la protéine ménine et est un gène suppresseur de tumeur. Les mutations du gène, identifiées dans 80 à 90% des cas de MEN1, entraînent la perte de sa fonction (10, 15).

1.2.2.4.5 Hyperplasies surrénaliennes congénitales

L'hyperplasie congénitale des surrénales (CAH) est une maladie autosomique récessive résultant d'un déficit enzymatique dans la voie de synthèse de cortisol. L'anomalie la plus fréquente résulte d'altérations fonctionnelles de l'enzyme 21-hydroxylase, qui est codée par le cytochrome P450 (*CYP21B*). Les déficits en 11 β -hydroxylase (*CYP11B1*), 17 α -hydroxylase (*CYP17*), et 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) sont moins souvent la cause de CAH. L'absence de ces enzymes résulte en une diminution des niveaux de cortisol et à une stimulation compensatoire du cortex surrénalien par l'hormone de relâche corticotrophine (CRH) et l'ACTH avec une hyperplasie surrénale parfois nodulaire et surproduction des précurseurs de cortisol (10, 16).

1.2.2.4.6 Syndrome de McCune-Albright

Le Syndrome de McCune Albright (MAS) est une maladie génétique pédiatrique due à l'activation de mutations somatiques du gène « guanine nucleotidebinding protein, alpha-stimulating activity polypeptide » (*GNAS*), situé sur le locus 20q13.2. *GNAS* code pour la sous-unité alpha la protéine stimulatrice G (Gs). Lorsque la Gs est anormale, il y a une substitution de l'arginine 201 avec une histidine ou une cystéine, entraînant une baisse du niveau de l'activité GTPase, ce qui résulte en l'activation de l'adénylate cyclase et de ce fait la voie de signalisation de l'AMPc. Le MAS est une maladie sporadique qui affecte principalement le squelette, la peau et le système endocrinien (10, 17).

Tableau 3 : *Syndromes de tumeurs héréditaires associés aux tumeurs corticosurrénales (10)*

Syndrome de tumeurs héréditaire	Gène (locus chromosomal)	Prévalence des tumeurs surrénaliennes
Li-Fraumeni	<i>TP53</i> (17p13), <i>hCHK2</i> (22q12.1), 1q23	ACC, 3-4 %
Beckwith-Wiedemann	<i>IGF2</i> , <i>H19</i> , <i>CDKN1C</i> , <i>KCNQ1</i> (11p15)	ACC, 5 %
Complexe de Carney	<i>PRKARIA</i> (17q23-q24), 2p16	PPNAD, 90%–100%
Néoplasies endocrines multiples	<i>MEN1</i> (11q13)	ACT, 55 % ; ACC, rare
Hyperplasies surrénaliennes congénitales	<i>CYP21B</i> (6p21.3), <i>CYP11B</i> , <i>CYP17A</i> , <i>HSD3B2</i>	Tumeurs surrénales, 82 % ; Hyperplasie, 100%

1.3 Hyperplasies Surréaliennes Macronodulaires ACTH-Indépendantes

1.3.1 Pathologie

Le premier cas d'AIMAH a été décrit en 1964 par Kirshner et al. (18, 21). Les hyperplasies surréaliennes macronodulaires bilatérales ACTH-indépendantes (AIMAH) sont une cause rare du Syndrome de Cushing, dans lequel les signes cliniques se manifestent généralement qu'après la cinquième ou sixième décennie de vie. Les patients atteints d'AIMAH sont identifiés suite à une découverte radiologique ou à la découverte d'un syndrome de sécrétion excessive des surrénales. Cette forme d'hyperplasie surréalienne peut être caractérisée par différents états de la pathologie, la plus commune étant sub-clinique, suivi par les SC cliniques. Les cas désignés comme cliniques possèdent des signes comparables avec ceux du SC. Le taux d'ACTH plasmatique diminue progressivement jusqu'à sa suppression lorsque la production de cortisol est très élevée. Les cas définis comme sub-cliniques se caractérisent par l'absence des signes cliniques caractéristiques du SC (19, 20).

Dans cette pathologie ACTH-indépendante, dans laquelle l'ACTH est supprimée, le mécanisme de production de cortisol était caractérisé par un processus inconnu jusqu'à ce que les travaux de plusieurs groupes aient démontré que la sécrétion du cortisol dans la plupart des patients avec AIMAH était régulée par d'autres hormones différentes de l'ACTH (19, 20, 22). Cette sécrétion se fait par l'expression aberrante de plusieurs récepteurs hormonaux, liés à la membrane. L'expression aberrante d'un ou plusieurs de ces

récepteurs (récepteurs couplés aux protéines G) au niveau des surrénales peut conduire à la prolifération cellulaire et la régulation anormale de la stéroïdogénèse. Bien que les AIMAH aient été rapportés comme des cas sporadiques, plusieurs cas familiaux d'AIMAH ont été rapportés depuis peu. Au niveau génétique, il semblerait que ces formes familiales présentent une transmission autosomique dominante, mais les gènes responsables de ces AIMAH n'ont pas été identifiés (25, 30, 44, 45). De plus, au sein des divers individus atteints d'une même famille, il a été retrouvé qu'ils possèdent tous le même type de récepteurs hormonaux aberrants (18).

1.3.2 Récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Comme mentionné précédemment, différents récepteurs sont exprimés au niveau des tumeurs surrénales, jouant un rôle de stimulateur au même titre que l'ACTH, entraînant ainsi la sécrétion du cortisol. Ils appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires.

1.3.2.1 Catécholamines

La première fois que l'expression aberrante des récepteurs β -adrénergique au niveau des surrénales a été rapporté, il s'agissait d'un patient atteint d'AIMAH et SC (20). La sécrétion de cortisol et d'aldostérone de ce patient augmentait en réponse à des modifications endogènes des taux de catécholamines (posture debout, l'hypoglycémie induite par l'insuline ou par l'exercice). L'administration d'isoprotérénol, qui est un agoniste spécifique pour les récepteurs bêta-adrénergique, a entraîné la sécrétion de cortisol chez ce patient mais pas chez des sujets sains (18, 19, 20). La régulation du cortisol par des

agonistes béta-adrénergiques a été identifiée chez d'autres cas de Cushing ACTH-indépendant atteints d'AIMAH ou d'adénome unilatéral. De plus, il a été démontré que ces récepteurs étaient retrouvés au sein de plusieurs membres atteints d'une même famille. Ces récepteurs béta-adrénergiques (caractéristique des catécholamines) étaient exprimés de façon simultanée avec d'autres types de récepteurs aberrants incluant vasopressine ou encore sérotonine (23, 24, 25).

Les récepteurs des catécholamines, représentés par les récepteurs adrénergiques (α et β) sont donc présents au niveau des glandes surrénales. La sécrétion des catécholamines est régulée par les récepteurs α_2 -adrénergique (jouant un rôle dans l'inhibition de leur sécrétion) et les récepteurs β -adrénergique (jouant un rôle dans l'augmentation). Leur fonction est régulée par la famille des kinases GPCR (GRKs). Les GRKs phosphorylent les récepteurs adrénergiques, entraînant la liaison de la β -arrestine au récepteur, empêchant ainsi la sous-unité $G\alpha$ de se lier et donc au récepteur de fonctionner (70, 71).

1.3.2.2 Sérotonine

La sérotonine (ou 5-Hydroxy-Triptamine ou 5-HT) est un neurotransmetteur qui, également retrouvée en dehors du système nerveux central, est impliquée dans plusieurs processus biologiques tels que la fonction cardiovasculaire, la motilité intestinale ou encore le contrôle de la vessie (26). La sérotonine joue un rôle essentiel dans la régulation de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale et est surtout impliquée dans la stimulation de la sécrétion de l'ACTH lors de stress (27). De plus, il a été montré en particulier qu'au niveau de la glande surrénale normale, les agonistes des récepteurs 5-HT₄ sont de puissants

stimulateurs de la sécrétion d'aldostérone mais n'affectent que très peu la sécrétion de cortisol in vitro (19, 27). Au niveau des AIMAH, il a été montré que diverses formes de ce récepteur (5-HT4 et 5-HT7) étaient surexprimées aussi bien chez des cas sporadiques que dans des cas familiaux (28, 29, 30).

1.3.2.3 Vasopressine

Il existe trois sortes de récepteurs vasopressine, qui sont V1, V2 et V3. Il a été montré que le récepteur V3 stimule la sécrétion d'ACTH dans l'axe HHS. Le récepteur V1 est exprimé normalement au sein du cortex surrénalien et entraîne une petite augmentation de la production de stéroïdes in vitro, mais pas in vivo (18, 19, 31, 32). Chez des patients atteints d'AIMAH, il a été constaté fréquemment une surexpression ou une réponse exagérée du récepteur V1; par ailleurs une expression ectopique des récepteurs vasopressine V2 et V3 étaient plus rares, mais la stimulation par agonistes V2 (dDAVP) n'a pas été réalisée in vivo ou n'a pas entraîné la sécrétion de cortisol chez ces individus. Ces descriptions se sont limitées à des études de Rt-PCR, et la présence d'ARNm ne confirme pas la fonctionnalité (30, 33).

1.3.2.4 Angiotensine

Il a été montré une hypersensibilité des surrénales au récepteur angiotensine-II (AT-1) chez un patient atteint d'AIMAH et de syndrome de Cushing, qui démontrait une forte augmentation de l'aldostérone et du cortisol plasmatique lorsqu'il se tenait debout (19, 34). De plus, il a été démontré dans une autre étude que l'administration d'un antagoniste des récepteurs angiotensine de type 1 éliminait la stimulation des hormones surrénaliennes (35).

Enfin, il est à noter que le récepteur angiotensine-II de type 1 semble être exprimé et caractéristique des adénomes surrenaliens sécrétant de l'aldostérone (7, 34).

1.3.2.5 LH/hCG

Le récepteur LH/hCG (pour Hormone lutéale/Hormone chorionique gonadotropique humaine) possède comme fonction principale un rôle dans la régulation ovarienne et testiculaire. L'expression de ce récepteur a été démontrée dans plusieurs tissus humains fœtaux, y compris le cortex surrenalien, rein, foie, pancréas, poumon, intestin grêle. Dans le cortex surrenalien normal, le récepteur est exprimé dans la zone réticulée et l'hormone hCG stimule la production de sulfate de déhydroépiandrostérone dans le fœtus mais pas dans les cellules de surrénales adultes (20, 36, 37, 38).

Le premier cas de ce récepteur illicite fut chez une femme atteinte du Syndrome de Cushing transitoire au cours de grossesses successives, caractérisée par un hypercorticisme secondaire à l'expression aberrante du récepteur LH/hCG récepteurs dans son AIMAH qui s'est développée après la ménopause alors que ses niveaux de LH étaient élevés de façon soutenue (39). Il a été rapporté chez cette patiente, que le récepteur LH/hCG était présent dans une forme non mutée et que son expression n'a pas été augmentée par rapport au tissu surrenalien normal (20, 39).

1.3.2.6 GIP

Le récepteur du peptide inhibiteur gastrique (GIPR), tout comme les récepteurs décrits précédemment, a été retrouvé chez des patients atteints d'AIMAH et a été décrit pour la première fois chez une patiente de 41 ans atteinte du Syndrome de Cushing (40). Ce

récepteur est connu comme étant un récepteur glucose-dépendant ou « nourriture-dépendant ». Le GIP est une hormone gastro-intestinale, relâchée par des cellules du duodénum et de l'intestin grêle après ingestion de nourriture (20, 23). Le SC GIP-dépendant peut se produire chez les patients atteints AIMAH et adénomes unilatéraux. Les patients atteints de SC GIP-dépendant présentent de faibles niveaux de cortisol plasmatique à jeun qui augmentent après les repas, malgré la suppression de l'ACTH (19, 20). Il a été montré dans diverses études que les Syndromes de Cushing GIP-dépendent sont dus à la surexpression surrénalienne du GIPR au niveau des adénomes surrénaliens ou les hyperplasies surrénaliennes par rapport aux cortex surrénaliens fœtaux et adultes normaux (40, 41, 42).

1.3.3 Facteurs de régulation de l'expression des RCPG

Les mécanismes moléculaires conduisant à l'expression aberrante de récepteurs eutopiques ou ectopiques dans le cortex surrénalien des patients atteints d'AIMAH ou d'adénomes surrénaliens unilatéraux ne sont pas élucidés à date, malgré plusieurs hypothèses qui ont été avancées.

La régulation hormonale de la fonction du cortex surrénalien nécessite une expression tissu spécifique de récepteurs hormonaux appropriés. Ceci implique l'existence de mécanismes de régulation qui incluent des éléments régulateurs agissant en *cis*, comme les promoteurs, mais aussi d'autres facteurs (*trans*) comme les facteurs de transcription, co-activateurs ou co-répresseurs pour ces récepteurs. Des recherches sur le récepteur GIP dans des cas de syndrome de Cushing exprimant ce type de récepteur ont été réalisées afin de

trouver des mutations pouvant expliquer l'expression aberrante au niveau des tissus. Les résultats n'ont pas montré de mutation ou de polymorphisme dans la région régulatrice du gène codant pour le récepteur GIP dans ces cas pathologique (20, 62). Au sein des AIMAH, il a déjà été mentionné que divers récepteurs couplés aux protéines G étaient exprimés. Il a été montré que des facteurs de transcription régulaient l'expression de ces récepteurs au niveau des différentes zones du cortex surrénalien, en particulier que le promoteur du gène récepteur GIP (GIPR) est sans boîte TATA et qu'il contient de multiples sites de liaison Sp1/Sp3, qui semblent être impliqués dans l'expression basale du récepteur cellulaire (62, 66). L'étude de l'analyse de facteurs de transcription (Sp1/Sp3) nécessaire à l'expression du récepteur GIP n'a montré aucune anomalie spécifique (20).

Pour ce qui est des récepteurs caractéristiques de la famille à l'étude (β -adrénergiques et V1-vasopressine), ces derniers n'ont pas été étudiés au sein des AIMAH, contrairement au GIPR précédemment mentionné. Par contre, l'analyse des séquences du promoteur du récepteur β 3-adrénergique chez l'humain a révélé l'existence de plusieurs éléments *cis* dont NF-1, le GRE (Glucocorticoid Response Element), le NF- κ B et de la CRE (c-AMP Response Element). L'existence de la CRE dans le gène du récepteur β 3-adrénergique suggère qu'il peut être positivement ou négativement régulé par le produit final de la voie de transduction du signal de l'AMPc PKA-CREB (76). De plus, il a été mentionné que CREB et NF- κ B sont aussi des régulateurs positifs de la transcription du récepteur β 2-adrénergique (77). Enfin, il a été montré que le récepteur V1 (ou V1a) est couplé tout comme le récepteur V3 (ou V1b) à la phospholipase C (PLC). De plus, il est

mentionné que les facteurs responsables de la régulation du récepteur V1b impliqueront probablement les effets de la CRH et VP libérés dans la circulation portale hypophysaire au cours de l'augmentation de la sécrétion de glucocorticoïdes surrénaliens. Par l'analyse du gène, il a été identifié dans la région promotrice deux grands points d'initiation de la transcription putatifs (tsp). Il n'y a pas de boîte proximale TATA qui a été détectée, mais plusieurs sites protéine activateur (activator protein-1 ou AP1) et AP2, un groupe de sites Sp1 en amont des sites AP2 et un GRE ont été identifiés par analyse informatique. La région proximale du tsp contient deux éléments inhabituels dans les promoteurs des récepteurs couplés aux protéines G, soient de grandes étendues de répétitions CA (boîte CACA) et répétitions CT (inversé boîte GAGA) (78). Le récepteur V1a humain est situé sur le chromosome 12q14-15. Considérant qu'il n'existe pas de séquence dans le récepteur V1a humain de région flanquante 5' homologue à celle trouvée chez les campagnols des prairies, les humains ont trois séquences répétitives dans cette région qui sont polymorphes: Une répétition dinucléotidique (GT)₂₅, un complexe de répétition (CT)₄-TT-(CT)₈-(GT)₂₄ nommé (RS3) et une répétition tétranucléotidique (GATA)₁₄ nommé (RS1) (79).

1.3.4 Les cas Familiaux

Il a été rapporté dans la littérature que plusieurs cas de patients atteints d'AIMAH ne se limitaient pas seulement à un seul individu, mais à plusieurs membres d'une même famille. Ces cas familiaux sont caractérisés par une réponse à un ou plusieurs types de récepteurs aberrants. Quelques cas familiaux seulement sont présentés, mais l'ensemble des cas est résumé dans le tableau 4.

1.3.4.1 Cas #1

En 2005, un groupe Coréen a reporté un cas d'AIMAH familial constitué de 11 personnes, dans laquelle deux sœurs présentaient des symptômes caractéristiques du SC, tels que l'obésité, des vergetures pourpres sur l'abdomen ou encore un visage lunaire. Après des tests *in vivo* entre autre, il a été montré que ce cas familial était caractérisé par l'expression des récepteurs de la vasopressine V2 et V3 dans le cortex surrénalien (44).

1.3.4.2 Cas #2

En 2007, un groupe a rapporté en France un cas d'AIMAH familial constitué de sept membres, au sein de laquelle 4 membres ont répondu de façon positive à la présence de récepteurs aberrants au niveau des glandes surrénales. Ces quatre patients présentaient divers symptômes caractéristiques du SC. Ces cas familiaux sont caractérisés par une réponse aux récepteurs sérotonine 5-HT4 et des récepteurs vasopressine V1 et V2 (30).

1.3.4.3 Cas #3

En 1997, un homme âgé de 56 ans présentait des symptômes typiques du syndrome de Cushing, tandis que le CT (computed tomography) scan de son abdomen a révélé des hyperplasies macronodulaires surrénaliennes bilatérales non attendues. Il a été démontré par des tests *in vivo* (test de posture, administration d'agonistes et d'antagonistes β -adrénergique ainsi que vasopressine) et *in vitro* (étude de liaison par administration d'agonistes et d'antagonistes β -adrénergique ainsi que vasopressine) la présence des récepteurs des catécholamines β -adrénergique et de la vasopressine V1 au niveau des

tumeurs surrenaliennes, entraînant une production excessive de cortisol (22). Ainsi, un diagnostic de syndrome de Cushing ACTH-indépendant a été établi.

De plus, d'autres membres de cette famille (6 de la génération II et 16 de la génération III) ont subi divers tests (suppression du cortisol à la dexaméthasone (DST) ou protocole d'exploration hormonale) et les résultats ont été présentés en 2007 lors de l'Endocrine Society (44). Il semble que dix des membres de cette famille (4 de la génération II et 6 de la génération III) avaient un taux de cortisol anormal après le DST. Enfin, quatre patients (3 de la génération II et 1 de la génération III) ont subi des tests pour chercher la présence de récepteurs aberrants. Ils ont tous les quatre répondu par une élévation du taux de cortisol suite au test de la posture et à l'administration d'agoniste des récepteurs vasopressine et catécholamine. De ce fait, cette famille est caractérisée comme étant AIMAH répondant aux récepteurs β -adrénergiques et V1-Vasopressine (45). Cette famille est le cas qui est à l'étude de ce projet de recherche.

Tableau 4: Ensemble des cas d'AIMAH familiaux décrit dans la littérature (74)

Nombre de membres atteints	Lien de parenté	Recherche de récepteurs aberrants	Type(s) de récepteur(s)	Auteurs	Année de publication
2	Mère et fille	non	-	Findlay et al.	1993
4	2 sœurs et 2 frères	non	-	Minami et al.	1996
2	Mère et fils	oui	Vasopressine (V1b et V2) β -Adrénérique	Miyamura et al.	2002
7	3 générations	non	-	Nies et al.	2002
2	Mère et fils	oui	β -Adrénérique	Imöhl et al.	2002
2	Sœurs	oui	Vasopressine (V1b et V2)	Lee et al.	2005
4	Père et ses 3 enfants (1 fils et 2 filles)	oui	Sérotonine (5-HT4) Vasopressine (V1b et V2)	Vezzosi et al.	2007
3	Frères	oui	Vasopressine (V1a)	Gagliardi et al.	2009
3	Frères et sœur	non	-		
2	Père et fils	non	-		

1.3.5 Le rôle des SNPs

Au sein des maladies génétiques, il existe différents profils de transmission. Elles peuvent être catégorisées en maladies héréditaires multigéniques (cause génétique et environnementale) ou bien en maladies génétiques héréditaires monogéniques. Cette dernière classe se caractérise par une seule mutation d'un gène dont la transmission peut se produire de différentes façons : autosomale dominante, autosomale récessive, dominante liée au chromosome X, récessive liée au chromosome X ou encore mutations de l'ADN

mitochondrial. Il est connu que la pathologie étudiée ici est une maladie à transmission autosomale dominante, autrement dit un seul allèle muté (père ou mère) est suffisant pour transmettre la pathologie à sa descendance et pour qu'elle s'exprime.

Afin de trouver le(s) gène(s) en cause au sein d'une pathologie génétique rare, diverses techniques sont disponibles. Une approche est de localiser la ou les régions génomiques en cause en réalisant une étude d'association, qui permet d'identifier des marqueurs (SNPs ou Single Nucleotide Polymorphism) associés à la pathologie. Un SNP est une variation d'un seul nucléotide dans la séquence d'ADN se produisant entre deux individus de la même espèce. La technique utilisée pour réaliser cette étude est un « whole genome scan » ou un scan du génome. Ceci permet donc d'identifier une ou plusieurs régions se démarquant des autres, avec un profil différent selon les individus atteints et non atteints, par la forte présence de SNPs. Une fois cette première étape réalisée, il reste à sélectionner le(s) gène(s) pouvant être causal, au sein de ces régions chromosomiques d'intérêt. La connaissance de la pathologie au niveau moléculaire par les cliniciens joue un rôle de premier ordre dans le choix des gènes à vérifier. Il est possible aussi, dans la mesure où des échantillons tissulaires sont disponibles, de vérifier l'expression de ces gènes, étude du transcriptome, dans les tissus atteints par rapport aux tissus sains.

Dans notre projet nous avons comparé sujets sains et sujets atteints en utilisant à la fois une étude de liaison au niveau du génome ainsi qu'une étude du transcriptome du tissu surrénalien.

2. Projet de Recherche

2.1 Problématique

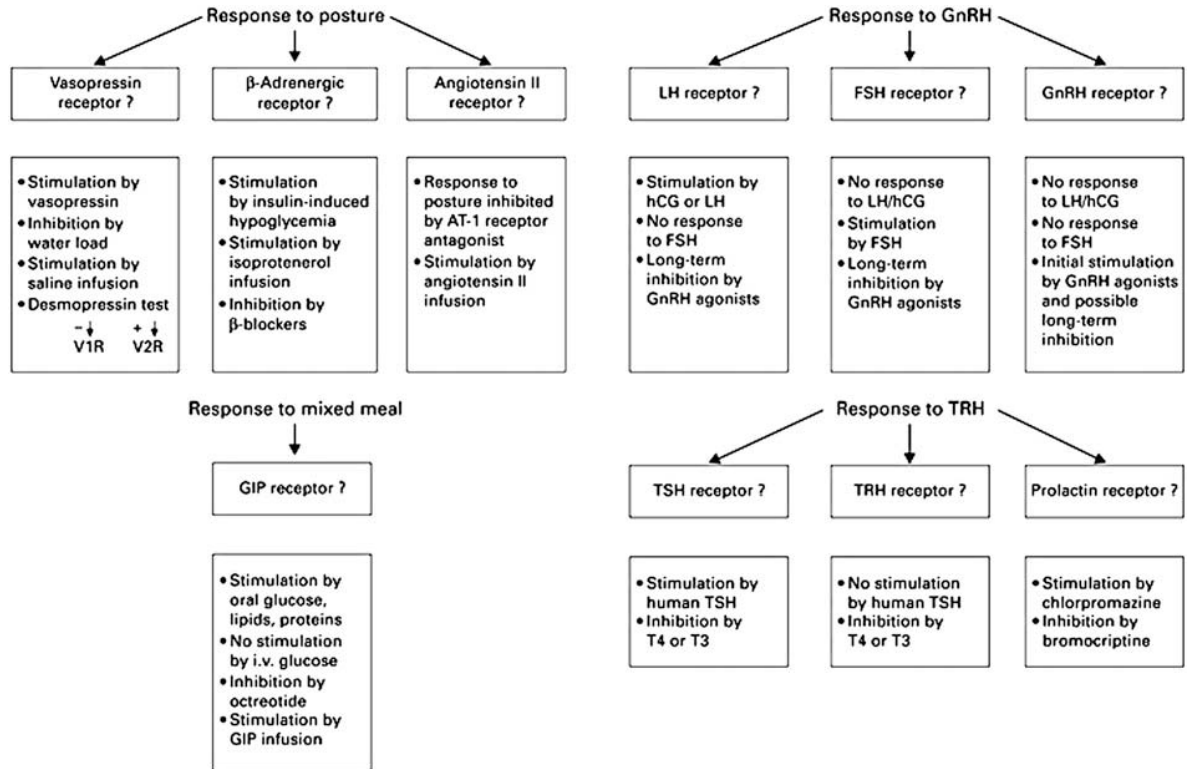
2.1.1 Pathologie

Le syndrome de Cushing (SC) ACTH-indépendant résulte d'une production excessive de glucocorticoïdes par des tumeurs du cortex surrénalien. La majorité des SC ACTH-indépendant avec hyperplasie macronodulaire bilatérale (AIMAH) est due à l'expression aberrante de divers récepteurs hormonaux (récepteurs couplés aux protéines G) au niveau du cortex surrénalien. Plusieurs cas familiaux d'AIMAH ont été rapportés et caractérisés par la présence de récepteurs aberrants; ils se présentent avec une transmission de type autosomal dominant. Les gènes responsables de cette expression cortico-surrénalienne de divers récepteurs illicites et du développement d'AIMAH familial n'ont pas encore été identifiés.

2.1.2 Cas Familial Étudié

Le dépistage de ce cas familial a donc débuté par le diagnostic d'un homme de 56 ans, tel que décrit dans la partie II.3.c. En se référant au protocole de tests dynamiques pour démontrer le type de récepteurs aberrant (Tableau 4), il a été démontré que ce patient était atteint d'un syndrome de Cushing dont la sécrétion de cortisol était dépendante des récepteurs β -adrénergique et de la vasopressine V1 (19, 22).

Tableau 5 : Protocole des tests dynamiques caractérisant les récepteurs aberrants (19)



Par la suite, un deuxième patient (frère du patient décrit précédemment) s'est présenté avec la même pathologie, ce qui a permis de justifier l'utilisation systématique du protocole de dépistage du syndrome de Cushing chez les autres membres de la famille, approuvé par le Comité d'éthique: test dexaméthasone 1 mg au coucher : anormal si cortisol > 50 nmol/L le lendemain matin. Ce test est fait chez tous les membres de cette famille âgés entre 18 et 70 ans ayant consenti au protocole. Dans le cas d'anomalie au test précédent, un CT-scan de l'abdomen est réalisé chez ce patient. Pour les sujets avec suppression anormale du cortisol et présentant une hyperplasie surrénalienne au CT-scan, le protocole des tests dynamiques est effectué afin de confirmer et caractériser les réponses aberrantes (19).

Parmi les membres de la famille, deux patients ont subi une intervention chirurgicale (surrénalectomie) : II-1 et III-4. L'ARN de ces tumeurs surrénaliennes a été utilisé pour réaliser l'expérience de Micropuce à ADN (voir Matériel et Méthodes). De plus, des prélèvements sanguins ont été effectués chez plusieurs membres de cette famille (figure 4, II-1, II-2, II-3, II-5, II-6, II-7, II-8, II-9, II-11, III-2, III-3, III-4, III-5, III-6, III-8, III-10, III-13, III-22, IV-9, IV-10, IV-11, IV-12 et IV-13) afin d'en extraire l'ADN lymphocytaire (voir Matériel et Méthodes) et de réaliser le séquençage des gènes candidats. Des diagnostics ont été posés au moment du prélèvement sanguin. Deux cas cliniques (II-1 et III-4), sept sous-cliniques (II-3, II-7, II-8, II-9, III-2, III-5 et III-10), un cas anormal (suppression anormale à la dexaméthasone, mais CT scan surrénalien encore normal, III-13), sept cas normaux (II-2, II-5, II-6, III-3, III-6, III-8 et III-22), cinq cas non-testés (IV-9, IV-10, IV-11, IV-12 et IV-13) et un cas qui est atteint d'un cancer surrénalien (II-11) ont été trouvés. Il faut noter que pour les personnes dites normales, certaines avaient un âge plutôt jeune par rapport à celui où la pathologie se déclare habituellement (50-60 ans) et donc ne sont pas encore complètement caractérisées cliniquement.

Symbol definitions	
○	Normal 1- <i>mg</i> DST
●	Clinical CG
○	Not Tested
○	Abnormal 1- <i>mg</i> DST
○	Sub-Clinical CG

AIMAH01 PEDIGREE

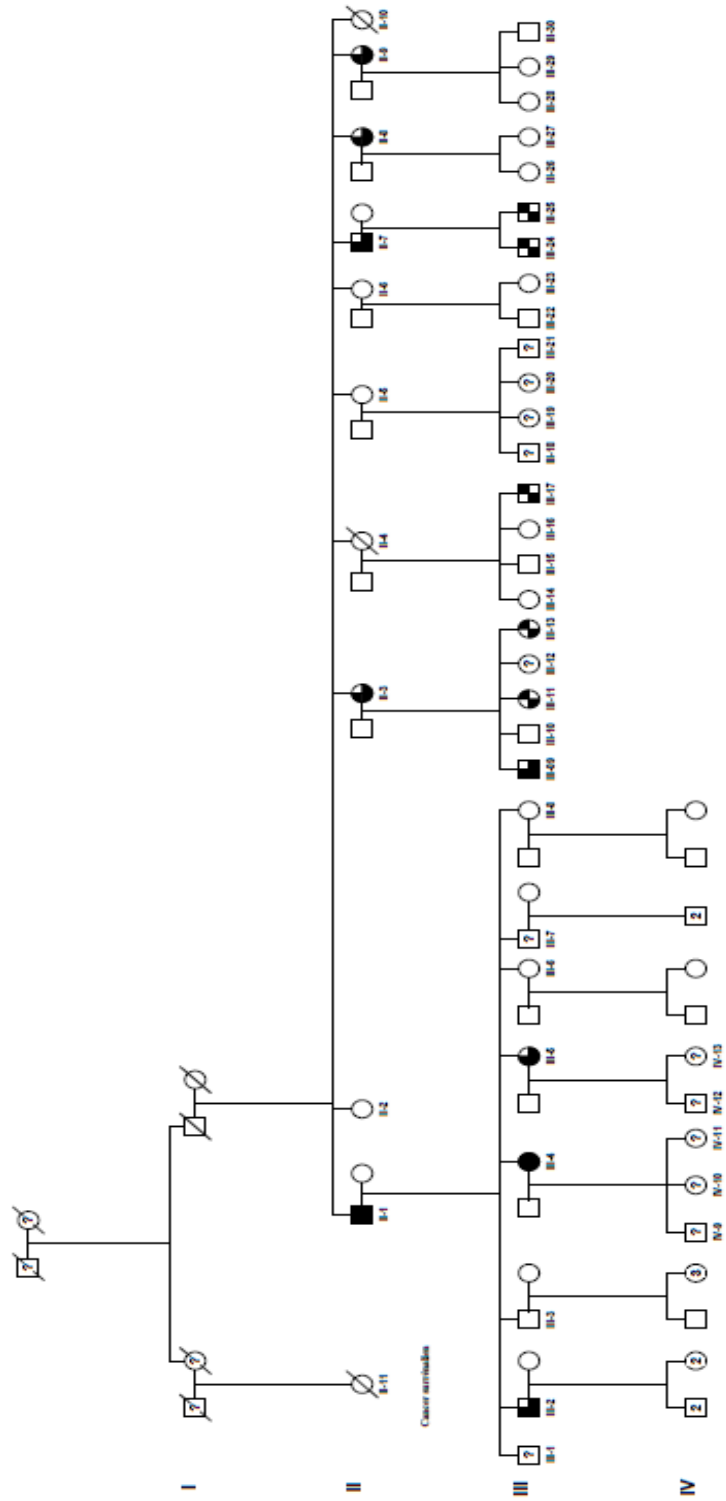


Figure 4 : Pedigree de la famille

2.2 Hypothèse et Objectifs

Le but de notre projet est d'identifier le(s) gène(s) responsable(s) de l'AIMAH avec récepteurs aberrants β -adrénergique et V1 vasopressine dans cette famille.

2.3 Matériel et Méthodes

2.3.1 Puce à SNP

Une étude de liaison, visant à identifier la ou les régions du génome comprenant le ou les gènes pouvant être en cause dans les AIMAH familiales, a été réalisée en utilisant l'ADN des membres d'une famille (10 atteints et 7 sains) originaire du Québec, atteinte d'AIMAH exprimant des récepteurs β -adrénergique et V1-vasopressine de façon aberrante. L'ADN génomique des différents membres de la famille a été extrait à partir des lymphocytes sur des échantillons de sang prélevés, suivant le consentement des patients. Cette étude a été réalisée à l'aide de la biopuce Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) contenant plus de 906600 SNPs (« Single Nucleotide Polymorphism » ou Polymorphisme d'un seul nucléotide) et 946000 sondes pour la détection des CNV (copy number variation), en suivant les recommandations du fabricant et les génotypes des SNPs ont été obtenus en utilisant l'algorithme Birdseed V2.

2.3.2 Micropuce à ADN

Une étude du transcriptome a été réalisée avec la biopuce HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) en suivant les recommandations du fabricant. Les ARNs utilisés pour l'analyse de micropuce à ADN proviennent des tumeurs de deux patients de la

famille (II-1 et III-4), ainsi que de tumeurs de divers patients atteints du syndrome de Cushing (2 AIMAH de patients atteints de la famille étudiée, 5 hyperplasies ACTH-dépendant, 4 AIMAH GIP-dépendant), ainsi que d'un pool de glandes surrénales (contrôle Clontech). Ces ARNs ont été obtenus en réalisant une extraction au réactif de TriZol (Invitrogen), suivie d'une purification sur colonne Qiagen. La qualité des ARNs a été vérifiée en utilisant le Bioanalyseur Agilent 2100. Les intensités des sondes des biopuces HG-U133 Plus 2.0 ont été normalisées avec l'algorithme MAS5.

2.3.3 Amplification des exons et Séquençage

Les séquences des amorces pour les différents exons des gènes candidats ont été obtenues en utilisant Primer 3 plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), en suivant les consignes données par Génome Québec. La taille des différentes amorces est comprise entre 18 et 24 nucléotides, les T_m entre 58° et 62°C et le taux en GC des amorces compris entre 40–60%. Les amplifications par PCR ont été réalisées avec la Taq Polymerase à 5 U/ μ l (Invitrogen). L'appareil utilisé est un thermocycleur Tpersonnal Combi (Biometra). Pour chaque exon, un volume réactionnel total de 50 μ l a été réalisé, en utilisant une quantité variable d'ADN (100-200 ng) et une concentration d'amorces de 10 μ M. Chaque produit amplifié a été vérifié sur gel d'agarose 1,5% avant d'être envoyé au service de séquençage (Génome Québec).

3. Résultats

3.1 Puce à SNP

Diverses régions chromosomiques entre les personnes atteintes et non-atteintes de la famille ont été soulignées. Un total de 707453 SNPs a été obtenu. Après analyse statistique, 159 SNPs significatifs (qui ont passé une valeur seuil suite à un test de Bonferroni) ont été mis en évidence entre les individus sains et les patients de la famille. Il a été constaté que la majorité de ces SNPs se situait sur les régions chromosomiques 1q32.1 et 16q12.2 (Figure 5). Nous avons pu constater pour chacun des ces SNPs, représentés par un numéro commençant par « rs », une dissociation qui ne ségrège pas de façon parfaitement nette entre différents individus sains et atteints de la famille selon leurs différents génotypes pour chaque SNPs. Les génotypes de chaque individu sont représentés en trois couleurs (rouge, jaune, bleu) selon leur forme homozygote ou hétérozygote (Figure 6 et 7).

SNPs et groupe de SNPs significatifs après correction Bonferroni ($p < 7.07 \times 10^{-8}$) pour les liaisons avec le sexe et l'âge comme covariables

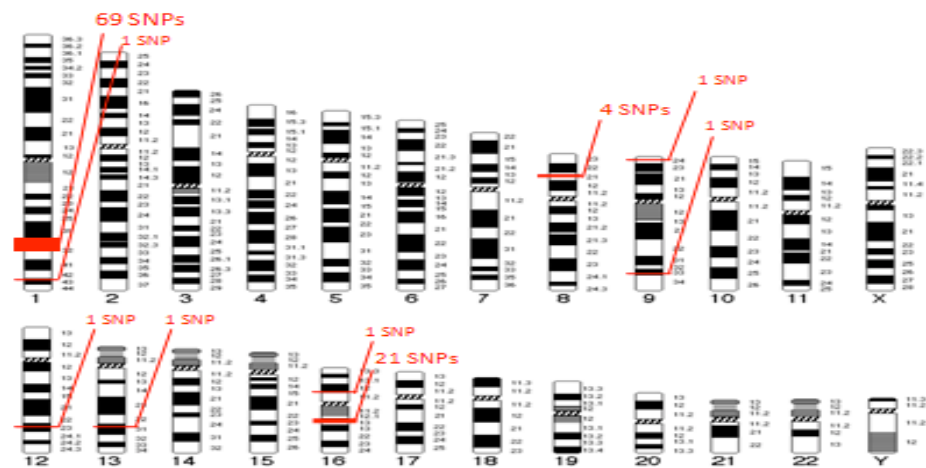


Figure 5 : Principaux SNPs répertoriés

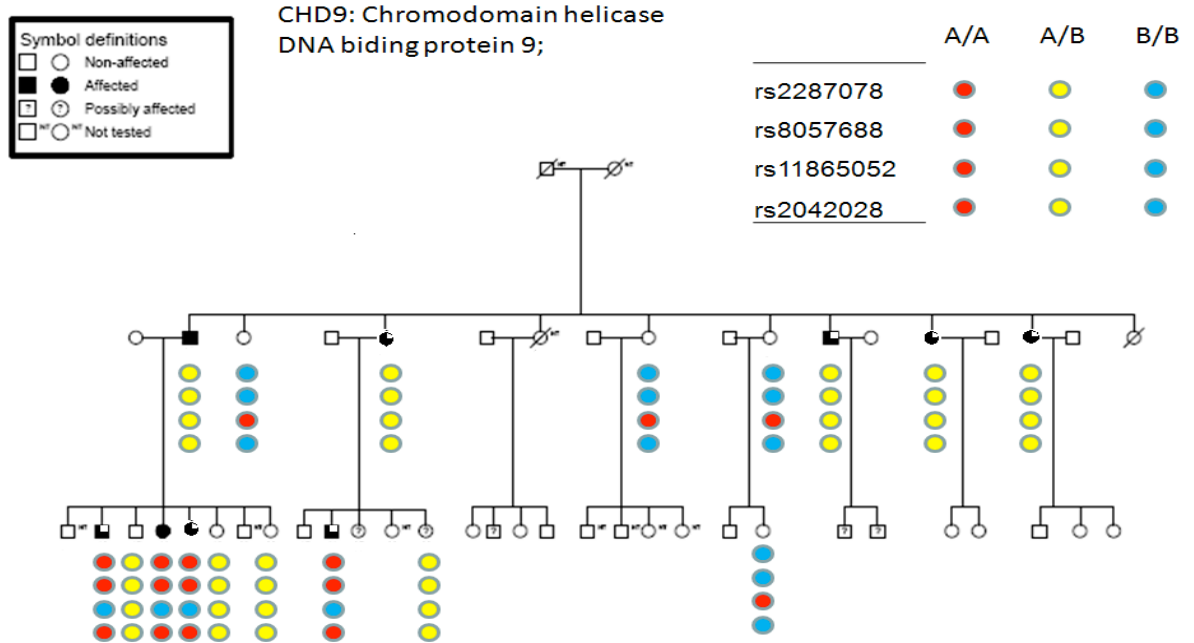


Figure 6 : Dissociation de certains SNPs du gène CHD9 situé dans la région 16q12.2 entre les individus sains et atteints

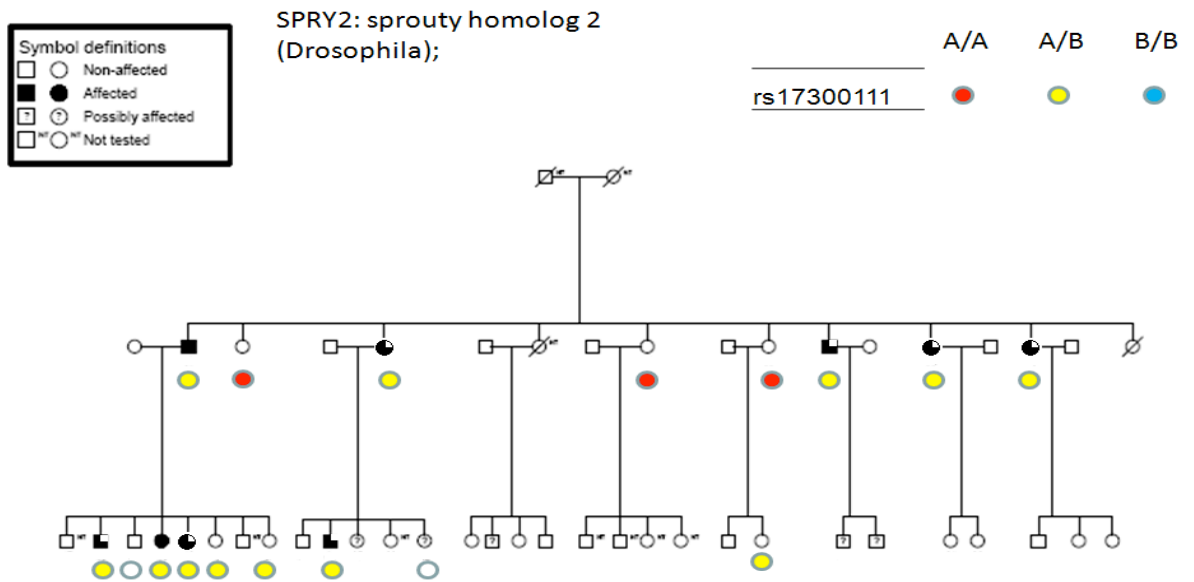


Figure 7 : Dissociation du SNP du gène SPRY2 situé sur la région 13q31.1 entre les individus sains et atteints

3.2 Micropuce à ADN

L'étude d'expression des gènes réalisée, à l'aide de la biopuce HG-U133 Plus 2.0 d'Affymetrix, utilisant l'ARN des tumeurs des patients II-1 et III-4 a permis d'obtenir une liste de 15 gènes candidats statistiquement différents entre les populations témoin et celles atteintes (11 surexprimés et 4 sous-exprimés), ayant passé une valeur seuil au test de Bonferroni. De plus, cette étude de micropuce à ADN a pu être utilisée comme complément à l'étude de puce à SNP, afin de choisir les gènes d'intérêts pour le séquençage. En effet, le fait de pouvoir bien dissocier les différents individus de la famille au niveau génotype pour chaque SNP, grâce à l'étude de puce à SNP, n'a pas été le seul critère de sélection de nos gènes. Ces premières données ont été analysées en les combinant aux niveaux d'expression, retrouvés dans les deux tumeurs par rapport au contrôle commercial utilisé, des différents gènes ressortis par cette étude.

3.3 Gènes Candidats

Nous avons combiné les analyses de l'étude du génome par la puce à SNPs ainsi que l'étude du transcriptome sur le tissu surrénalien. En utilisant ces informations, six gènes du chromosome 1 (*ATP2B4*, *PPP1R12B*, *SOX13*, *CACNAIS*, *ADORA1* et *PHLDA3*), un du chromosome 16 (*CHD9*) et un du chromosome 13 (*SPRY2*) inclus parmi ces 159 SNPs, ont été sélectionnés afin de rechercher la présence de mutations dans les parties codantes.

Pour cela, le séquençage de chaque exon a été fait, dans un premier temps, avec l'ADN d'un individu sain de sexe féminin (II-6) ainsi qu'un individu atteint de sexe

féminin (III-4). Lorsque les résultats montraient un changement nucléotidique (hétérozygote ou homozygote) entraînant une modification d'acide aminé chez le patient comparativement à l'individu sain, le séquençage était réalisé avec l'ADN d'un individu sain de sexe masculin (III-3) et un individu atteint de sexe masculin (II-1).

Pour chaque gène d'intérêt nous avons donc vérifié :

- par séquençage que les SNPs s'associaient à un changement nucléotidique
- à l'aide du chromatogramme que ce changement était homozygote ou hétérozygote
- que le changement de nucléotide est associé à un changement d'acide aminé
- que le changement observé est plus fréquent chez les sujets atteints que sains

Ces différentes étapes nous permettaient de parler de SNP pertinent.

3.3.1 *ATP2B4*

3.3.1.1 Fonction

Le gène *ATP2B4* (ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 4) est un des 4 gènes faisant partie d'une famille de pompes membranaires dépendant du calcium, les Ca(2+)-ATPases. Ces gènes codent pour des protéines qui permettent de pomper des ions calcium (Ca²⁺) du cytosol vers le milieu extracellulaire, dont *ATP2B4* (46). Il se situe sur la région 1q32.1 et est composé de 2 isoformes : le premier comporte 21 exons codants une protéine de 1170 acides aminés, tandis que le deuxième comporte 20 exons codants une protéine de 1205 acides aminés.

3.3.1.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 3 SNPs pour ce gène (SNP_A-2128383: p-value = 9,87E-025; SNP_A-8311293: p-value = 4,44E-008; SNP_A-8463435: p-value = 9,87E-025). Suite au séquençage de ce gène, des changements de nucléotides ont été rapportés dans plusieurs exons (exons 2, 3, 22).

Dans l'exon 2, nous avons identifié un changement à la position 203652444, chez le membre sain de la famille Sain #2 (III-3), et atteints E36 (II-1) et E196 (III-4) (Figure 8). Ce changement est déjà rapporté dans NCBI (rs1419114).

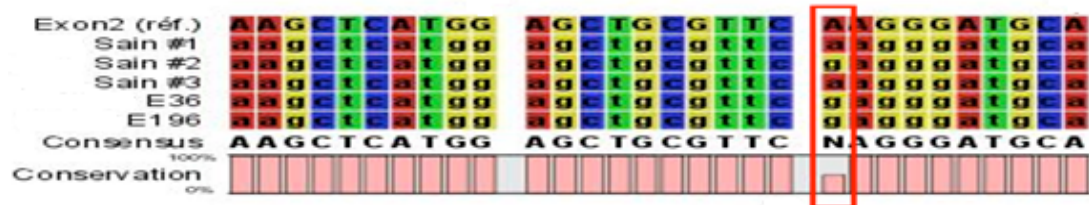


Figure 8 : Séquence nucléotidique exon 2 du gène *ATP2B4*

Nous constatons sur les chromatogrammes (Figure 9) que ce changement de nucléotide se caractérise par une homozygotie chez les trois individus, tandis que les individus Sain1 (II-6) et Sain3 (II-2) sont hétérozygotes. En ce qui concerne la lecture des chromatogrammes, chacun des pics représentent une succession de nucléotides formant la séquence nucléotidique de la région amplifiée, dans notre cas les exons de chaque gène. Ici nous n'avons représenté que la région « d'intérêt » où se trouve le changement de nucléotide. Il est intéressant de constater que chaque pic unique représente une homozygotie (III-3, III-4 et II-2), tandis qu'un double pic indique une hétérozygotie (individus II-6 et II-2).

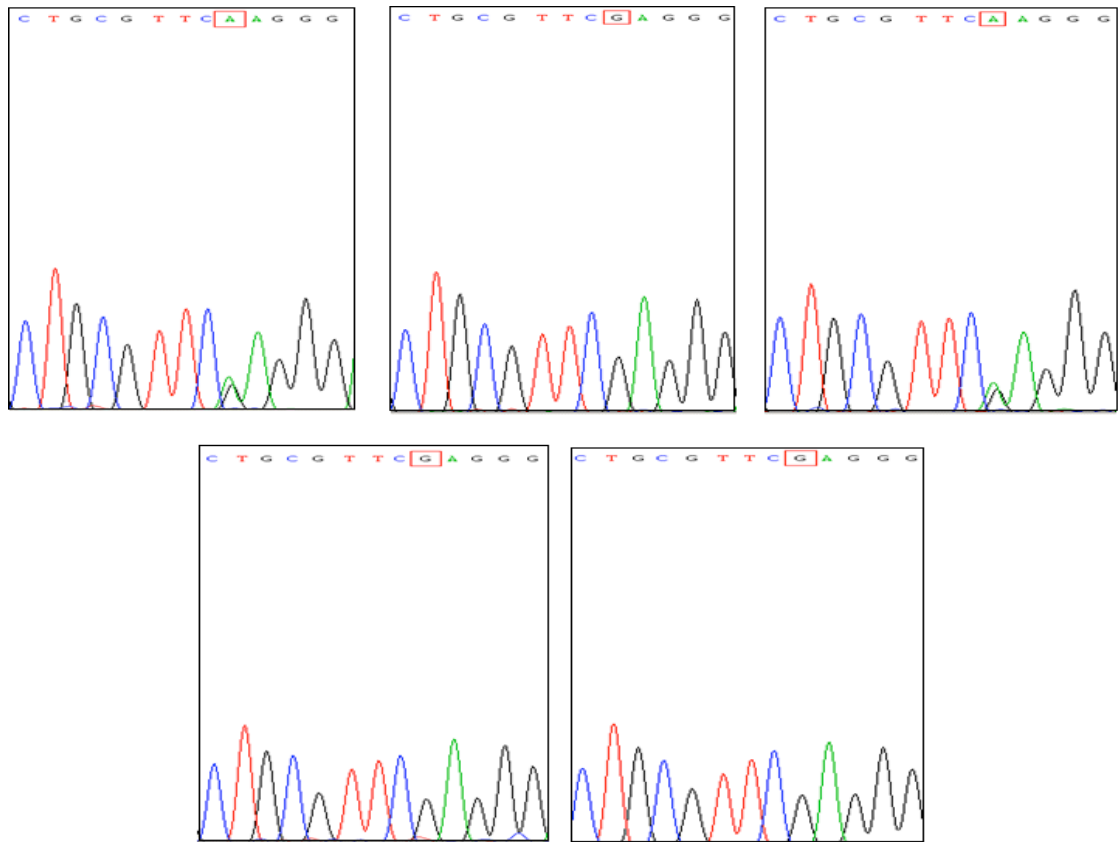


Figure 9 : Chromatogrammes exon 2 du gène *ATP2B4* (Individus II-6, III-3 et II-2 au dessus et les patient III-4 et II-1 au dessous)

Compte tenu que ces mutations n'entraînent pas de changement d'acide aminé, nous n'avons donc pas porté d'intérêt supplémentaire pour ces changements.

Tableau 6: Résumé des résultats de séquençage pour le gène *ATP2B4*

Gène	SNPs	Changement acide aminé	Membres de la famille				
			Sains			Atteints	
			II-6	III-3	II-2	III-4	II-1
ATP2B4	rs1419114	non	hétérozygote	homo. muté	hétérozygote	homo. muté	homo. muté
	rs2228445	non	hétérozygote	homo. muté	-	homo. muté	homo. muté
	rs41264257	non	hétérozygote	homo. muté	-	homo. muté	hétérozygote

3.3.2 *PPP1R12B*

3.3.2.1 Fonction

PPP1R12B (protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B) est un gène multifonctionnel qui code pour deux sous-unités (MBS et SM-M20) des chaînes légères de la myosine phosphatase. Le SM-M20 jouerait un rôle régulateur dans la contraction musculaire en se liant aux MBS. *PPP1R12B* code pour l'une des 2 sous-unités de la myosine MBS, la « myosin light chain phosphatase target subunit 2 » (MYPT2)-MBS (47). Il se situe sur la région 1q32.1 et est composé de 5 isoformes : le premier comporte 24 exons codant une protéine de 982 acides aminés, le deuxième comporte 10 exons codant une protéine de 515 acides aminés, le troisième comporte 9 exons codant une protéine de 386 acides aminés, le quatrième comporte 9 exons codant une protéine de 208 acides aminés et le dernier comporte 9 exons codants une protéine de 224 acides aminés.

3.3.2.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 5 SNPs pour ce gène (SNP_A-1794429: p-value = 9,87E-025; SNP_A-1828408: p-value = 9,87E-025; SNP_A-1849853: p-value = 9,87E-025; SNP_A-1980295: p-value = 9,87E-025; SNP_A-8467199: p-value = 9,87E-025). Suite au séquençage de ce gène, aucun changement de nucléotide n'a été rapporté dans quelconque des exons codants.

3.3.3 *SOX13*

3.3.3.1 Fonction

SOX13 (SRY-BOX 13) appartient au groupe D de la région sexe-déterminant des facteurs de transcription. Il code pour un membre de la famille des facteurs de transcription SOX (SRY liées HMG-box), impliqué dans la régulation du développement embryonnaire et dans la détermination du destin cellulaire (48). Ce gène se situe sur la région 1q32 et comporte 13 exons codants une protéine de 622 acides aminés.

3.3.3.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 3 SNPs pour ce gène (SNP_A-1980745 : p-value = 9,87E-025; SNP_A-4245768 : p-value = 6,55E-017; SNP_A-8414547 : p-value = 9,87E-025). Suite au séquençage de ce gène, aucun changement de nucléotide n'a été rapporté dans quelconque des exons codants.

3.3.4 *CACNAIS*

3.3.4.1 Fonction

Les canaux calciques sont des complexes constitués de cinq sous-unités (alpha-1, alpha-2, bêta, delta ou gamma). L'activité du canal est dirigée par la sous-unité alpha-1 formant des pores, alors que les autres sous-unités agissent comme auxiliaires régulant cette activité. Les caractères distinctifs de ces types de canaux sont principalement liés à l'expression d'une variété d'isoformes alpha-1: alpha-1-A, B, C, D, E et S. *CACNAIS* est principalement localisée dans la membrane tubulaire transversale et est responsable des

courants calciques de type L voltage-dépendant (49). Ce gène se situe sur la région 1q32 et comporte 44 exons codants une protéine de 1873 acides aminés.

3.3.4.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 8 SNPs pour ce gène (SNP_A-2038924 : p-value = 3,87E-011; SNP_A-4242099 : p-value = 9,87E-025; SNP_A-4244224 : p-value = 3,87E-011; SNP_A-4277759 : p-value = 1,40E-025; SNP_A-4302362 : p-value = 9,87E-025; SNP_A-8318033 : p-value = 8,02E-006; SNP_A-8457761 : p-value = 3,84E-011; SNP_A-8475521 : p-value = 3,87E-011; SNP_A-8538397 : p-value = 9,87E-025). Suite au séquençage de ce gène, des changements de nucléotides ont été rapportés dans plusieurs exons (exons 5, 11, 18, 38 et 44).

Dans l'exon 38, nous avons identifié un changement à la position 201016296, que chez le patient III-4 (Figure 10). Ce changement est déjà rapporté dans NCBI: rs3850625. Bien que les chromatogrammes aient indiqué que les deux individus étaient hétérozygotes, le changement de nucléotide a entraîné un changement d'acide aminé (changement d'une Arginine [R] en Cystéine [C]), comme nous constatons sur la figure 11. Nous avons donc séquencé un autre individu sain (III-3) et un autre patient (II-1). Tous les individus séquencés sont hétérozygotes pour cette position. Nous n'avons donc pas porté d'intérêt supplémentaire pour ce changement.

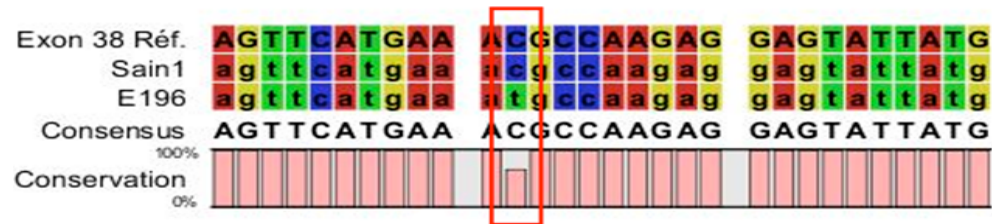


Figure 10 : Séquence nucléotidique exon 38 du gène *CACNA1S*

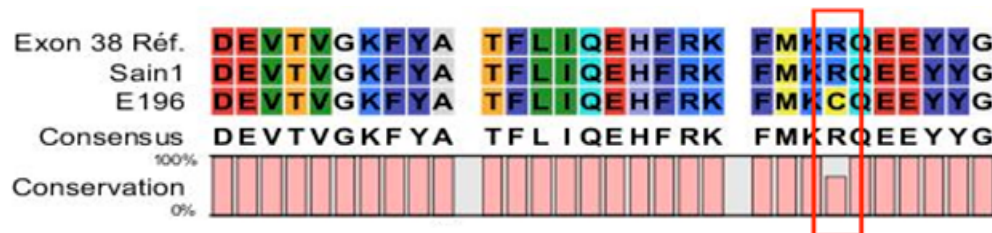


Figure 11 : Séquence protéique exon 38 du gène *CACNA1S*

Enfin, nous avons identifié deux changements dans l'exon 44 aux positions 201016296 et 201009066 (Figure 12). Un de ces changements (position 201016296) est déjà référencé dans NCBI (rs12139527), tandis que le deuxième (position 201009066) est inconnu. Ce dernier se situe sur l'ARNm à la position 5742 et au niveau de l'acide aminé 1839. Ces deux changements ne se trouvent que chez l'individu II-6 sous forme hétérozygote et entraîne un changement d'acide aminé à chacune des positions. Elles n'ont pas été trouvées chez le patient III-4, ni même chez les individus III-3 et II-1.

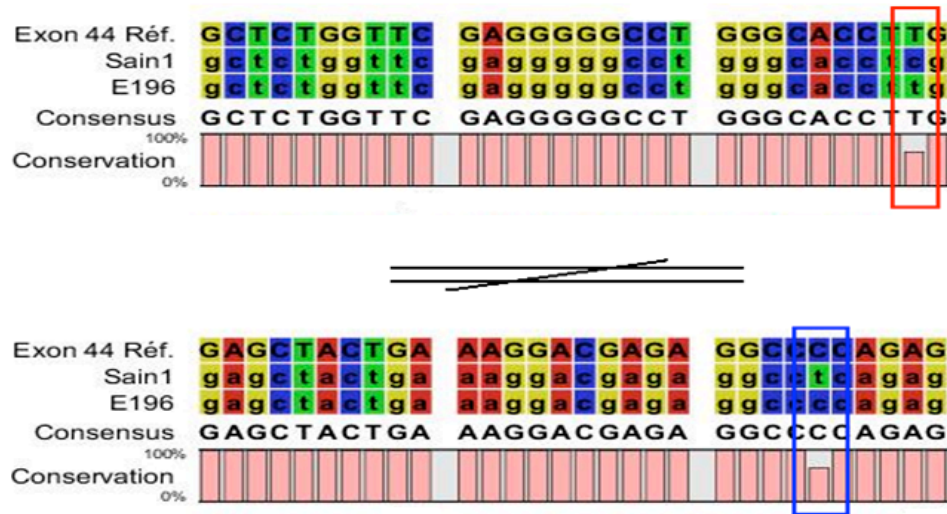


Figure 12 : Séquence nucléotidique exon 44 du gène *CACNAIS*

Pour le changement à la position 201016296, il y a changement d'une Leucine [L] en Sérine [S] tandis qu'à la position 201009066 (changement non référencé), il y a changement d'une Proline [P] en Sérine [S] (Figure 13).

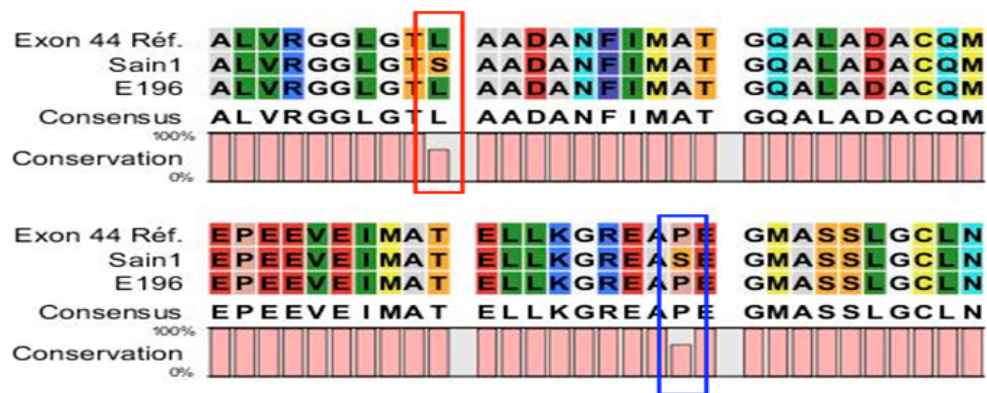


Figure 13 : Séquence protéique exon 44 du gène *CACNAIS*

Les résultats de séquençage obtenus pour ce gène sont résumés dans le Tableau 7.

Au total, nous avons répertorié huit changements de nucléotides différents, dont seulement

trois entraînaient un changement d'acide aminé. Sur ces trois derniers changements de nucléotides, un d'entre eux n'est pas répertorié dans NCBI et se trouve à la position 201009066. Malheureusement, ce changement ne se trouve que chez un individu sain de la famille (II-6) sous la forme hétérozygote.

Tableau 7: *Résumé des résultats de séquençage pour le gène CACNA1S*

Gène	SNPs	Changement acide aminé	Membres de la famille				
			Sains			Atteints	
			II-6	III-3	II-2	III-4	II-1
CACNA1S	rs2296383	non	hétérozygote	-	-	hétérozygote	-
	rs16847674	non	non-muté	-	-	hétérozygote	-
	rs9427714	non	hétérozygote	-	-	non-muté	-
	rs4915477	non	non-muté	-	-	hétérozygote	-
	rs7415038	non	hétérozygote	-	-	non-muté	-
	rs3850625	R ==> C	hétérozygote	hétérozygote	-	hétérozygote	hétérozygote
	rs12139527	L ==> S	hétérozygote	non-muté	-	non-muté	non-muté
	pos. 201009066	P ==> S	hétérozygote	non-muté	-	non-muté	non-muté

3.3.5 *ADORA1*

3.3.5.1 **Fonction**

Les récepteurs adénosines font partis de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Il existe 4 types de récepteurs adénosine (A1, A2a, A2b et A3) et chacun d'entre eux ont leur spécificité de liaison et de distribution au sein des différents tissus. Ensemble, ces récepteurs régulent une diversité de fonctions physiologiques. Les récepteurs de type A1 sont fortement exprimés au niveau du cerveau, mais aussi de la glande surrénale. Les récepteurs A1 et A3 sont couplés à la sous-unité Gi tandis que les A2a et A2b sont couplés à la sous-unité Gs (50). L'activation du récepteur A1 inhibe donc l'activité

adénylate cyclase, entraînant une diminution de second messenger AMPc (51). La stimulation du récepteur A1 active la phospholipase C, ce qui permet une augmentation du inositol 1,4,5-triphosphate et du diacylglycérol, ainsi qu'une mobilisation du Ca^{2+} (51, 52). Le gène se situe sur la région 1q32.1 et est composé de 2 isoformes : la différence se trouve au niveau des exons non-codants. Les deux isoformes comportent 2 exons codants pour une protéine de 326 acides aminés.

3.3.5.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 1 SNP pour ce gène (SNP_A-1926769 : p-value = 9,87E-025). Suite au séquençage de ce gène, nous avons identifié un changement nucléotidique qui n'apparaissait que chez l'individu II-6. Ce changement se présente sous forme d'hétérozygotie et entraîne un changement d'acide aminé, Sérine [S] en Asparagine [N]. Cette mutation ponctuelle se trouve à la position 203134629 (pos. ARNm 1015 et pos. AA 246) et n'est pas référencée sur NCBI.

Tableau 8: Résumé des résultats de séquençage pour le gène *ADORA1*

Gène	SNP	Changement acide aminé	Membres de la famille				
			Sains			Atteints	
			II-6	III-3	II-2	III-4	II-1
ADORA1	pos.203134629	S ==> N	hétérozygote	-	-	non-muté	-

Compte tenu que cette mutation ne s'est trouvée que chez l'individu II-6, nous n'avons donc pas porté d'intérêt supplémentaire pour ce changement.

3.3.6 CHD9

3.3.6.1 Fonction

Le remodelage de la chromatine est un mécanisme clé pour la régulation de gènes. Les enzymes pour ce mécanisme sont subdivisées en deux classes: celles qui impliquent des modifications covalentes des histones et celles qui modifient la chromatine en utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP), comme la famille des protéines CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding protein), qui se compose de neuf protéines (CHD1-9) chez l'humain. Les domaines ATPase-hélicase sont impliqués dans les processus nucléaires, comme la transcription, réplication, recombinaison et réparation de l'ADN (54, 55). Ce gène se situe sur la région 16q12.2 et comporte 38 exons codants une protéine de 2881 acides aminés.

3.3.6.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 16 SNPs pour ce gène (SNP_A-1797247; SNP_A-1801722; SNP_A-1801724; SNP_A-1801725; SNP_A-1841084; SNP_A-1878082; SNP_A-1947844; SNP_A-2067602; SNP_A-2129800; SNP_A-2143664; SNP_A-2144460; SNP_A-2157149; SNP_A-2250286; SNP_A-2251232 ; SNP_A-2298125; SNP_A-4286597 : p-value = 1,52E-010).

Suite au séquençage de ce gène, nous avons rapporté des changements de nucléotides dans plusieurs exons (exons 29, 31, 33 et 39) que nous avons rapportés dans le Tableau 9.

Dans l'exon 29, nous avons noté un changement à la position 53326860 (ARNm: 5615 et AA: 1802), que chez le patient III-4 (Figure 14). Ce changement est déjà rapporté dans NCBI: rs2287078.

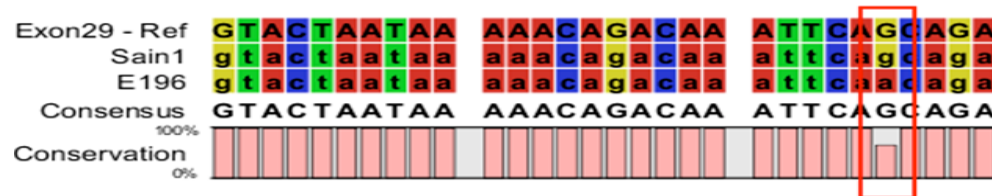


Figure 14 : Séquence nucléotidique exon 29 du gène *CHD9*

Bien que les chromatogrammes ont indiqué que le patient III-4 était homozygote muté, le changement de nucléotide n'a entraîné aucun changement d'acide aminé (Figure 15). Compte tenu que cette mutation n'engendrait pas de changement d'acide aminé, nous n'avons donc pas porté d'intérêt supplémentaire pour cet exon.

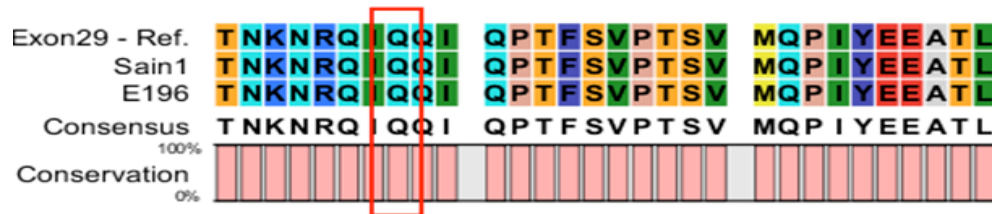


Figure 15 : Séquence protéique exon 29 du gène *CHD9*

Dans l'exon 31, nous avons noté un changement à la position 53338186 (ARNm: 6477 et AA: 2090), que chez l'individu II-6 (Figure 16). Ce changement n'est pas rapporté dans NCBI.

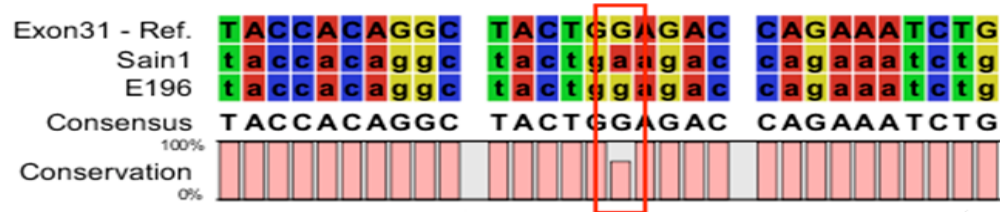


Figure 16 : Séquence nucléotidique exon 31 du gène *CHD9*

Nous constatons sur les chromatogrammes que ce changement de nucléotide se caractérise par une homozygotie chez l'individu II-6. Bien que la mutation ponctuelle engendre un changement d'acide aminé Glycine [G] en Acide glutamique [E] (Figure 17), nous n'avons pas porté davantage intérêt à cet exon, puisque le changement se trouve chez un individu sain.

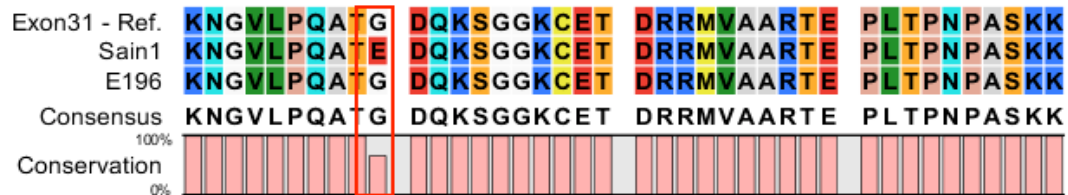


Figure 17 : Séquence protéique exon 31 du gène *CHD9*

Dans l'exon 33, nous avons trouvé un changement chez les individus II-6 et III-4 (Figure 18). Ce changement est déjà rapporté dans NCBI (rs6499548) à la position 53341748 (ARNm: 7145 et AA: 2312).

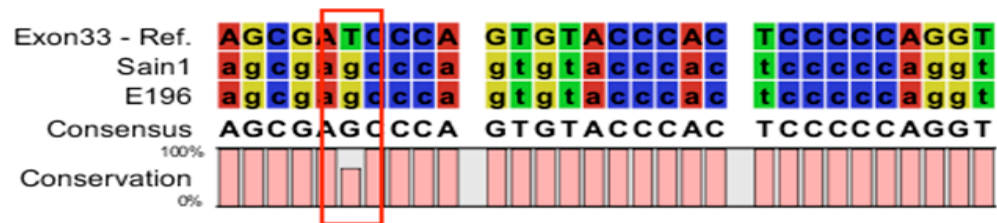


Figure 18 : Séquence nucléotidique exon 33 du gène *CHD9*

Nous constatons sur les chromatogrammes que ce changement de nucléotide se caractérise par une homozygotie chez les deux individus (homozygotes mutés). Compte tenu que la mutation s'est retrouvée aussi bien chez l'individu sain que chez la personne atteinte, nous n'avons pas poursuivi les recherches au sein de cet exon dans d'autres individus de la famille, malgré le fait qu'il y ait un changement d'acide aminé (Figure 19), une Acide Aspartique [D] en Acide glutamique [E].

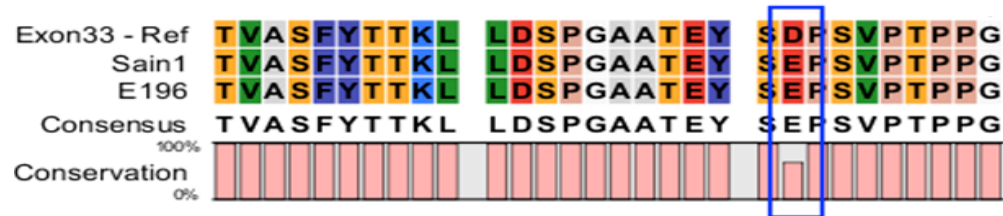


Figure 19 : Séquence protéique exon 33 du gène *CHD9*

Enfin, nous avons identifié une mutation dans l'exon 39 à la position 53358439, plus précisément à l'ARNm 8487 et à l'AA 2760 (Figure 20). Ce changement retrouvé est déjà rapporté dans NCBI (rs3743771)

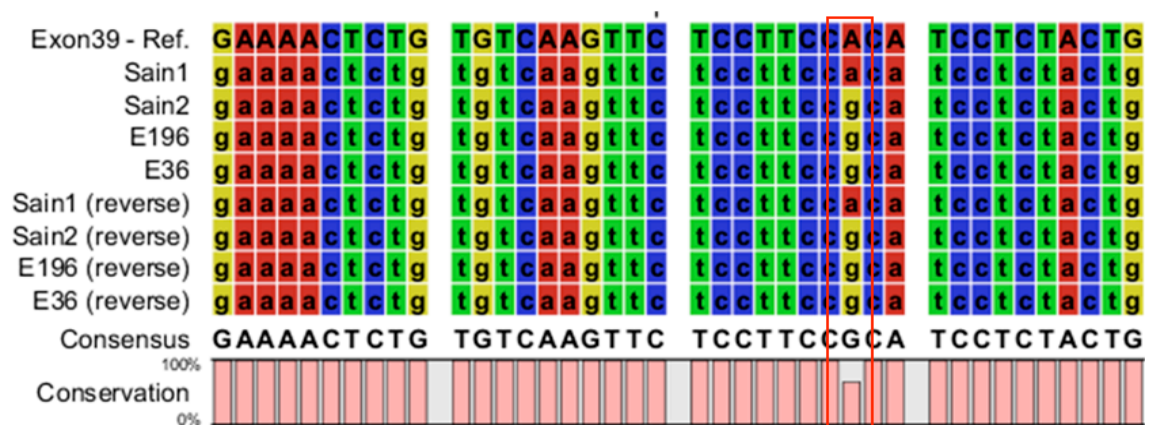


Figure 20 : Séquence nucléotidique exon 39 du gène *CHD9*

Les chromatogrammes ont indiqué que l'individu II-6 est homozygote non-muté et l'individu III-3 hétérozygote, tandis que le patient III-4 est homozygote muté et le patient II-1 est hétérozygote.

Comme nous pouvons le constater sur la figure 21, ce changement de nucléotide a entraîné une modification d'acide aminé (changement d'une Thréonine [T] en Alanine [A]). Nous avons donc séquencé les autres membres de la famille afin de voir si cette mutation apparaissait aussi bien chez les personnes diagnostiquées saines, que celles diagnostiquées Sub-cliniques.

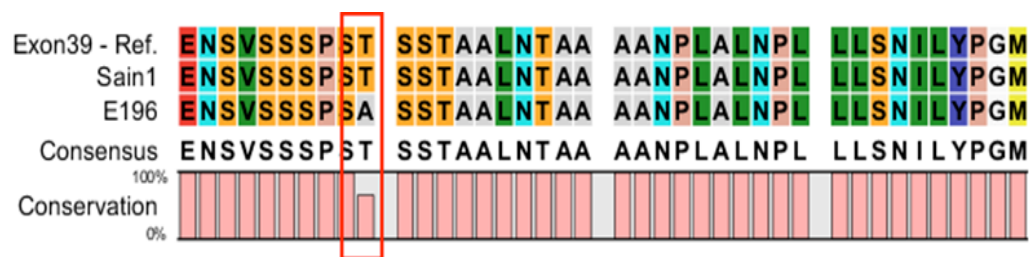


Figure 21 : Séquence protéique exon 39 du gène *CHD9*

Les résultats de séquençage des sept patients « Sub-clinique » ont montré que quatre d'entre elles (II-3, II-7, II-8, II-9) sont hétérozygotes pour cette mutation, alors que les trois autres (III-2, III-5, III-10) sont homozygotes mutées.

Les résultats de séquençage de cinq autres individus diagnostiqués « Sains » ont montré que trois d'entre eux (II-2, II-5, III-8) sont homozygotes non-mutés pour cette mutation, alors que les deux autres (III-6, III-22) sont hétérozygotes. Enfin, nous avons séquencé un patient diagnostiqué « Anormal » (III-13) et celui-ci est hétérozygote. Certains membres de la famille n'ont pas été testés cliniquement mais nous disposons des échantillons de leur ADN lymphocytaire. Sur les cinq membres non-testé, deux d'entre eux

(IV-9 et IV-12) sont homozygotes mutés, tandis que les trois autres (IV-10, IV-11 et IV-13) sont hétérozygotes.

Afin de valider cette mutation, nous avons séquencé l'ADN lymphocytaire de 28 individus atteints d'autres pathologies surrénaliennes ainsi que l'ADN provenant de trois glandes surrénales normales. Ces résultats sont présentés dans le tableau 11.

Enfin, le séquençage de l'ADN extrait des tumeurs des deux patients de la famille diagnostiqués « clinique », soit les patients II-1 et III-4, le séquençage est hétérozygote pour le patient II-1 et homozygote muté pour le patient III-4, tout comme le séquençage de leur ADN lymphocytaire.

Tableau 9: *Résumé des différents SNPs trouvés suite au séquençage du gène CHD9*

Gène	SNPs	Changement acide aminé	Membres de la famille				
			Sains			Atteints	
			II-6	III-3	II-2	III-4	II-1
CHD9	rs2287078	non	non-muté	-	-	homo. muté	-
	pos. 53338186	G ==> E	hétérozygote	-	-	homo. muté	-
	rs6499548	D ==> E	homo. muté	-	-	homo. muté	-
	rs3743771	T ==> A	non-muté	hétérozygote	non-muté	hétérozygote	homo. muté

3.3.7 *SPRY2*

3.3.7.1 **Fonction**

La famille de protéines Sprouty (Spry) est un groupe hautement conservé de boucles modulatrices de rétroaction négative régulées par l'activation de la protéine kinase (MAPK) ; elle fut décrite initialement chez la drosophile. Il y a quatre membres chez les mammifères (Spry1-4) dont la modulation des voies de signalisation induite par les

récepteurs de tyrosine kinase est dépendant de facteur de croissance (56). Un des membres de cette famille est un gène qui code pour la protéine Spry2. La protéine codée contient un domaine carboxy-terminal riche en cystéine essentiel pour l'activité inhibitrice des protéines de signalisation des récepteurs tyrosine kinase. De plus, il a été constaté que les domaines Spry sont très conservés entre les isoformes du récepteur ryanodine (RyR), et le deuxième domaine Spry2 est un partenaire de liaison *in vitro* pour la boucle II-III de la sous-unité $\alpha 1S$ (CACNA1S) du récepteur dihydropyridine muscle squelettique (DHPR). La membrane couvrant la sous-unité $\alpha 1S$ du DHPR est un capteur de tension, qui semble communiquer le potentiel d'action au RyR par un processus de couplage conformationnel entre la boucle II-III intracellulaire du DHPR et RyR1 (57). De plus, il a été démontré que les protéines de la famille SPRY régulent les récepteurs tyrosines kinases et sous-régulent les voies de signalisation comme RAS-MAPK (59).

Ce gène se situe sur la région 13q31.1 et comporte 1 exon codant une protéine de 315 acides aminés.

3.3.7.2 Résultats

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 1 SNP pour ce gène (SNP_A-1899771 : p -value = 2,30E-008). Suite au séquençage de ce gène, nous avons rapporté un changement nucléotidique (Figure 22), qui apparaissait chez l'individu III-3 sous forme d'homozygotie, sous forme d'hétérozygotie chez les patients III-4 et II-1; l'individu II-6 est homozygote non-muté.

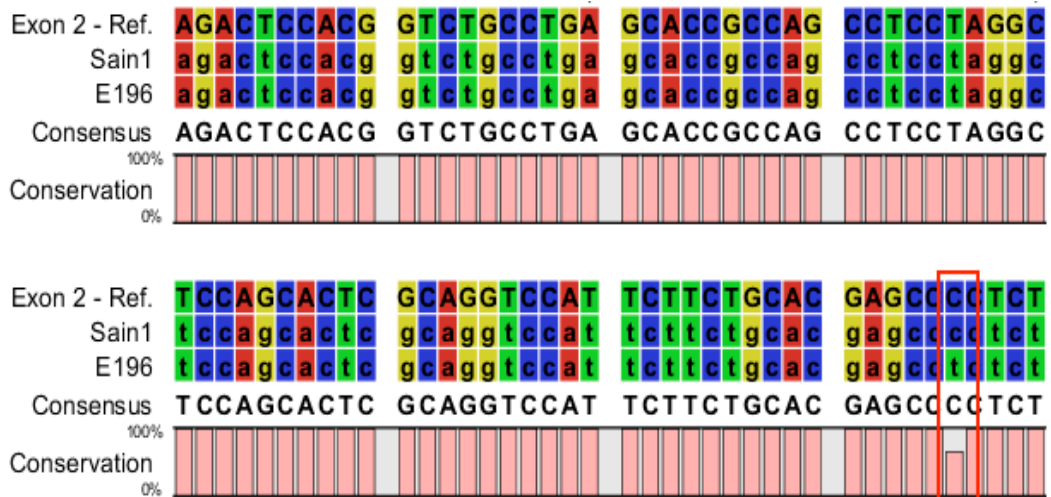


Figure 22: Séquence nucléotidique exon 2 du gène *SPRY2*

Le changement de nucléotide se situe à la position 80911525, plus précisément sur l'ARNm à la position 697 et au niveau de l'acide aminé 106. Cette mutation ponctuelle est déjà référencée par NCBI (rs504122) et entraîne un changement d'acide aminé d'une Proline [P] en Sérine [S] (Figure 23).

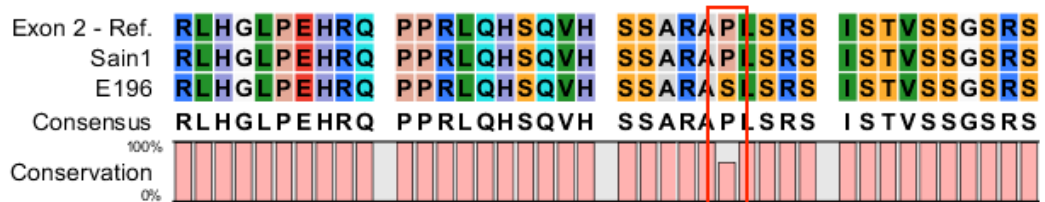


Figure 23: Séquence protéique exon 2 du gène *SPRY2*

Nous avons donc séquencé les ADNs lymphocytaires des autres membres de la famille afin de vérifier si cette mutation ne se trouvait que chez les personnes atteintes (Clinique ou Sub-clinique). Le séquençage des sept patients « Sub-clinique » (II-3, II-7, II-8, II-9, III-2, III-5, III-10) a montré qu'ils sont hétérozygotes pour cette mutation.

Les résultats de séquençage de cinq autres individus diagnostiqués « Sains » ont montré que trois d'entre eux (II-2, II-5 et III-22) sont homozygotes non-mutés pour cette mutation, alors qu'un autre (III-8) est hétérozygote et le dernier (III-6) est homozygote muté. Enfin, nous avons séquençé cinq individus qui n'ont jamais été testés au niveau clinique, et ces individus sont tous hétérozygotes.

Tout comme pour le gène *CHD9*, nous avons séquençé l'ADN lymphocytaire de 28 individus atteints d'autres pathologies ainsi que l'ADN provenant de trois surrénales normales. Nous n'avons représenté que les chromatogrammes provenant du séquençage des tumeurs des deux patients de la famille diagnostiqués Cushing « clinique » (II-1 et III-4), les autres résultats sont présentés dans le tableau.

Enfin, le séquençage de l'ADN extrait des tumeurs des deux patients de la famille diagnostiqués « clinique », le séquençage est hétérozygote pour les patients II-1 et III-4, tout comme le séquençage de leur ADN lymphocytaire.

Tableau 10: *Résumé des résultats obtenus suite au séquençage du gène SPRY2*

Gène	SNP	Changement acide aminé	Membres de la famille				
			Sains			Atteints	
			II-6	III-3	II-2	III-4	II-1
SPRY2	rs504122	P ==> S	non-muté	homo. muté	non-muté	hétérozygote	hétérozygote

3.3.8 *PHLDA3*

3.3.8.1 **Fonction**

Un gène nommé « pleckstrin homology-like domain family A member 3 » (*PHLDA3*) est un gène réactif à p53 et est nécessaire pour l'apoptose p53-dépendante. *PHLDA3* compétitionne avec AKT pour lier les membranes des phospholipides, ce qui inhibe la translocation d'AKT à la membrane cellulaire et son activation. Le gène *PHLDA3* est transcrit en une protéine de 127 acides aminés (~ 14 kDa). Ce gène a été initialement identifié comme une protéine p53 inductible impliqué dans les dommages à l'ADN en réponse au stress. Il contient deux motifs de liaison consensus à p53 dans la région promotrice et son expression est régulée directement par p53 (72, 73). Ce gène se situe sur la région 1q32 et comporte 1 exon codant une protéine de 127 acides aminés.

3.3.8.2 **Résultats**

Les résultats obtenus par la puce ont identifié 1 SNP pour ce gène (SNP_A-2270773: p-value = 3,70E-025). Suite au séquençage de ce gène, un changement de nucléotide a été identifié dans l'exon 1.

Le changement à la position 201437832 n'est présent que chez l'individu sain II-6 (Figure 24). Ce changement est déjà rapporté dans NCBI (rs35383942), plus précisément sur l'ARNm à la position 468 et au niveau de l'acide aminé 28. Cette mutation ponctuelle entraîne un changement d'acide aminé d'une Arginine [R] en Glutamine [Q] (Figure 25).

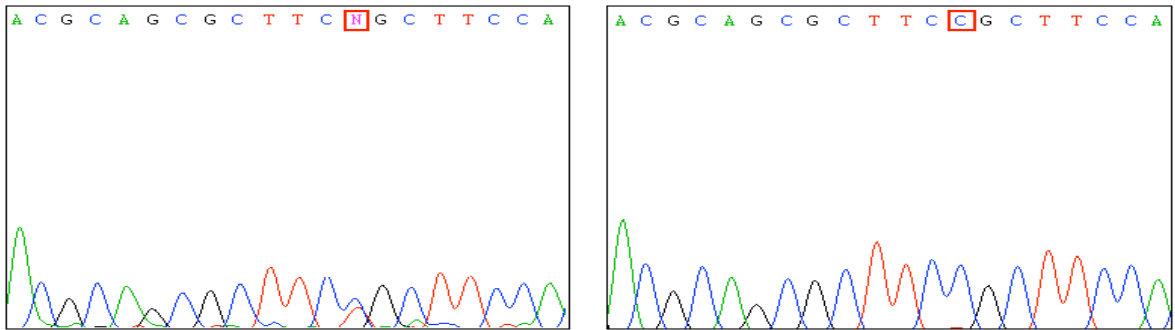


Figure 24: Chromatogramme exon 1 du gène *PHLDA3* en anti-sens (Individu II-6 à gauche et le patient III-4 à droite)

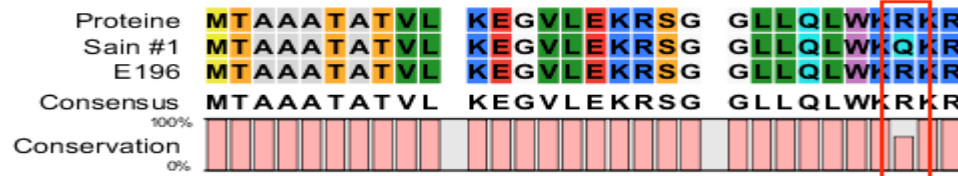


Figure 25 : Séquence protéique exon 1 du gène *PHLDA3*

Au vu du résultat obtenu pour cet exon, nous n'avons donc pas porté d'intérêt supplémentaire pour ce changement.

3.3.9 Résumé des données de séquençage pour les gènes *CHD9* et *SPRY2*

Tableau 11 : Comparaison des résultats de séquençages pour les deux gènes d'intérêt

Diagnostic	Individus	Gènes	
		<i>CHD9</i>	<i>SPRY2</i>
Sain	II-6	homozygote non-muté	homozygote non-muté
	III-3	hétérozygote	homozygote muté
	II-2	homozygote non-muté	homozygote non-muté
	III-8	homozygote non-muté	hétérozygote
	III-6	hétérozygote	homozygote muté
	II-5	homozygote non-muté	homozygote non-muté
	III-22	hétérozygote	homozygote non-muté
Anormal	III-13	hétérozygote	homozygote non-muté
Non-testé cliniquement	IV-9	homozygote muté	hétérozygote
	IV-12	homozygote muté	hétérozygote
	IV-13	hétérozygote	hétérozygote
	IV-10	hétérozygote	hétérozygote
	IV-11	hétérozygote	hétérozygote
Clinique	II-1	hétérozygote	hétérozygote
	III-4	homozygote muté	hétérozygote
Sub-Clinique	II-3	hétérozygote	hétérozygote
	II-7	hétérozygote	hétérozygote
	II-8	hétérozygote	hétérozygote
	II-9	hétérozygote	hétérozygote
	III-2	homozygote muté	hétérozygote
	III-5	homozygote muté	hétérozygote
	III-10	homozygote muté	hétérozygote
Autre pathologie	II-11	homozygote non-muté	hétérozygote

Autres pathologies (contrôles)	6 PPNAD	2 sur 6 hétérozygotes	3 sur 6 homozygotes non-mutés
		4 sur 6 homozygotes non-mutés	3 sur 6 hétérozygotes
	6 Phéochromocytomes	3 sur 6 hétérozygotes	2 sur 6 homozygotes non-muté
		3 sur 6 homozygotes non-muté	4 sur 6 hétérozygotes
	AIMAH familiale (autre)	homozygote non-muté	hétérozygote
	AIMAH asynchrone GIP	homozygote muté	homozygote non-muté
	2 Maladies Cushing	2 sur 2 homozygotes non-mutés	2 sur 2 hétérozygotes
	3 Adénomes surrenaliens	2 sur 3 homozygotes non-mutés	1 sur 3 homozygote non-muté
		1 sur 3 hétérozygotes	2 sur 3 hétérozygotes
	2 Carcinomes	2 sur 2 homozygotes non-mutés	1 homozygote non-muté
			1 hétérozygote
	4 Autres pathologies	1 sur 4 homozygote non-muté	2 sur 4 homozygotes non-mutés
		3 sur 4 hétérozygotes	1 sur 4 homozygotes mutés
			1 sur 4 hétérozygotes
3 Paragangliomes	1 sur 3 hétérozygotes	3 sur 3 hétérozygotes	
	2 sur 3 homozygotes non-mutés		
ADN génomique	II-1	hétérozygote	hétérozygote
	III-4	homozygote muté	hétérozygote
	Surrénale Normale #1	homozygote non-muté	hétérozygote
	Surrénale Normale #2	homozygote muté	hétérozygote
	Surrénale Normale #3	homozygote non-muté	homozygote muté

4. Discussion

L'analyse de la clonalité des tumeurs est très importante pour établir l'origine cellulaire et identifier les mécanismes pouvant expliquer la progression des tumeurs. L'initiation d'une tumeur unique peut être secondaire à une mutation somatique qui se produit dans un gène qui aurait une fonction de suppresseur de tumeurs. La sécrétion des stéroïdes corticosurréaliens nécessite une cascade enzymatique complexe qui est régulée par plusieurs hormones et facteurs de croissance, et qui contrôlent aussi la prolifération cellulaire menant à la prolifération tumorale ou à l'hyperplasie diffuse du cortex surrénalien. La monoclonalité indique que la progression est due à une mutation génétique initiatrice d'une seule cellule qui devient génétiquement aberrante. Au contraire, la polyclonalité suggère que des cellules tumorales ou l'hyperplasie diffuse éventuellement nodulaire est affectée par des stimuli locaux communs comme des facteurs de croissance d'origine extra-ou intra-surrénalienne (63, 64).

Des études sur la clonalité des tumeurs du cortex surrénalien ont montré que les cancers corticosurréaliens sont d'origine monoclonale, tandis que les tumeurs bénignes peuvent être aussi bien monoclonales que polyclonales. Beaucoup d'altérations chromosomiques ont été observées dans les cancers corticosurréaliens et ces dernières sont bien plus fréquentes dans les cancers comparativement aux adénomes (63). Il a été suggéré que la plupart des adénomes résultent de mutations oncogènes. Toutefois, les adénomes monoclonaux et polyclonaux peuvent représenter différentes étapes d'un processus de croissance d'un tissu tumoral (64).

Une étude a rapporté les cas de trois patients indépendants atteints d'AIMAH, les comparants génétiquement et cliniquement à des patients atteints d'autres tumeurs de la corticosurrénale et/ou de syndrome de Cushing ACTH-indépendant. Pour ces trois patients atteints d'AIMAH, il y avait des antécédents familiaux de SC. Des mutations germinales dans trois gènes (*MEN1* (Pro494Leu), *FH* (Pro261X), et *APC* (4393_4394delAG)) ont été identifiées dans trois autres patients atteints d'AIMAH, parmi lesquels aucun n'avaient d'antécédents familiaux de SC. Les données prouvent que l'AIMAH est une maladie cliniquement et génétiquement hétérogène qui peut être associée à diverses anomalies génétiques en plus des récepteurs hormonaux aberrants (65). Il a été suggéré que la présence de récepteurs aberrants dans les lésions unilatérales pourrait provenir de mutation somatique monoclonale. Par contre, afin que le cortex surrénalien soit atteint de façon bilatérale au sein des AIMAH, il faudrait donc que la mutation responsable soit transmise de façon germinale (cas familiaux) ou de façon somatique pendant l'embryogénèse dans les cas sporadiques (62).

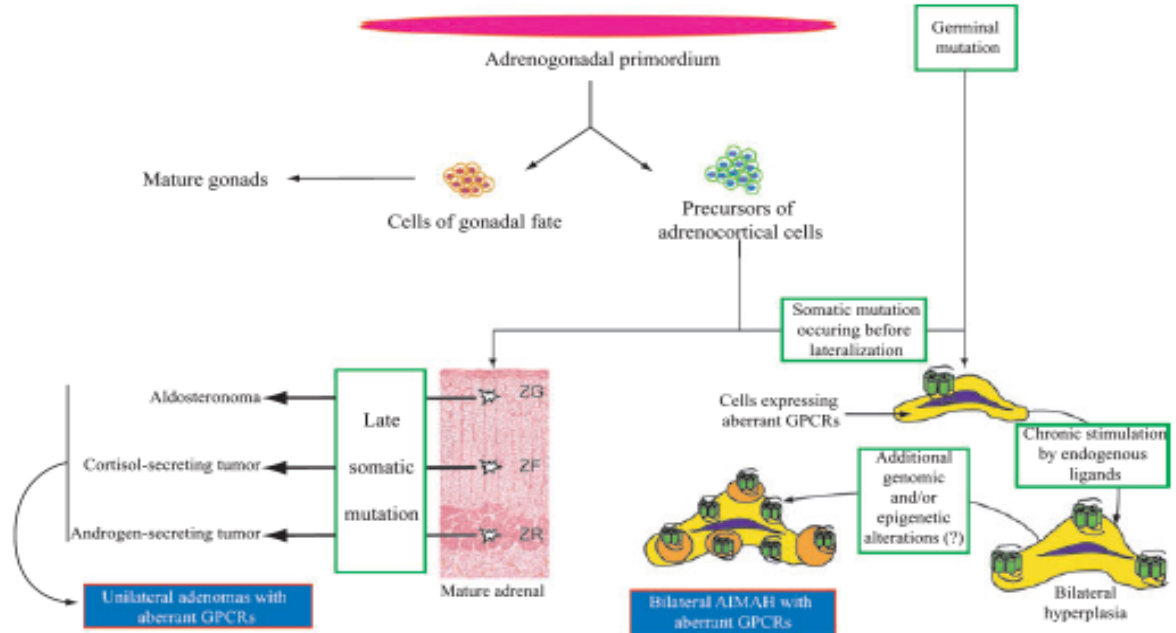


Figure 26 : Modèle hypothétique des événements génétiques séquentiels menant à la formation de tumeurs corticosurréaliennes unilatérale ou hyperplasies bilatérales avec surexpression de GPCR (74).

Le traitement qui a été utilisé le plus fréquemment pour soigner les cas d'AIMAH avec syndrome de Cushing est la résection chirurgicale surrénalienne uni ou bilatérale. Cette pathologie aurait avantage à être étudiée afin de trouver de meilleurs traitements possibles (pharmacologiques) au lieu de faire subir aux patients des interventions chirurgicales lourdes (surrénalectomie bilatérale) entraînant par la suite un remplacement hormonal à vie de glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. C'est pour cela que l'identification des gènes causant cette maladie rare est très importante, afin d'apporter aux personnes atteintes, mais aussi aux membres de leurs familles un diagnostic plus précoce, un traitement pharmacologique approprié ainsi qu'une meilleure qualité de vie sans passer par des interventions chirurgicales. L'identification des gènes responsables pourrait

permettre de prévenir la progression de la maladie par l'utilisation d'antagonistes efficaces des récepteurs aberrants chez les patients génétiquement à risque. Certains antagonistes sont déjà connus et utilisés pour bloquer les ligands ou les divers récepteurs retrouvés chez des patients atteints d'AIMAH, comme par exemple l'octréotide qui est un inhibiteur du GIP, les β -bloquants (ex : propranolol) qui sont des antagonistes des récepteurs adrénergiques, les antagonistes des récepteurs vasopressine (ex : SR49059, spécifique du récepteur V1) ou encore l'acétate de leuprolide qui est un antagoniste de la production de LH (20, 22, 39).

Une étude de liaison nous a donc permis de souligner diverses régions chromosomiques entre les personnes atteintes et non-atteintes de la famille. Après analyse statistique, 159 SNPs significatifs ont été mis en évidence et il a été constaté que la majorité de ces SNPs se situaient sur les régions chromosomiques 1q32.1 et 16q12.2, tandis que très peu se situaient sur les régions 8p21.2 ou 13q31.1-q31.2.

Nous avons décidé de séquencer les parties codantes de certains gènes correspondant à ces régions chromosomiques, *ATP2B4*, *PPP1R12B*, *SOX13*, *CACNAIS*, *ADORA1*, *CHD9*, *SPRY2* et *PHLDA3*. Le séquençage a été réalisé chez les divers membres de la famille dont nous disposons de l'ADN lymphocytaire, afin de chercher si des mutations pouvant être causales étaient présentes. Sur les huit gènes séquencés, nous avons porté notre intérêt particulièrement sur deux d'entre eux, soit *CHD9* et *SPRY2*. En effet, pour ces deux gènes, nous avons identifié des changements nucléotidiques chez les patients diagnostiqués porteurs d'AIMAH avec sécrétions cliniques ou sub-cliniques de cortisol modulé par les

agonistes β -adrénergique ou V1 vasopressine. Ces changements de nucléotides ont entraîné des changements d'acides aminés au niveau des deux protéines.

En ce qui concerne le gène *CHD9*, nous avons trouvé un changement dans l'exon 39 (c. 8487A>G ; p.Thr2760Ala). Chez certains individus diagnostiqués sains au moment des prises de sang, le séquençage est apparu sous forme d'homozygotie non-mutée pour ce nucléotide (II-2, II-5, II-6 et III-8), tandis que pour trois autres le séquençage est hétérozygote (III-3, III-6 et III-22).

Les deux patients diagnostiqués atteints cliniquement et opérés ont la mutation sous deux formes différentes, si bien que le patient II-1 est hétérozygote tandis que le patient III-4 est homozygote muté (ADN lymphocytaire et génomique). Pour ce qui est des sept patients diagnostiqués « sub-cliniques », le séquençage est hétérozygote à ce nucléotide chez quatre d'entre eux (II-3, II-7, II-8, II-9), alors que les trois autres sont homozygotes mutés (III-2, III-5, III-10). Le seul patient diagnostiqué « anormal » est hétérozygote (III-13). Enfin, nous avons séquencé cinq membres de la famille qui n'ont pas été testés cliniquement. Deux d'entre eux, de sexe masculin, (IV-9 et IV-12) sont homozygotes mutés pour ce nucléotide, tandis que trois autres, de sexe féminin, sont hétérozygotes (IV-10, IV-11 et IV-13).

Afin de valider cette mutation, nous avons séquencé de l'ADN lymphocytaire de plusieurs individus en dehors de la famille à l'étude et atteints par d'autres pathologies. Un groupe de patients atteints de PPNAD (n = 6), dont les résultats démontrent une homozygotie non-mutée pour quatre d'entre eux, tandis que les deux autres sont hétérozygotes. Ensuite, nous avons testé un groupe de patients atteints de

phéochromocytome (n = 6), dont les séquençages démontrent une homozygotie non-muté pour trois d'entre eux, tandis que les trois autres sont hétérozygotes. Un groupe de patients atteint de paragangliome (n = 3) est homozygote non-muté pour deux des patients alors que le dernier est hétérozygote. Un groupe de patients atteints de carcinome (n = 3), dont le patient II-11, et de maladie de Cushing familiale (n = 2), sont homozygotes non-mutés. Des patients atteints d'adénome surrénalien (n = 3) sont homozygotes non-mutés pour deux d'entre eux, tandis que le dernier est hétérozygote. Enfin, un groupe constitué d'autres pathologies surrénaliennes (n = 4) est homozygote non-muté pour un des cas, tandis que les trois autres sont hétérozygotes. Nous avons utilisé l'ADN extrait de trois surrénales « normales », provenant de patients ayant subi une néphrectomie, suite à un diagnostic de cancer. Deux d'entre eux sont homozygotes non-mutés alors que la troisième est homozygote muté pour notre nucléotide d'intérêt.

Un fait intéressant parmi ces autres pathologies, est que l'on a trouvé une mutation inconnue six nucléotides après notre position d'intérêt, chez un phéochromocytome, un des deux cas de Cushing hypophysaire et la surrénale normale #1. Cette mutation se présente sous forme d'hétérozygotie chez les trois cas et engendre un changement d'acide aminé (c. 8493T>A ; p.Ser2762Thr).

Tenant compte de ces données, nous avons examiné l'analyse des fréquences pour le SNP rs3743771, relatif au gène *CHD9* par l'outil HapMap (Figure 27). Ceci a permis de montrer que dans la population d'origine d'Europe de l'ouest (population la plus proche de la famille étudiée), il n'y a qu'une faible proportion (3,6%) de mutation homozygote répertoriée. Ceci est un fait très important, compte tenu que cette forme de mutation

apparaît au sein de certains patients, dont le cas clinique III-4. Cependant, ce type de mutation existe dans des populations d'origine asiatique et tenant compte de l'introduction possible dans la population canadienne française de gènes de la population amérindienne, il sera indiqué de procéder à sa distribution dans la population contrôle du Québec.

Concernant le gène *SPRY2*, nous avons trouvé un changement dans l'exon 2 (c. 697C>T ; p.Pro106Ser). Chez certains individus diagnostiqués sains au moment des prises de sang, le séquençage est apparu sous forme d'homozygotie non-muté pour ce nucléotide chez quatre individus (II-2, II-5, II-6 et III-22), tandis que pour deux autres, le séquençage est homozygote muté (III-3 et III-6) et enfin un individu est hétérozygote (III-8).

Les deux patients diagnostiqués atteints cliniquement et opérés ont la mutation sous forme hétérozygote (II-1 et III-4). Les sept patients diagnostiqués sub-cliniques sont hétérozygotes à ce nucléotide (II-3, II-7, II-8, II-9, III-2, III-5, III-10). Le seul patient diagnostiqué « anormal » est homozygote non-muté (III-13). En ce qui concerne les individus qui n'ont pas été testés cliniquement (IV-9, IV-10, IV-11, IV-12 et IV-13), le résultat est hétérozygote pour ce nucléotide.

Afin de confirmer nos résultats obtenus au sein de la famille à l'étude, nous avons, comme pour notre autre gène d'intérêt, séquencé l'ADN lymphocytaire de patients atteints d'autre pathologies. Un groupe de patients atteints de PPNAD (n = 6) dont les résultats démontrent une homozygotie non-muté pour trois d'entre eux, tandis que les trois autres sont hétérozygotes. Ensuite, nous avons testé un groupe de patients atteints de phéochromocytome (n = 6), dont les séquençages démontrent une homozygotie non-muté pour deux d'entre eux, tandis que les quatre autres sont hétérozygotes. Le séquençage d'un

groupe de patients atteint de paragangliome (n = 3) démontre une hétérozygotie pour l'ensemble des patients. Un groupe de patients atteints maladie de Cushing familiale (n = 2) est homozygote non-muté, tandis qu'un groupe de carcinome (n = 3), dont le patient II-11, est composé de deux patients hétérozygotes et un homozygote non-muté. Un groupe de patients atteint d'adénome surrénalien (n = 3) sont homozygotes non-mutés pour deux d'entre eux, tandis que le dernier est hétérozygote. Enfin, un groupe constitué d'autres pathologies surrénaliennes (n = 4) est homozygote non-muté pour un des cas, tandis que les trois autres sont hétérozygotes. Au même titre que *CHD9*, nous avons recherché les fréquences pour le SNP rs504122, relatif au gène *SPRY2* par l'outil HapMap (Figure 28). Nous avons pu constater que l'hétérozygotie que nous observons en grande quantité dans nos échantillons est assez courante au sein de la population d'origine européenne, puisque près de 41% de cette population est sous cette forme.

Il a été rapporté dans les cas familiaux que le phénotype pourrait être progressif selon les récepteurs aberrants. Il est à noter que les différents membres d'une famille seront diagnostiqués « clinique » s'ils sont assez âgés, présentant de volumineuses surrénales, ainsi que les caractéristiques biochimiques de la pathologie, tandis que les sujets plus jeunes auront une hyperplasie modeste avec sécrétion de cortisol plus partielle. Des différences au niveau du genre des membres d'une même famille, tel que les femmes étaient plus atteintes que les hommes, ont aussi été remarqués (30, 67, 68).

Nous pouvons proposer différentes conclusions au vue des résultats obtenus. En effet, il semblerait possible que les mutations trouvées dans les deux gènes d'intérêt (*CHD9* et *SPRY2*) jouent un rôle dans cette pathologie surrénalienne. Plus particulièrement, comme

nous avons pu le constater au sein des différents membres de cette famille et comme il a été rapporté dans la littérature, il semblerait qu'il y ait bien un phénotype progressif. En effet, certains individus qui ont été diagnostiqués sains au moment de la prise de sang, possèdent un profil génétique identique à certains patients diagnostiqués « sub-clinique » ou « clinique » et étaient d'un âge assez jeune comparativement à la tranche d'âge où la pathologie se déclare. Un suivi des patients au niveau clinique va devoir être effectué, en particulier pour ceux présentant un profil de mutation homozygote (IV-9 et IV-12), compte tenu de leur jeune âge. De nouveaux tests de suppression à la dexaméthasone, un test de posture et une infusion d'isoprotérénol devront être réalisés.

En constatant le profil génétique des divers membres de la famille, il semblerait tout de même qu'une mutation dans un des deux gènes seulement ne soit pas suffisant pour que des signes pathologiques apparaissent. En effet, l'hypothèse d'une combinaison des deux gènes semble possible, de telle sorte qu'un profil muté (homozygotie et/ou hétérozygotie) doit être présent dans chacun de ces deux gènes pour que des signes pathologiques apparaissent. Enfin, il semblerait que différents profils génétiques puissent se dessiner entre les différents patients diagnostiqués « sub-clinique » et « clinique », mais nous ne pouvons pas en conclure de façon concrète avec nos résultats. Cependant, il paraît évident que les deux gènes trouvés ne soient pas les seuls qui soient impliqués et responsables de cette pathologie de forme familiale.

Le fait que les profils génétiques des surrénales « normales » provenant de néphrectomies ne soient pas identiques (2 hétérozygotes et 1 homozygote mutée) pour le gène *SPRY2*, pourrait s'expliquer par le fait que cette mutation ne se constate pas seulement

dans les maladies surrénaliennes, mais aussi dans les maladies rénales. Comme ces glandes surrénales dites « normales » proviennent de patients ayant subi une néphrectomie pour cause de cancer, il est possible de supposer que ces glandes endocrines soient atteintes aussi chez ces patients.

Ces résultats soulèvent le besoin de confirmer les diagnostics émis par les praticiens grâce aux données cliniques. Afin de pouvoir émettre un diagnostic génétique complet confirmant les données cliniques, il faudrait poursuivre le projet en séquençant d'autres gènes candidats. Les deux régions majeures identifiées (1q32.1 et 16q12.2) semblent de très bonnes pistes à explorer, mais il ne faut pas écarter des régions peu ressorties par l'étude de liaison, comme nous l'avons montré avec le gène *SPRY2*, dans lesquelles certains gènes peuvent jouer des rôles très importants au niveau fonctionnel.

À part les deux gènes que nous avons séquencés, nous avons identifiés trois nouveaux polymorphismes dans les gènes *CACNAIS*, *ADORA1* et *CHD9*, qui ne semblent pas reliés à cette pathologie puisque les profils génétiques sont homozygotes non-muté dans le cas clinique III-4 pour deux de ces trois polymorphismes. Pour ce qui est du troisième polymorphisme (gène *CHD9*), bien que le patient III-4 soit homozygote muté, l'individu sain II-6 est hétérozygote. Il pourrait être intéressant d'explorer d'autres membres de cette famille afin de comparer leurs profils génétiques, en supposant qu'une hétérozygotie ne soit pas suffisante pour déclencher la pathologie.

Enfin, les gènes sélectionnés dans ce projet ont été choisis à partir d'une étude sur une famille. Le même genre d'étude devrait être réalisé dans d'autres familles avec des récepteurs aberrants différents afin de trouver la ou les région(s) spécifique(s) de ces

familles. Il serait en effet intéressant de savoir si les gènes étudiés dans notre projet sont spécifiques à notre cas familial. Dans le cas contraire, on pourrait conclure que des gènes sont communs à plusieurs cas familiaux d'AIMAH.

Une fois les gènes responsables trouvés, il faudrait réaliser des études fonctionnelles afin d'analyser l'influence que ces mutations peuvent avoir au sein de l'organisme. Une première possibilité serait de rechercher l'impact *in vitro* du changement d'acide aminé des protéines dans les gènes d'intérêts ayant subi des mutations. Par la suite, l'analyse des voies de signalisation pourrait être une très bonne continuité.

Pour finaliser ces études, le même genre d'analyse pourra aussi être réalisée dans plusieurs cas sporadiques d'AIMAH, afin d'étudier les gènes d'intérêts et en tirer ou non une conclusion de spécificité aux cas familiaux.

Bibliographie

1. Rosol TJ, Yarrington JT, Latendresse J, Capen CC. 2001 Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity, *Toxicol Pathol.*;29(1):41-8. Review.
2. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP. 2005 Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146:1018-1024.
3. Fulla Y, Guignat L, Dugue MA, Assie G, Bertagna X. 2009 Exploration biologique de la fonction corticotrope. *Revue Francophone des Laboratoires* 35-48.
4. Aguilera G. 2011 HPA axis responsiveness to stress: Implications for healthy aging. *Experimental Gerontology* 46(2-3):90-5.
5. Lindholm J. 2000 Cushing's syndrome: historical aspects. *Pituitary* 3:97-104.
6. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. 2006 Cushing's syndrome *Lancet*. 13;367(9522):1605-17.
7. Mongiat-Artus P, Miquel C, Meria P, Hernigou A, Duclos JM. 2004 Adrenocortical secretory tumors. *Ann Urol (Paris)*.;38(4):148-72.
8. Bertherat J, Mosnier-Pudar H, Bertagna X. 2002 Adrenal incidentalomas. *Curr Opin Oncol*. 14(1):58-63. Review
9. Androulakis II, Kaltsas G, Piaditis G, Grossman AB. 2011 The clinical significance of adrenal incidentaloma. *Eur J Clin Invest*; 41 (5): 552-560.
10. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. 2008 Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *The Oncologist*;13:548-561
11. Li FP, Fraumeni JF Jr. 1969 Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*;71:747-752
12. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE. 1999 Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*;286:2528-2531
13. Fillipi G, McKusick VA. 1970 The Beckwith-Wiedemann syndrome. *Medicine*; 49:279-98.
14. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC et al. 1985 The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)*; 64:270-283.
15. Almeida MQ, Stratakis CA. 2010 Solid tumors associated with multiple endocrine neoplasias. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 203;30-6

16. White PC., New MI., 1988 Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.*;2(4):941-65.
17. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV. 1991 Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med*; 325:1688–1695.
18. Livia M. Mermejo, Tânia L. Mazzuco, Solange Grunenwald, Maria Candida B. V. Fragoso, Isabelle Bourdeau, André Lacroix. 2011 ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab.*;26(1):1-11.
19. Lacroix A. 2009 ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*;23(2):245-59. Review
20. Costa MH, Lacroix A. 2007 Cushing's Syndrome Secondary to ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol.*;51(8):1226-37.
21. Kirschner MA, Powell RD, Lipsett MB. 1964 Cushing's syndrome: nodular cortical hyperplasia of adrenal glands with clinical and pathological features suggesting adrenocortical tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 24:947–955
22. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G, Bouvier M, Hamet P 1997 Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *NEnglJ Med* 337:1429-1434
23. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet H. 2001. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews*; 22: 75–110.
24. Mircescu H, Jilwan J, N'Diaye N, Bourdeau I, Tremblay J, Hamet P, Lacroix A. 2000 Are ectopic or abnormal membrane hormone receptors frequently present in adrenal Cushing's syndrome? *J Clin Endocrinol Metab*;85:3531-6.
25. Miyamura N, Taguchi T, Murata Y et al. 2002 Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland. *Endocrine*; 19: 319–326.
26. Berger M, Gray JA, Roth BL. 2009 The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.*;60:355-66. Review.
27. Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Vaudry H, Kuhn JM 1998 Serotonergic regulation of adrenocortical function. *Horm Metab Res* 30:398-403
28. Mannelli M, Ferruzzi P, Luciani P et al. 2003 Cushing's syndrome in a patient with bilateral macronodular adrenal hyperplasia responding to cisapride: an in vivo and in vitro study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 88: 4616–4622.

29. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, Lefebvre H. 2006. Expression of serotonin₇ receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 91: 4578–4586.
30. Vezzosi D, Cartier D, Régnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H, Caron P. 2007. Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. *European Journal of Endocrinology*; 156: 21–31.
31. Perraudin V, Delarue C, De Keyzer Y, Bertagna X, Kuhn JM, Contesse V, Clauser E, Vaudry H. 1995 Vasopressin-responsive adrenocortical tumor in a mild Cushing's syndrome: in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 80(9):2661-7
32. Mune T, Murase H, Yamakita N, Fukuda T, Murayama M, Miura A, Suwa T, Hanafusa J, Daido H, Morita H, Yasuda K. 2002 Ectopic overexpression of vasopressin v1a receptor in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*; 87: 5706–5713.
33. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Perraudin V, Bertherat J, Lefebvre H. 2008 Expression of vasopressin receptors in ACTH-independent macronodular bilateral adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: molecular, immunohistochemical and pharmacological correlates. *The Journal of Endocrinology*; 196: 1–9.
34. Schubert B, Fassnacht M, Beuschlein F, Zenkert S, Allolio B, Reincke M 2001 Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. *Clin Endocrinol (Oxf)* 54:627-632
35. Nakamura Y, Son Y, Kohno Y, Shimono D, Kuwamura N, Koshiyama H, Sasano H, Matsuda T. 2001 Case of adrenocorticotropic hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia with possible adrenal hypersensitivity to angiotensin II. *Endocrine* 15:57-61
36. Pabon JE, Li X, Lei ZM, Sanfilippo JS, Yussman MA, Rao CV 1996 Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab* 81:2397-2400
37. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. 2002 The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*;23:141-74.
38. Abdallah MA, Lei ZM, Li X, Greenwold N, Nakajima ST, Jauniaux E, Rao ChV. 2004 Human fetal nongonadal tissues contain human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptors. *J Clin Endocrinol Metab*;89:952-6.

39. Lacroix A, Hamet P, Boutin JM. 1999 Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone-dependent Cushing's syndrome. *N Engl J Med*;341:1577-81.
40. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ, Cartier P, Bolte E 1987 Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clin Invest Med* 10:530-533
41. Lebrethon MC, Avallet O, Reznik Y, et al. 1998 Food-dependent Cushing's syndrome: characterization and functional role of gastric inhibitory polypeptide receptor in the adrenals of three patients. *J Clin Endocrinol Metab.*83:4514-4519.
42. N'Diaye N, Tremblay J, Hamet P, De Herder WW, Lacroix A. 1998 Adrenocortical overexpression of gastric inhibitory polypeptide receptor underlies food-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.*;83(8):2781-5
43. Anagnostis P, Karagiannis A, Tziomalos K, Kakafika AI, Athyros VG, Mikhailidis DP. 2009 Adrenal incidentaloma: a diagnostic challenge. *Hormones*;8(3):163-84.
44. Lee S, Hwang R, Lee J, Rhee Y, Kim DJ, Chung UI, Lim SK. 2005 Ectopic expression of vasopressin V1b and V2 receptors in the adrenal glands of familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).*;63(6):625-30
45. Bourdeau I, Boisselle A, Rioux D, Neculau M, Hamet P, Lacroix A: Systematic clinical screening of members of a family with hereditary cortisol-secreting B-adrenergic responsive ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH) reveals unsuspected subclinical Cushing's syndrome (CS) and aberrant B-adrenergic regulation of cortisol secretion. Program of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society, Toronto, CA, p.148 (Abstract OR54-2), 2007
46. Tempel BL, Shilling DJ. 2007 The plasma membrane calcium ATPase and disease. *Subcell Biochem.* 45:365-83.
47. Fujioka M, Takahashi N, Odai H, Araki S, Ichikawa K, Feng J, Nakamura M, Kaibuchi K, Hartshorne DJ, Nakano T, Ito M. 1998 A New Isoform of Human Myosin Phosphatase Targeting/Regulatory Subunit (MYPT2): cDNA Cloning, Tissue Expression, and Chromosomal Mapping. *Genomics.*; 49(1):59-68.
48. Véronique Lefebvre 2009 The SoxD transcription factors – Sox5, Sox6, and Sox13 – are key cell fate modulators. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 42(3):429-32
49. Finsterer J. 2008 Primary periodic paralyses. *Acta Neurol Scand.* 117: 145-158.
50. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. 2001 International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.*;53(4):527-52.

51. Iredale PA, Alexander SP, Hill SJ. 1994 Coupling of a transfected human brain A1 adenosine receptor in CHO-K1 cells to calcium mobilisation via a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Br J Pharmacol* 111: 1252–1256.
52. Megson AC, Dickenson JM, Townsend-Nicholson A, Hill SJ. 1995 Synergy between the inositol phosphate responses to transfected human adenosine A1-receptors and constitutive P2-purinoceptors in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 115: 1415–1424.
53. Kolachala VL, Bajaj R, Chalasani M, Sitaraman SV. 2008 Purinergic receptors in gastrointestinal inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointestinal. Liver Physiol.* 294(2):G401-10.
54. Marfella CG, Imbalzano AN. 2007 The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res.*; 618(1-2):30-40. Review
55. Kim MS, Chung NG, Kang MR, Yoo NJ, Lee SH 2011 Genetic and expressional alterations of CHD genes in gastric and colorectal cancers. *Histopathology.* 2011 Apr;58(5):660-8.
56. Cabrita MA, Christofori G. 2008 Sprouty proteins, masterminds of receptor tyrosine kinase signaling. *Angiogenesis.*;11(1):53-62.
57. Tae H, Casarotto MG, Dulhunty AF. 2009 Ubiquitous SPRY domains and their role in the skeletal type ryanodine receptor. *Eur Biophys J.*;39(1):51-9.
58. Stratakis CA 2009 New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 300:152-157
59. Gatus S, Velasco A, Azueta A, Santacana M, Pallares J, Valls J, Dolcet X, Prat J, Matias-Guiu X. 2011 FGFR2 alterations in endometrial carcinoma. *Modern Pathology.* 1–11
60. Mesiano S, Jaffe RB 1997 Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 18:378–403
61. Mansmann G, Lau J, Balk E, et al. The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Review.* 2004;25:309–40
62. Lacroix A, Baldacchino V, Bourdeau I, Hamet P, Tremblay J. Cushing's syndrome variants secondary to aberrant hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15:375–82
63. Bertherat J, Bertagna X. 2009 Pathogenesis of adrenocortical cancer *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23 261–271
64. Reincke M, Beuschlein F, Slawik M, Borm K 2000 Molecular adrenocortical tumourigenesis. *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3:63-68

65. Hsiao HP, Kirschner LS, Bourdeau I, Keil MF, Boikos SA, Verma S, Robinson-White AJ, Nesterova M, Lacroix A, Stratakis CA 2009 Clinical and genetic heterogeneity, overlap with other tumor syndromes, and atypical glucocorticoid hormone secretion in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia compared with other adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab*;94:2930–2937
66. Baldacchino V, Oble S, Hamet P, Tremblay J, Bourdeau I, Lacroix A 2005 The Sp transcription factor family is involved in the cellular expression of the human GIP-R gene promoter. *Endocr Res* 35, 61–71
67. Miyamura N, Taguchi T, Murata Y, Taketa K, Iwashita S, Matsumoto K, Nishikawa T, Toyonaga T, Sakakida M & Araki E. 2002 Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines. *Endocrine* 19 319–326
68. Gagliardi L, Hotu C, Casey G, Braund WJ, Ling KH, Dodd T, Manavis J, Devitt PG, Cutfield R, Rudzki Z, Scott HS, Torpy DJ. 2009 Familial vasopressin-sensitive ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (VPs-AIMAH): clinical studies of three kindreds. *Clinical Endocrinology* 70, 883–891
69. Young WF 2007 Adrenal causes of hypertension: pheochromocytoma and primary aldosteronism. *Rev Endocr Metab Disord* 8(4):309-20.
70. Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. 2007 Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation *Trends in Molecular Medicine* 13(12):503-11
71. Metaye T, Gibelin H, Perdrisot R, Kraimps JL. 2005 Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. *Cell Signal.*; 17:917–928
72. Day KR, Jagadeeswaran P. 2009 Microarray analysis of prothrombin knockdown in zebrafish. *Blood Cells Mol Dis.* 2009;43(2):202-10
73. Yoo NJ, KIM YR. 2011 Expressional and mutational analysis of PHLDA3 gene in common human cancers. *Pathology* 43(5):510-1
74. Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A, Mazzuco TL, Tremblay J, Hamet P 2010 Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. *Clinical Endocrinology* 73, 1–15
75. Ribeiro RC, Pinto EM, Zambetti GP. 2010 Familial predisposition to adrenocortical tumors: Clinical and biological features and management strategies. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*;24(3):477-90.
76. Kutoh, E., N. Ogenae, A. Claeskens, W. Verheyen, P. Cheyngs, J. Neefs, and P. Kaijen. 2000. A putative white adipose tissue specific nuclear orphan receptor that

interacts with the cAMP-response element of the human β 3-adrenergic receptor gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 165:85-95.

77. Yeh CK, Chandrasekar B, Lin AL, Dang H, Kamat A, Zhu B, Katz MS 2012 Cellular signals underlying β -adrenergic receptor mediated salivary gland enlargement. *Differentiation*;83(1):68-76.
78. Volpi S, Rabadan-Diehl C, Aguilera G. 2004 Vasopressinergic regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis and stress adaptation. *Stress.*;7(2):75–83.
79. Walum H, et al. 2008 Genetic variation in the vasopressin receptor 1a gene (AVPR1A) associates with pair-bonding behavior in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 105:14153–14156.

Annexe

refSNP rs3743771 with alleles A/G in dbSNP b126 ([dbSNP report](#) | [Ensembl SNPview](#))
chr16:51915940..51915940, (+) strand relative to the human reference sequence

Population	Genotype frequencies									Allele frequencies								
	genotype			freq			count			Total	Ref-allele		Other-allele		Total			
	genotype	freq	count	genotype	freq	count	genotype	freq	count	Total	allele	freq	count	allele	freq	count	Total	
ASW (A)	A/A	0.702	40	A/G	0.298	17	G/G	0	0	57	A	0.851	97	G	0.149	17	114	retrieve genotypes
CEU (C)	A/A	0.536	60	A/G	0.429	48	G/G	0.036	4	112	A	0.750	168	G	0.250	56	224	retrieve genotypes
CHB (H)	A/A	0.556	75	A/G	0.393	53	G/G	0.052	7	135	A	0.752	203	G	0.248	67	270	retrieve genotypes
CHD (D)	A/A	0.514	56	A/G	0.440	48	G/G	0.046	5	109	A	0.734	160	G	0.266	58	218	retrieve genotypes
GIH (G)	A/A	0.580	58	A/G	0.360	36	G/G	0.060	6	100	A	0.760	152	G	0.240	48	200	retrieve genotypes
JPT (J)	A/A	0.717	81	A/G	0.257	29	G/G	0.027	3	113	A	0.845	191	G	0.155	35	226	retrieve genotypes
LWK (L)	A/A	0.624	68	A/G	0.349	38	G/G	0.028	3	109	A	0.798	174	G	0.202	44	218	retrieve genotypes
MEX (M)	A/A	0.759	44	A/G	0.224	13	G/G	0.017	1	58	A	0.871	101	G	0.129	15	116	retrieve genotypes
MKK (K)	A/A	0.532	83	A/G	0.442	69	G/G	0.026	4	156	A	0.753	235	G	0.247	77	312	retrieve genotypes
TSI (T)	A/A	0.569	58	A/G	0.392	40	G/G	0.039	4	102	A	0.765	156	G	0.235	48	204	retrieve genotypes
YRI (Y)	A/A	0.741	109	A/G	0.245	36	G/G	0.014	2	147	A	0.864	254	G	0.136	40	294	retrieve genotypes

Note: the 'reference' allele is the base observed in the reference genome sequence at this location

Population descriptors:

ASW (A): African ancestry in Southwest USA
 CEU (C): Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection
 CHB (H): Han Chinese in Beijing, China
 CHD (D): Chinese in Metropolitan Denver, Colorado
 GIH (G): Gujarati Indians in Houston, Texas
 JPT (J): Japanese in Tokyo, Japan
 LWK (L): Luhya in Webuye, Kenya
 MEX (M): Mexican ancestry in Los Angeles, California
 MKK (K): Maasai in Kinyawa, Kenya
 TSI (T): Tuscan in Italy
 YRI (Y): Yoruban in Ibadan, Nigeria

Figure 27 : Fréquences du SNP rs3743771 relatif au gène *CHD9* (tiré du site HapMap)

refSNP rs504122 with alleles C/T in dbSNP b126 ([dbSNP report](#) | [Ensembl SNPview](#))
chr13:79809526..79809526, (+) strand relative to the human reference sequence

Population	Genotype frequencies									Allele frequencies								
	genotype			freq			count			Total	Ref-allele		Other-allele		Total			
	genotype	freq	count	genotype	freq	count	genotype	freq	count	Total	allele	freq	count	allele	freq	count	Total	
ASW (A)	G/G	0.807	46	A/G	0.175	10	A/A	0.018	1	57	G	0.895	102	A	0.105	12	114	retrieve genotypes
CEU (C)	G/G	0.496	56	A/G	0.407	46	A/A	0.097	11	113	G	0.699	158	A	0.301	68	226	retrieve genotypes
CHB (H)	G/G	0.350	48	A/G	0.467	64	A/A	0.182	25	137	G	0.584	160	A	0.416	114	274	retrieve genotypes
CHD (D)	G/G	0.239	26	A/G	0.578	63	A/A	0.183	20	109	G	0.528	115	A	0.472	103	218	retrieve genotypes
GIH (G)	G/G	0.574	58	A/G	0.317	32	A/A	0.109	11	101	G	0.733	148	A	0.267	54	202	retrieve genotypes
JPT (J)	G/G	0.381	43	A/G	0.425	48	A/A	0.195	22	113	G	0.593	134	A	0.407	92	226	retrieve genotypes
LWK (L)	G/G	0.973	107	A/G	0.027	3	A/A	0	0	110	G	0.986	217	A	0.014	3	220	retrieve genotypes
MEX (M)	G/G	0.345	20	A/G	0.466	27	A/A	0.190	11	58	G	0.578	67	A	0.422	49	116	retrieve genotypes
MKK (K)	G/G	0.769	120	A/G	0.192	30	A/A	0.038	6	156	G	0.865	270	A	0.135	42	312	retrieve genotypes
TSI (T)	G/G	0.441	45	A/G	0.461	47	A/A	0.098	10	102	G	0.672	137	A	0.328	67	204	retrieve genotypes
YRI (Y)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	retrieve genotypes

Note: the 'reference' allele is the base observed in the reference genome sequence at this location

Population descriptors:

ASW (A): African ancestry in Southwest USA
 CEU (C): Utah residents with Northern and Western European ancestry from the CEPH collection
 CHB (H): Han Chinese in Beijing, China
 CHD (D): Chinese in Metropolitan Denver, Colorado
 GIH (G): Gujarati Indians in Houston, Texas
 JPT (J): Japanese in Tokyo, Japan
 LWK (L): Luhya in Webuye, Kenya
 MEX (M): Mexican ancestry in Los Angeles, California
 MKK (K): Maasai in Kinyawa, Kenya
 TSI (T): Tuscan in Italy
 YRI (Y): Yoruban in Ibadan, Nigeria

Figure 28 : Fréquences du SNP rs504122 relatif au gène *SPRY2* (tiré du site HapMap)