

# UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

---

## THÈSE

pour obtenir le grade de

## DOCTEUR

Sciences de la Vie et de la Santé

Ecole Doctorale : Gc2ID / Discipline : Génétique Humaine

présentée et soutenue publiquement

par **Laurence AMAR**

le jeudi 15 novembre 2012

**Sujet : IDENTIFICATION DE NOUVELLES OPTIONS  
THÉRAPEUTIQUES ET DIAGNOSTIQUES DANS  
L'HYPERALDOSTÉRONISME PRIMAIRE**

Jury :

Dr Maria-Christina ZENNARO	Directeur de thèse
Pr Michel AZIZI	Directeur de thèse
Dr Jacques BARHANIN	Rapporteur
Pr Antoine TABARIN	Rapporteur
Pr Xavier BERTAGNA	Examineur
Pr Faiez ZANNAD	Examineur
Pr Hervé LEFEBVRE	Examineur.

***Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité INSERM U970 (Dr Alain Tedgui, Centre de recherche cardiovasculaire PARCC HEGP – Paris), ainsi que dans le Centre d'Investigation Clinique 9201 de l'Hôpital Européen Georges Pompidou à Paris (Pr Michel Azizi).***

**Titre** Identification de nouvelles options thérapeutiques et de nouveaux marqueurs diagnostiques dans l'Hyperaldostéronisme primaire

**Résumé :** L'hyperaldostéronisme primaire [HAP] résulte d'une hypersécrétion d'aldostérone d'origine surrénale. La compréhension de la pathogénie de cette maladie, dont la prévalence est estimée à 10% de la population hypertendue, est essentielle pour le développement de nouveaux outils diagnostiques et thérapeutiques. Dans ce contexte, ce travail de doctorat avait pour but d'identifier de nouvelles orientations thérapeutiques en testant un inhibiteur de l'aldostérone synthase et de rechercher de nouveaux marqueurs diagnostiques par l'étude du profil d'expression des microARN [miRs].

Dans une étude de phase II, 14 patients présentant un HAP ont reçu un inhibiteur de l'aldostérone synthase : le LCI699 pendant 4 semaines. Nous avons ainsi pu montrer que le LCI699 permet de diminuer les concentrations d'aldostérone de 70 à 80% et de normaliser la kaliémie chez tous les patients. En revanche, il n'a qu'un effet modéré sur la pression artérielle et sur l'élévation des concentrations de rénine, et n'est que partiellement sélectif pour l'aldostérone synthase. De plus son efficacité est moindre que celle de l'éplérénone, antagoniste minéralocorticoïde administré aux mêmes patients au décours du LCI699.

Nous avons ensuite étudié l'expression de 754 miRs dans des adénomes produisant de l'aldostérone [APA] et dans des surrénales contrôles. L'hypothèse était qu'une dérégulation de leur expression pouvait être impliquée dans la tumorigénèse et la surproduction d'aldostérone. L'objectif secondaire était d'identifier des miRs utilisables en tant que biomarqueurs.

Cette analyse par carte microfluidique a révélé que 27 miRs sont significativement sous exprimés dans les APA et un seul miR est surexprimé. L'expression différentielle de deux de ces miRs : miR 137 et miR 375 a pu être confirmée dans une cohorte de validation de 36 APA: Des résultats préliminaires *in vitro* indiquent que le miR 375 pourrait induire une diminution de la synthèse d'aldostérone. Enfin, l'analyse de l'expression de ces miRs dans le plasma a permis de mettre en évidence une sous-expression du miR 375 chez les patients atteints d'HAP en comparaison à des sujets sains.

En conclusion, le blocage de la biosynthèse de l'aldostérone représente une nouvelle option thérapeutiques, cependant il est nécessaire de développer une seconde génération de molécules : plus puissantes et plus sélectives.

Les analyses effectuées sur les APA ouvrent de nouvelles perspectives pour l'identification de nouveaux biomarqueurs tels que les miRs circulants.

**Mots clés :** Hyperaldostéronisme primaire- Adénome sécrétant de l'aldostérone- microARN- Inhibiteur de l'aldostérone synthase- Dab2.

**Title :** Identification of new treatment and diagnostic options in Primary Aldosteronism

**Abstract:** Primary aldosteronism [PA] results from the hypersecretion of aldosterone by the adrenals. Understanding the pathogenesis of the disease is essential for identifying new diagnostic and therapeutic tools. In this context the purpose of my PHD was to investigate the effects of an aldosterone synthase inhibitor and second to investigate new diagnostic options by the extensive study of microRNA [miRNA].

In a phase II clinical study, 14 patients with PA were administered an aldosterone synthase inhibitor: LCI699. Four weeks of treatment lead to a 70 to 80% decrease in aldosterone concentration, associated with the cure of hypokalemia. However, there was only a mild effect on blood pressure and volemia (reflected by renin concentration). In addition, these results demonstrated an incomplete selectivity of LCI699 for aldosterone synthase *in vivo*, and showed that LCI699 is less potent than the blocker of the mineralocorticoid receptor: eplerenone .

We also characterized the miRNA profile of Aldosterone producing adenomas [APA]. The hypothesis was that a dysregulation of the expression of miRNA could induce tumorigenesis and increase the production of aldosterone. The secondary aim of the study was to identify miRNA that could be measured in plasma as biomarkers. miRNA profiling of 754 miRNA using quantitative PCR Low Density array, revealed 28 miRNA whose expression was significantly different in APA. The differential expression of two miRNA: miRNA 137 and miRNA 375 was confirmed in a validation cohort of 36 APA. Preliminary *in vitro* studies showed that up-regulation of intracellular levels of miR 375 may reduce aldosterone secretion in H295R cells. Lastly, circulating plasma levels of miR 375 are differentially expressed between patients with PA and healthy volunteers.

In conclusion, the blocking of the aldosterone pathway in hypertensive patients is a novel therapeutic option but second-generation drugs more potent and more selective of aldosterone synthase are required. Profiling miRNA in APA offers new prospect for the development of biomarkers, such as measuring circulating miRNA in plasma.

**Keywords:** Primary Aldosteronism, Aldosterone producing adenoma, microRNA, aldosterone synthase inhibitor, Disabled 2

## REMERCIEMENTS

*Je remercie le Pr Xavier Bertagna pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Monsieur, depuis mon arrivée dans votre service en tant qu'externe en ... 1995 j'ai toujours pu bénéficier de vos conseils et de votre enseignement; je vous en remercie chaleureusement.*

*Je remercie également le docteur Jacques Barhanin, le Pr Antoine Tabarin, le Pr Hervé Lefebvre, le Pr. Faiez Zannad . Messieurs, je mesure pleinement l'honneur que vous me faites en prenant le temps de participer à ce jury et d'évaluer mon travail.*

*Je remercie très sincèrement le Pr Michel Azizi pour m'avoir confié ce projet et pour l'avoir dirigé avec enthousiasme. Monsieur, je vous remercie de m'avoir fait confiance, et de m'avoir guidée tout au long de ces années. J'espère avoir le privilège de travailler dans votre équipe pour encore de nombreuses années.*

*Je remercie également le Dr Maria-Christina Zennaro pour m'avoir dirigée durant ces années de thèse. Christina, je te remercie pour ta disponibilité et ta rigueur scientifique. Je te remercie de m'avoir initiée et guidée dans le monde de l'aldostérone. Merci également pour ta relecture attentive de ce manuscrit, pour tes corrections et tes remarques. J'espère que nous finirons par le trouver ce fameux biomarqueur....*

*Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au Pr Xavier Jeunemaitre Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire hospitalier puis dans votre équipe de recherche. Merci pour vos précieux conseils aussi bien scientifiques que stratégiques....*

*Quant au Pr Pierre-Francois Plouin, je ne sais même pas comment je pourrais le remercier. Il y aurait tant à dire.... Pierre-Francois, merci pour m'avoir initiée au monde de l'Hypertension, pour m'avoir encouragée à poursuivre dans la carrière hospitalo-universitaire, pour m'avoir appris la rigueur, pour être toujours disponible pour moi. J'espère très sincèrement que je serai à la hauteur de tout cet enseignement et que je ne vous décevrai pas.*

*Je remercie également le Pr Anne-Paule Gimenez-Roqueplo. Anne-Paule, depuis mon premier jour de DEA tu as toujours été là pour moi pour me soutenir, pour me former et pour m'aider aussi bien sur le plan professionnel que personnel.*

*Je remercie toute l'équipe « aldo ». Sheerazed, je pense que je n'y serai jamais arrivée sans ton aide au quotidien, aussi bien pour les « manips » pour leur interprétation que pour la rédaction de mon manuscrit de thèse. Isabelle, la reine de la culture cellulaire et des western, merci pour ton aide et ton soutien. Amanda, I will never forget all these moments in the culture room. I wish you all the best and thank you again for you help. Benoit, je pense que l'équipe ne serait pas la même sans ta gentillesse et ta disponibilité. Fabio, mon « maître » qui m'a initiée aux extractions d'ARN, aux gels RNase free, aux constructions de plasmides, à la qPCR..... Je ne sais pas comment tu peux être aussi patient en tous cas merci beaucoup. Edwige, malgré ton « abandon » sur la dernière ligne droite, merci de ton soutien et de tes encouragements dans les bons moments et dans les moments plus difficiles !*

*Je remercie le Pr Bertherat, le Pr Tissier, le Pr Lefebvre, et le Pr Menard pour leur aide dans la réalisation de ce projet. Sans les blocs de Cochin, les surrénales de Rouen, et la création du protocole sur les inhibiteurs de l'aldostérone synthase, cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Merci à vous ! Merci également à Séverine Peyrard, Nicolas Cagnard et Dewi Vernerey pour avoir réalisé les analyses statistiques.*

*Je remercie également mon comité de soutien : Judith, Nelly, Charlotte, Emmanuelle. Les filles, merci d'être toujours là pour les fous-rire, les moments importants, les coups-de gueule et les crises de larmes....*

*Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe 3 de l'U970 ainsi que toute l'équipe du CIC pour les bons moments passés en votre compagnie, pour nos échanges scientifiques et humains. Je remercie tout particulièrement Céline et Julie pour leur dynamisme et leur gentillesse. Merci à Catherine et Jeanne pour leur efficacité et leur disponibilité, et toujours avec le sourire !*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens également à remercier l'équipe médicale (Nicolas Postel-Vinay, Tiphaine Vidal Trecan, Guillaume Bobrie) et paramédicale (Caroline, Dominique, Céline) du 7<sup>e</sup> en HTA. Grâce à vous : venir à l'hôpital le matin est un plaisir et un privilège.... Guillaume, merci pour tes précieux conseils aussi bien médicaux que personnels.*

*Enfin, je remercie de tout mon cœur mes parents, ma sœur Karine, mon frère Eric, mon beau-frère Benjamin et mon amie Chérine pour m'avoir toujours encouragée et soutenue tout au long de ces années. Merci également pour votre relecture attentive de ce manuscrit.*

*Quant à vous David, Jérémie, Noémie et Nathan merci de donner un sens à ma vie. Merci également au bébé à venir de se tenir tranquille encore jusqu'au 15 Novembre....*

*Mes derniers remerciements vont aux patients et à leurs familles.*

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>11</b>
<b>A. DÉFINITION .....</b>	<b>13</b>
<b>B. LA SURRÉNALE .....</b>	<b>13</b>
I. Un peu d'histoire.....	13
II. Embryologie.....	14
III. Histologie.....	15
<b>C. PHYSIOLOGIE.....</b>	<b>16</b>
I. Biosynthèse de l'aldostérone.....	16
II. Régulation de la biosynthèse d'aldostérone.....	18
1. Spécificité de la production d'aldostérone .....	18
2. Régulation de la biosynthèse.....	19
III. Action de l'aldostérone .....	25
1. Effets Génomiques .....	25
2. Effets non génomiques .....	28
<b>D. PATHOPHYSIOLOGIE .....</b>	<b>28</b>
I. Rôle des canaux potassiques.....	29
1. La dépolarisation de la cellule glomérulée .....	29
2. Le canal Kir 3.4 .....	29
3. Autres canaux potassiques.....	32
II. Autres voies de signalisation potentiellement impliquées .....	35
III. Formes familiales .....	36
1. FH1 : Hyperaldostéronisme Familial de type 1 .....	36
2. FH2 : Hyperaldostéronisme Familial de type 2.....	37
3. FH3 : Hyperaldostéronisme Familial de type 3 .....	38
<b>E. ÉPIDÉMIOLOGIE.....</b>	<b>38</b>
<b>F. DIAGNOSTIC.....</b>	<b>39</b>
I. Mode de découverte.....	39
II. Indications du dépistage de l'HAP .....	40
III. Critères biologiques .....	40
1. Examen de dépistage.....	40
2. Examen de confirmation.....	42
<b>G. IMAGERIE.....</b>	<b>45</b>

I. La tomодensitométrie [TDM] .....	45
II. Le cathétérisme veineux surrénal .....	46
<b>H. ÉTIOLOGIES.....</b>	<b>48</b>
<b>I. COMPLICATIONS .....</b>	<b>49</b>
<b>J. TRAITEMENT.....</b>	<b>52</b>
I. Le Traitement Chirurgical .....	52
1. <i>Technique chirurgicale et morbidité.....</i>	<i>52</i>
2. <i>Résultats de la surrénalectomie laparoscopique .....</i>	<i>53</i>
II. Le Traitement Médical .....	54
1. <i>La spironolactone.....</i>	<i>54</i>
2. <i>L'éplérénone .....</i>	<i>55</i>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>59</b>
<b>A. TRAVAUX ANTÉRIEURS .....</b>	<b>61</b>
I. L'aldostérone synthase .....	61
II. Le déficit en aldostérone synthase.....	62
1. <i>Modèles murins d'inactivation de l'AS.....</i>	<i>62</i>
2. <i>Pathologie humaine .....</i>	<i>63</i>
III. L'inhibition de l'aldostérone synthase dans l'HAP .....	64
1. <i>Facteurs limitants de l'utilisation des antagonistes MR .....</i>	<i>64</i>
2. <i>Premières études : LE FAD286A.....</i>	<i>65</i>
3. <i>LCl699 : Phase I .....</i>	<i>66</i>
<b>B. TRAVAUX ACTUELS : PREUVE DE CONCEPT CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'HAP : ARTICLE 1.....</b>	<b>67</b>
I. Contexte .....	67
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>70</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>90</b>

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>11 <math>\beta</math> HSD2</b>	11 $\beta$ hydrostéroïde déshydrogénase de type 2
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>APA</b>	Adénome produisant de l'aldostérone
<b>ARNm</b>	ARN messager
<b>AS</b>	Aldostérone Synthase
<b>BK</b>	canal potassique calcium dépendant de grande conductance
<b>CI</b>	Concentration Inhibitrice
<b>CMO</b>	Corticostérone méthyl oxydase
<b>Composé S</b>	11-désoxycortisol
<b>CYP11B1</b>	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1
<b>CYP11B2</b>	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2
<b>DAX1</b>	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
<b>DOC</b>	11-déoxycorticostérone
<b>ENaC</b>	Canal épithélial à sodium sensible à l'amiloride
<b>FH1</b>	Hyperaldostéronisme Familial de type 1
<b>FH2</b>	Hyperaldostéronisme Familial de type 2
<b>FH3</b>	Hyperaldostéronisme Familial de type 3
<b>HAP</b>	Hyperaldostéronisme primaire
<b>HRE</b>	Hormon Response Element
<b>HTA</b>	Hypertension Artérielle
<b>HVG</b>	Hypertrophie Ventriculaire Gauche
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol 1,4,5-triphosphate
<b>KCNK</b>	potassium channel, subfamily K
<b>KTVS</b>	Cathétérisme des veines surrénales
<b>MAPA</b>	Mesure Ambulatoire de la Pression Artérielle
<b>miR</b>	MicroARN
<b>MR</b>	Récepteur minéralocorticoïde

## ABRÉVIATIONS

<b>PA</b>	Pression Artérielle
<b>PAD</b>	Pression Artérielle Diastolique
<b>PAS</b>	Pression Artérielle Systolique
<b>RAR</b>	Rapport Aldostérone sur rénine
<b>SF1</b>	Steroidogenic Factor type 1
<b>StAR</b>	Steroidogenic acute regulatory protein
<b>TASK</b>	TWIK-related acid-sensitive K(+) channel
<b>TDGF1</b>	Teratocarcinoma Derived Growth factor 1 (TDGF1)
<b>TDM</b>	Tomodensitométrie
<b>TLDA</b>	TaqMan Low Density Array
<b>UTR</b>	Untranslated Region
<b>VSNL1</b>	Visinin-like 1

# **INTRODUCTION**

L'HYPERALDOSTÉRONISME PRIMAIRE

PRÉSENTATION GÉNÉRALE



## **A. DÉFINITION**

L'Hyperaldostéronisme Primaire [HAP] est une affection due à la surproduction d'aldostérone par la zone glomérulée de la surrénale. Elle se caractérise par l'association d'une rétention de sodium et d'une excrétion urinaire de potassium accrue, ce qui se traduit au niveau phénotypique par une hypertension artérielle [HTA] pouvant être associée à une hypokaliémie. Cette pathologie a été décrite pour la première fois par J. Conn (Conn, 1955) chez une patiente de 34 ans présentant une HTA sévère et une faiblesse des membres inférieurs. Il a ensuite établi que l'HAP est caractérisé par la suppression de rénine dans le plasma (Conn, 1964). Des recommandations internationales publiées en 2008, définissent l'HAP comme une situation au cours de laquelle la production d'aldostérone est anormalement élevée, relativement autonome du système rénine-angiotensine, et non supprimable par la charge en sel (Funder, 2008).

## **B. LA SURRÉNALE**

### **I. Un peu d'histoire...**

Les surrénales ont été décrites pour la première fois par Bartholomeo Eustacius il y a 450 ans. La zonation de la glande et l'existence de deux parties : le cortex et la médulla, ont été décrits peu de temps après.(Stewart).

Toutefois ce n'est que bien plus tard que le rôle fonctionnel de la surrénale a été défini grâce à la description de l'autopsie dans 11 cas de "maladie d'Addison" par Thomas Addison en 1855. Un an plus tard, Brown-Séquard démontrait que les glandes surrénales étaient des «organes essentiels pour la vie» en effectuant des surrénalectomies bilatérales chez des mammifères. En 1896, William Osler administre un extrait de glandes surrénales à un patient atteint de maladie d'Addison, un « exploit » répété par d'autres à la fois dans des études animales et humaines durant les 40 années suivantes. C'est ainsi qu'entre 1937 et 1955, les hormones surrénales ont pu être isolées et leur structure définie. Ainsi, les percées notables ont été la découverte de la cortisone ainsi que l'évaluation clinique de son effet anti-inflammatoire chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (Hench, 1949) et l'isolement de l'aldostérone (Simpson, 1952).

La surrénale adulte est une glande de structure pyramidale mesurant approximativement 2x5x1cm dans des conditions normales et pesant entre 2 et 7g. Elle est située au dessus du rein au niveau postéro médial.

## II. Embryologie

La surrénale se compose de deux parties distinctes aussi bien par leur origine embryologique que par leur fonction :

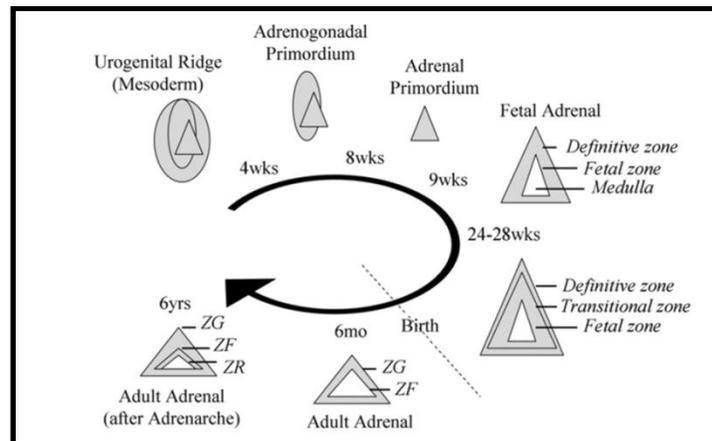
- La médullosurrénale située au centre de la glande provient du neuroectoderme. Elle est constituée de cellules chromaffines et comme les autres ganglions du système sympathique, elle sécrète des catécholamines : de l'adrénaline, de la noradrénaline et de la dopamine.
- Le cortex, lui, situé en périphérie, provient du mésoblaste. L'ébauche corticale primitive provient de l'épithélium mésoblastique juxtacoelomique. Vers la 5<sup>e</sup> semaine du développement, les cellules mésoblastiques commencent à proliférer et envahissent le mésenchyme sous-jacent. Elles vont conduire à la formation de deux zones après la 9<sup>e</sup> semaine: l'une interne constituant le cortex fœtal et l'autre externe constituant le cortex permanent. La morphologie du cortex reste relativement constante jusqu'à la 20<sup>e</sup> semaine avec une prédominance de cortex fœtal (qui représenterait 75% du cortex). Par la suite une troisième zone va se développer. La zone transitionnelle située entre le cortex fœtal et le cortex permanent pourrait sécréter du cortisol. A partir de la 30<sup>e</sup> semaine, cette zone transitionnelle commencerait à prendre l'aspect de la zone fasciculée, et le cortex définitif deviendrait la zone glomérulée (Tissier, 2007) (cf. Figure 1).

Plusieurs facteurs parmi lesquels *SFI* (Steroidogenic Factor de type 1) et *DAX1* (nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1) sont essentiels pour le développement et la différenciation du cortex surrénal.

*SFI* est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs gènes responsables de la stéroïdogénèse. Des études effectuées sur des embryons de souris montrent que *SFI* est exprimé avant que la surrénale n'acquiert un phénotype stéroïdogénique. De plus les souris invalidées pour le gène *SFI* ont une agénésie complète de la surrénale (Luo, 1994).

*DAX1* est également un facteur de transcription. Il est nécessaire au développement du cortex définitif mais il semblerait qu'il ne soit pas lié au développement du cortex fœtal (Keegan, 2002).

D'autres facteurs sont impliqués dans le développement du cortex surrénal parmi lesquels le gène *WT1*, la voie Wnt/ $\beta$  Caténine, des facteurs de croissance (EGF, IGF1...) ainsi que des hormones (ACTH, HCG, Œstrogènes placentaires...) (Mesiano, 1997).



**Figure 1: Schéma du développement du cortex de la surrénale. D'après (Kempná, 2008)**

*Le cortex surrénal provient du mésoderme, tout comme le reste du tractus urogénital. Après 9 semaines de gestation, le cortex surrénal se sépare en cortex définitif et en cortex fœtal. À 20 semaines, une zone transitionnelle apparaît. À la naissance, le cortex fœtal régresse pour former la surrénale adulte. À 6 mois, le cortex surrénal est composé de deux zones : la zone glomérulée et la zone fasciculée. La zone réticulée n'apparaît elle que bien plus tard, vers l'âge de 6 ans.*

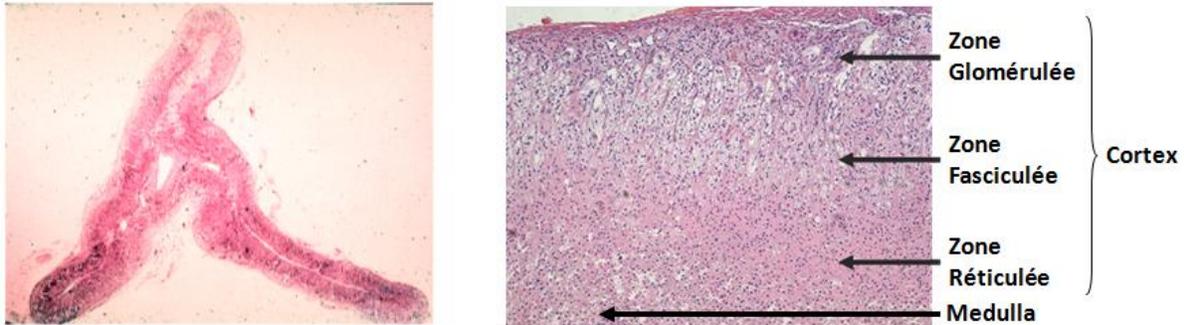
Les mécanismes à l'origine de la zonation du cortex surrénal ne sont pas encore élucidés. Il est cependant accepté que la zone fasciculée et la zone glomérulée se développent au cours de la gestation alors que la zone réticulée n'apparaît que beaucoup plus tard, vers l'âge de 6 ans.

### III. Histologie

Ces trois zones ont des fonctions distinctes : la zone glomérulée est le lieu de la biosynthèse des minéralocorticoïdes, la zone fasciculée des glucocorticoïdes et la zone réticulée des androgènes (Kempná, 2008).

Des colorations histologiques standards (en Hématoxyline-Eosine-Safran) permettent de différencier ces trois couches de cellules (cf. Figure 2) :

- la zone glomérulée est constituée de cellules claires de petite taille organisées de manière concentrique. Elle est située en périphérie de la glande juste au dessous de la capsule et représente environ 15% du cortex surrénal.
- la zone fasciculée est constituée de larges cellules claires organisées en réseau. Elle représente 75% du cortex surrénal.
- la zone réticulée est constituée de cellules éosinophiles ou compactes de petite taille. Elle est située au contact de la medulla.



**Figure 2: Coloration Hématoxyline Eosine Safran d'une surrénale humaine normale.**

*Sur l'agrandissement on peut visualiser la médulla, ainsi que les 3 zones du cortex : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée.*

## **C. PHYSIOLOGIE**

### **I. Biosynthèse de l'aldostérone**

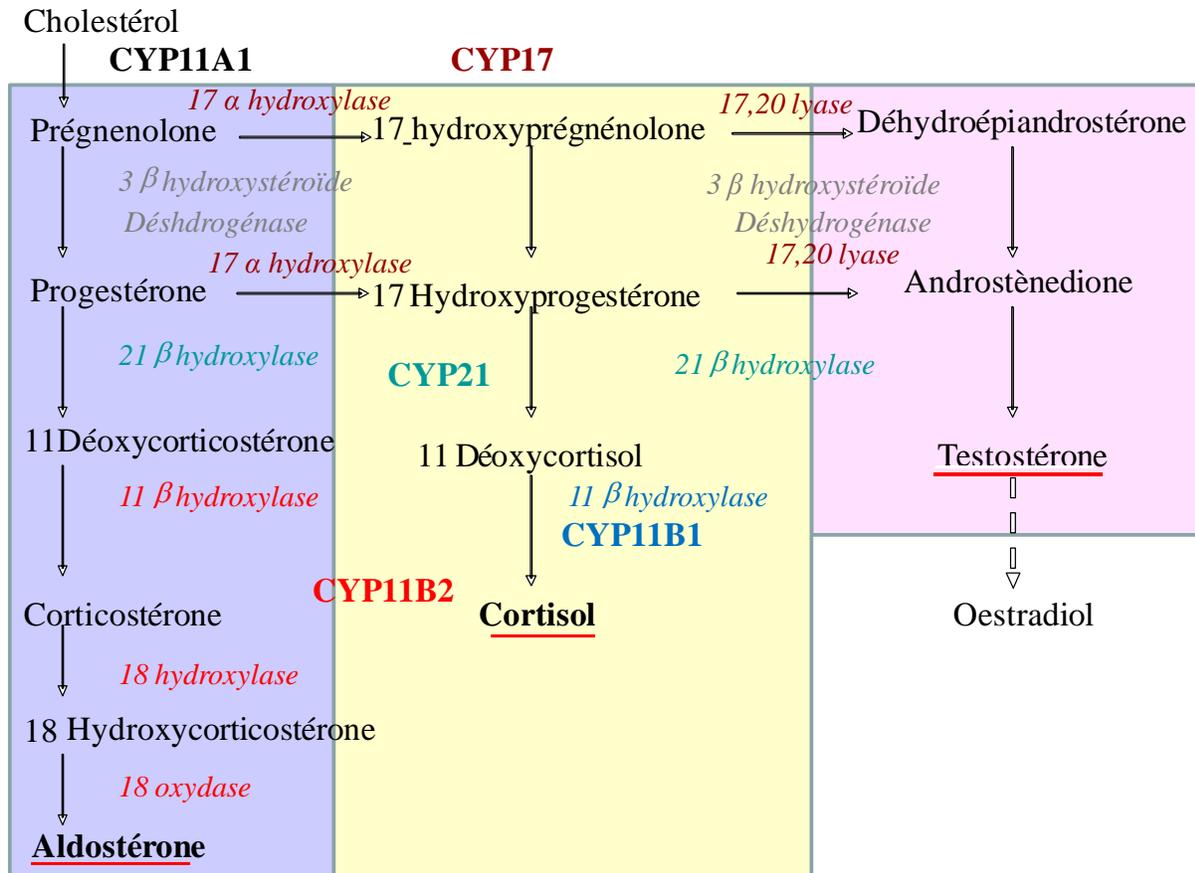
Chez les mammifères, dont l'homme, la production d'aldostérone provient essentiellement de la zone glomérulée de la surrénale (Hattangady, 2012). L'aldostérone est synthétisée lors d'une cascade enzymatique qui met en jeu trois cytochromes P450 différents et une hydroxystéroïde déshydrogénase (cf. Figure 3).

Comme toutes les hormones stéroïdes, les cellules de la glomérulée utilisent le cholestérol comme précurseur de la stéroïdogénèse. Celui ci peut provenir de différentes sources:

- l'endocytose des LDL circulants et leur stockage dans les endosomes
- la synthèse de novo à partir d'esters de cholestérol dans le réticulum endoplasmique.

Ce cholestérol libre est transporté à l'intérieur de la mitochondrie par la protéine StAR (Steroidogenic acute Regulatory Protein). Cette première étape constitue une étape clé de la

régulation de la biosynthèse de l'aldostérone comme nous l'aborderons dans le paragraphe suivant. Cette protéine est régulée au niveau transcriptionnel et post traductionnel (Manna, 2009)



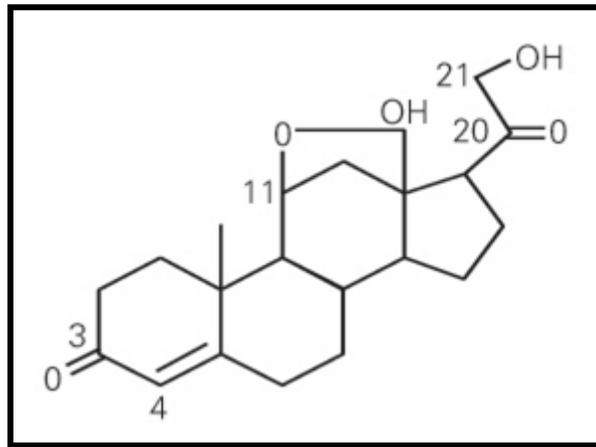
**Figure 3: Biosynthèse des hormones stéroïdes dans le cortex surrénal.**

La zone glomérulée est représentée en bleu, la zone fasciculée en beige et la zone réticulée en rose

La première réaction de la stéroïdogénèse est la conversion du cholestérol en prégnénolone, catalysée par l'enzyme P450<sub>scc</sub> (side chain clivage). Cette enzyme, codée par le gène *CYP11A1* situé sur le chromosome 15 (Lieberman, 2001), clive la chaîne latérale du cholestérol en 3 réactions (une 20α-hydroxylation, une 22-hydroxylation et la coupure de la liaison entre C-20 et C-22). La prégnénolone est alors relarguée dans le cytosol où elle est convertie en progéstérone par déshydrogénation du groupe 3β-hydroxyl et par isomérisation de la double liaison en C-5 par la 3β-déshydrogénase, localisée à la membrane du réticulum endoplasmique lisse.

La progestérone est ensuite 21-hydroxylée par l'enzyme 21-hydroxylase, codée par le gène *CYP21A*, localisée à la surface du réticulum endoplasmique lisse pour produire la 11-déoxycorticostérone [DOC] (Shinzawa, 1988). La conversion de la DOC en aldostérone se fait ensuite par trois réactions enzymatiques consécutives : une 11 $\beta$ -hydroxylation de la DOC pour former la corticostérone, une 18-hydroxylation menant à la 18-hydroxycorticostérone (18-OH-B) et enfin une 18-méthoxydation pour la production d'aldostérone (cf.

**Figure 4).** Ces réactions enzymatiques sont catalysées par l'aldostérone synthase [AS], localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale, codée par le gène *CYP11B2* (cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2).



**Figure 4: Structure de l'aldostérone.**

*L'aldostérone est le 11, 21 dihydroxy, 18 alprégn-4-ène, 3, 20 dione.*

L'existence d'une sécrétion extrasurrénale d'aldostérone, notamment par le cœur et les vaisseaux est toujours controversée et ne sera pas abordée ici (McCurley, 2012).

## II. Régulation de la biosynthèse d'aldostérone.

### 1. Spécificité de la production d'aldostérone

La biosynthèse de l'aldostérone se produit de façon spécifique dans les cellules de la glomérulée grâce à différents facteurs :

- L'expression sélective de l'AS dans la glomérulée. Cette première régulation limite la synthèse d'aldostérone à une zone relativement fine du cortex de la surrénale. En effet,

deux études récentes dont l'une de notre groupe ont montré que dans la surrénale humaine, la zone glomérulée est discontinue (Boulkroun, 2010; Nishimoto, 2010). Ce phénomène pourrait être dû à une alimentation trop riche en sel de la population générale induisant un rétrocontrôle négatif sur le système rénine-angiotensine (Hattangady, 2012).

- L'absence d'expression de la 11  $\beta$  hydroxylase codée par *CYP11B1* (cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1) dans la zone glomérulée est le second élément clé de la spécificité de la localisation de la biosynthèse de l'aldostérone. En effet, la 11  $\beta$  hydroxylase, exprimée au niveau des zones fasciculées et réticulées, est responsable de la conversion du 11 désoxycortisol en cortisol, mais peut également convertir la 11 déoxycorticostérone en corticostérone.
- L'absence d'expression de la 17  $\alpha$  hydroxylase, codée par *CYP17*, qui permet la conversion de la prégnénolone en 17  $\alpha$  prégnénolone, précurseur de la synthèse du cortisol et des androgènes, est un autre élément conduisant à la spécificité de la biosynthèse de l'aldostérone par la zone glomérulée. (Narasaka, 2001).
- Enfin, le flux sanguin dans le cortex surrénal est centripète. Ainsi les précurseurs de l'aldostérone, synthétisés dans la zone fasciculée, ne peuvent accéder à *CYP11B2* exprimé dans la zone glomérulée, ce qui maintient la spécificité fonctionnelle des trois couches du cortex surrénal (Hattangady, 2012).

## 2. Régulation de la biosynthèse

La régulation de la synthèse d'aldostérone suite à un stimulus est divisée en deux événements clés dans la stéroïdogénèse (Hattangady, 2012) :

- En aigu, quelques minutes après le stimulus, la production d'aldostérone est régulée par le transfert du cholestérol dans la mitochondrie où il est converti en prégnénolone. Cette étape, appelée « étape de régulation précoce », est due à une augmentation de l'expression et de la phosphorylation de la protéine StAR (Manna, 2003).
- En chronique (de quelques heures à quelques jours), la production d'aldostérone est régulée au niveau des enzymes impliquées dans la synthèse d'aldostérone, et tout particulièrement *CYP11B2* (Bassett, 2004).

In vitro, de nombreux stimuli de la production d'aldostérone ont été rapportés (Spat, 2004) parmi lesquels : l'acétylcholine, l'angiotensine II, l'ACTH, les endorphines, l'endothéline, le potassium, la sérotonine, la parathormone, la noradrénaline, la prolactine, les prostaglandines...

En conditions physiologiques, le contrôle de la production d'aldostérone met en jeu différentes voies (cf. Figure 7) :

- une régulation endocrine par des facteurs circulants tels que l'angiotensine II et le potassium
- une régulation paracrine mettant en jeu des facteurs sécrétés par les cellules chromaffines (adrénaline, noradrénaline, ACTH, VIP....) ou les cellules du système immunitaire (Interleukine 1, Interleukine 6, sérotonine...)
- une régulation autocrine par des facteurs de croissance (IGF, EGF, FGF, TGF  $\beta$ )

### **Régulation endocrine**

- Le Système Rénine-Angiotensine

L'angiotensine II est l'octapeptide effecteur du système rénine-angiotensine-aldostérone. C'est par ce biais que l'aldostérone est régulée par la rénine de façon indirecte.

Différents stimuli contribuent à la libération de rénine :

- une baisse de la pression de perfusion rénale détectée directement par les barorécepteurs intra-rénaux ; ce qui induit une diminution de la concentration intracellulaire de calcium et une augmentation de la sécrétion de rénine. Inversement, une augmentation de la pression de perfusion rénale inhibe la sécrétion de rénine.
- une variation de la charge sodée de la macula densa.
- une stimulation du système sympathique : les cellules juxtaglomérulaires sont innervées par des fibres nerveuses sympathiques. L'activation des nerfs rénaux sympathiques et la stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques augmentent la sécrétion de rénine (King, 1993).

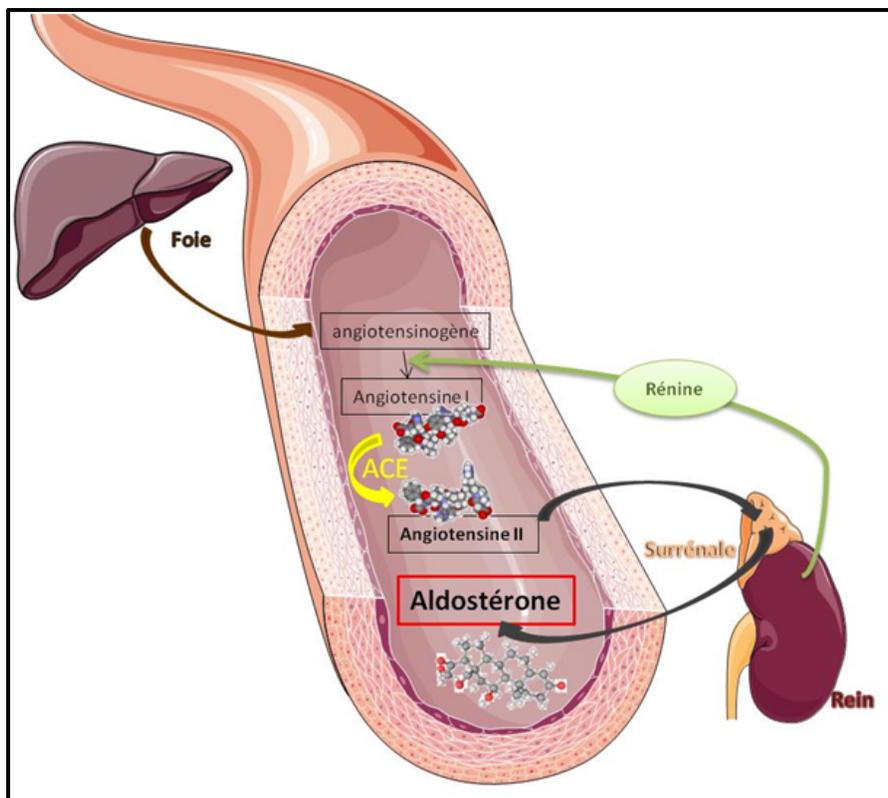
La rénine synthétisée par les cellules juxtaglomérulaires rénales clive l'angiotensinogène,  $\alpha$ -globuline synthétisée par le foie en angiotensine I. L'angiotensine I, décapeptide inactif, est ensuite clivée essentiellement par l'enzyme de conversion de l'angiotensine endothéliale et

circulante pour être convertie en angiotensine II (cf. Figure 5). D'autres enzymes peuvent aussi convertir l'angiotensine I en angiotensine II mais à un moindre niveau.

L'angiotensine II se fixe à son récepteur AT1, activant plusieurs voies de signalisation parmi lesquelles la voie calcique, la voie de la famille des src des tyrosines kinases et la voie de la 12-lipoxygénase (Bassett, 2004).

La liaison de l'angiotensine II à son récepteur induit une augmentation de la production d'inositol 1, 4,5-triphosphate [IP3] par l'activation de la phospholipase C. L'IP3 se lie à son récepteur situé au niveau du réticulum endoplasmique, ce qui entraîne un relargage des stocks intracellulaires de calcium et donc une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium.

L'angiotensine II entraîne également l'inhibition des canaux potassiques TASK (Twik acid-sensitive K channel) conduisant ainsi à une dépolarisation de la cellule, ce qui a pour conséquence l'activation de canaux calciques voltage dépendants de type L et T et l'entrée de calcium dans la cellule (Spat, 2004).



**Figure 5: Système rénine angiotensine aldostérone**

*La rénine, synthétisée par les cellules juxtaglomérulaires rénales, clive l'angiotensinogène en angiotensine I. Ensuite l'angiotensine I est prise en charge par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ou d'autres enzymes telles la chymase) pour être convertie en angiotensine II. L'angiotensine II induit alors la production d'aldostérone par la surrénale.*

### ➤ Le potassium

Des études *in vivo* chez des souris invalidées pour différents gènes du système rénine-angiotensine ont montré que le potassium peut se substituer à l'angiotensine II, stimuler l'expression de *CYP11B2* et augmenter ainsi la production d'aldostérone (Chen, 1997; Okubo, 1997).

*In vitro*, le traitement par potassium de cellules H295R (lignée cellulaire humaine dérivée du cortex surrénal) ou sur des cultures primaires de cellules de cortex surrénal de rat induit une augmentation de l'expression de *CYP11B2* tant au niveau messager que protéique (Denner, 1996; Yagci, 1996).

Dans les cellules de la zone glomérulée, la signalisation potassique consiste en une dépolarisation de la membrane induisant une entrée massive de calcium dans la cellule par des canaux de type T et L.

Le rôle du potassium dans la régulation de la biosynthèse de l'aldostérone a été souligné récemment par l'étude de l'inactivation des canaux TASK comme nous le verrons plus loin.

### L'activation de la voie Calcique

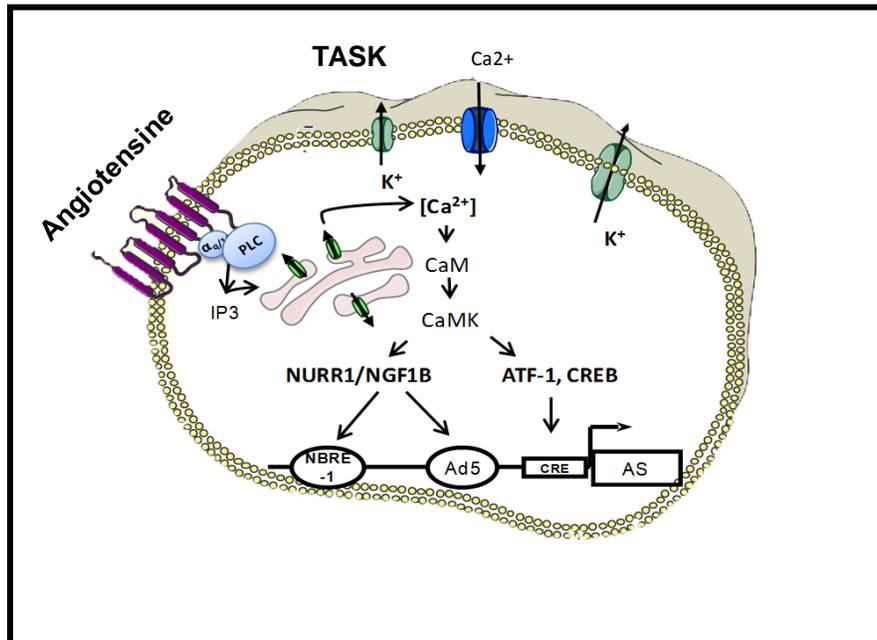
Suite à une stimulation par le potassium ou l'angiotensine II, la concentration intracellulaire en calcium se trouve fortement augmentée, ce qui entraîne toute une cascade de signalisation. Le calcium se lie à la calmoduline. Il permet ainsi l'activation des protéines kinases calcium/calmoduline dépendantes (CaM Kinases) qui vont phosphoryler et ainsi activer des facteurs de transcription spécifiques ainsi que la CRE binding protein [CREB] (Spat, 2004).

Les principaux facteurs de transcription activés par cette voie sont NURR1 (Nuclear receptor related 1 protein), NGF1B (Nerve Growth Factor 1), ATF-1 et CREB (Clyne, Zhang et al. 1997). Les complexes ATF-1/CREB et NGF1B/NURR1 activent la transcription de *CYP11B2* en se liant aux éléments en cis du gène *CYP11B2* : NBRE-1, Ad4, Ad5 et CRE. Cette augmentation de l'ARN messager [ARNm] de *CYP11B2* détermine directement la capacité de la zone glomérulée à produire l'aldostérone. (cf. Figure 6).

Le site NBRE-1 est un site spécifique de liaison pour les protéines de la famille de NGF1B parmi lesquels NGF1B et NURR1.

L'élément de réponse Ad5 est reconnu par les protéines SF1 et COUP-TF (COUP transcription factor 2), alors que Ad 4 est spécifique de SF1. Comme vu précédemment, SF1 est un facteur de transcription impliqué dans la stéroïdogénèse cependant il n'est régulé ni par l'angiotensine II, ni par la kaliémie. Son répresseur DAX1 n'est pas reconnu directement par les éléments de réponse

situés en 5' du gène *CYP11B2* et agit donc indirectement sur la production d'aldostérone (Bassett, 2004).



**Figure 6: Modèle simplifié de l'action de l'angiotensine II et du potassium sur la transcription de *CYP11B2*. Adapté de (Bandulik, 2010)**

*L'angiotensine II et l'hyperkaliémie entraînent une dépolarisation de la cellule conduisant à un influx de calcium intracellulaire. Ce calcium se lie à la calmoduline qui active les protéines kinases calmodulines. Celles-ci activent des facteurs de transcription parmi lesquels NURR1, NGF1B, ATF1, CREB qui se lient à des éléments de réponse du promoteur de *CYP11B2* et activent ainsi la transcription de l'AS.*

### **Régulation paracrine**

La régulation paracrine fait intervenir des signaux, ou transmetteurs provenant des cellules se trouvant à proximité. Différents facteurs ont été décrits, l'adrénaline, la noradrénaline, l'arginine vasopressine.... Nous nous intéresserons plus particulièrement à la sérotonine et à l'ACTH.

#### ➤ La sérotonine

La sérotonine, encore appelée 5 hydroxytyramine (5HT) est un neuromédiateur impliqué dans le système nerveux central. Elle peut aussi se comporter comme une hormone et avoir une action paracrine. Ainsi dans le cortex surrénal, la sérotonine libérée par les mastocytes, se lie à son récepteur 5HT4 exprimé par les cellules de la glomérulée ce qui stimule l'adénylcyclase et

l'influx intracellulaire de calcium conduisant à la production d'aldostérone et de cortisol (Lefebvre, 2001). Il a été montré que cet effet prédomine sur la production d'aldostérone et que des agonistes du récepteur 5 HT4 peuvent stimuler la production d'aldostérone *in vitro* (Lefebvre, 1993).

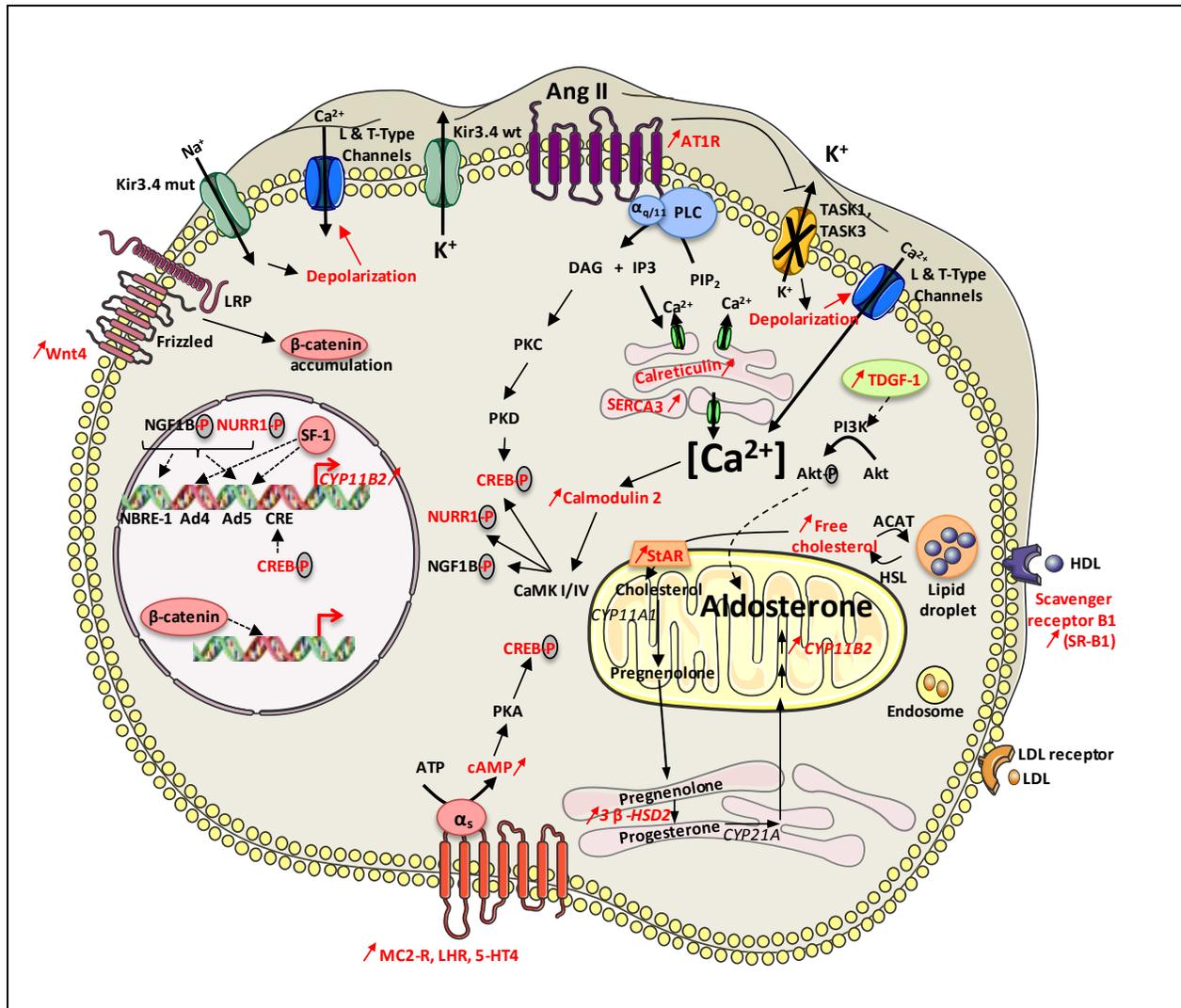


Figure 7: Schéma de la biosynthèse de l'aldostérone dans une cellule glomérulée. D'après (Zennaro, 2012).

L'angiotensine II et le potassium vont entraîner un influx de calcium en intracellulaire ce qui conduit à la phosphorylation des facteurs CREB, NURR1 et NGF1B.

La sérotonine et l'ACTH agissent via la voie de l'AMP cyclique, ce qui conduit à une augmentation de la phosphorylation de CREB. Ces facteurs de transcription vont alors se fixer sur les éléments de réponse spécifiques situés au niveau du promoteur de CYP11B2 et induire une augmentation de son expression, ainsi que la biosynthèse d'aldostérone.

### ➤ L'ACTH

Le rôle de l'ACTH dans la transcription de *CYP11B2* et dans production d'aldostérone semble secondaire. En effet, chez des souris qui ont subi une inactivation des cellules hypophysaires corticotropes, l'activité *CYP11B2* peut être maintenue avec de très faibles quantités d'ACTH, ce qui n'est pas le cas pour *CYP11B1* (Allen, 1995). De plus bien que l'ACTH augmente la production d'aldostérone en aigu aussi bien *in vivo* que *in vitro*, l'administration en chronique d'ACTH diminue l'expression de *CYP11B2* et la production d'aldostérone dans les modèles animaux (Bassett, 2004). Les mécanismes en cause ne sont pas encore clairement élucidés. L'ACTH induit une augmentation de l'AMP cyclique qui inhiberait l'expression des récepteurs de l'angiotensine II au niveau des cellules de la glomérulée (Bird, 1994).

### **La régulation autocrine**

La régulation autocrine (par la cellule elle-même) de la biosynthèse de l'aldostérone est plus marginale. Elle fait intervenir notamment des facteurs de croissance (IGF, EGF, FGF, TGF  $\beta$ ) ainsi que des interleukines.

## III. Action de l'aldostérone

L'aldostérone exerce ses effets sur de nombreux tissus. Ses cibles classiques sont les tissus épithéliaux comme le rein, le colon, les glandes salivaires et les glandes sudoripares. Il a été montré plus récemment que l'aldostérone peut exercer des effets sur d'autres tissus comme le cœur et les vaisseaux.

### ***1. Effets Génomiques***

Classiquement les effets de l'aldostérone sont médiés par le récepteur minéralocorticoïde [MR]. Il appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires.

En présence d'aldostérone, le MR change de conformation, se dimérise puis est transloqué dans le noyau de la cellule. Il se lie alors à des séquences spécifiques appelées Hormone response element (HRE) présents au niveau des régions promotrices des gènes cibles de l'aldostérone conduisant l'activation ou à la répression de la transcription de ces gènes.

L'action principale de l'aldostérone est la régulation de la balance hydrosodée, du métabolisme du potassium, et de la pression artérielle [PA] en agissant sur les transports ioniques essentiellement au niveau rénal (le tubule contourné distal, le tube connecteur distal et le canal collecteur). Dans ces tissus épithéliaux cibles, le MR est co-exprimé avec une enzyme, la 11  $\beta$  hydrostéroïde déshydrogénase de type 2 [11 $\beta$ -HSD2] qui assure la sélectivité minéralocorticoïde en transformant le cortisol en cortisone qui ne se lie pas au MR.

Dans ces tissus, l'aldostérone stimule en particulier la réabsorption de sodium et l'excrétion de potassium en impliquant deux transporteurs membranaires: le canal épithélial à sodium sensible à l'Amiloride [ENaC], localisé à la membrane apicale des cellules épithéliales, et la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, localisée à la membrane basolatérale (Rogerson, 2004). En plus de ses effets directs sur l'expression des transporteurs, l'aldostérone stimule également l'activation de cascades de signalisation qui modulent l'activité de ces transporteurs.

Les principaux gènes cibles de l'aldostérone codent pour des protéines impliquées dans le transport transépithélial du sodium, y compris ENaC et la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (Stockand, 2002) et pour des protéines capables de réguler l'activité de ces canaux. En effet le canal ENaC constitue une étape limitante de la réabsorption sodée (cf. Figure 8). Son expression est donc finement régulée.

- sgk1 : stimule l'activité d'ENaC en phosphorylant une ubiquitine-ligase, Nedd4-2, ce qui réduit l'ubiquitination du canal qui n'est alors plus internalisé ni dégradé par le protéasome (Bhalla, 2008).
- Gilz : protéine « leucine zipper » induite par les glucocorticoïdes agit, en parallèle de sgk1, pour augmenter la localisation d'ENaC à la membrane plasmique par l'inhibition de la voie ERK (Soundararajan, 2005).
- NDRG2 «N-Myc Downstream regulated gene 2» participerait à l'augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha$  du canal et pourrait agir de façon additive à l'effet stimulateur de sgk1 (Boulkroun, 2002)
- Ki-ras Kirsten Ras GTP-binding protein 2A est un gène induit par l'aldostérone qui, grâce à la stimulation de la PI3 Kinase, favorise la probabilité d'ouverture du canal ENaC (Staruschenko, 2004).Ki-ras est principalement exprimé dans le colon et peu exprimé dans le rein.

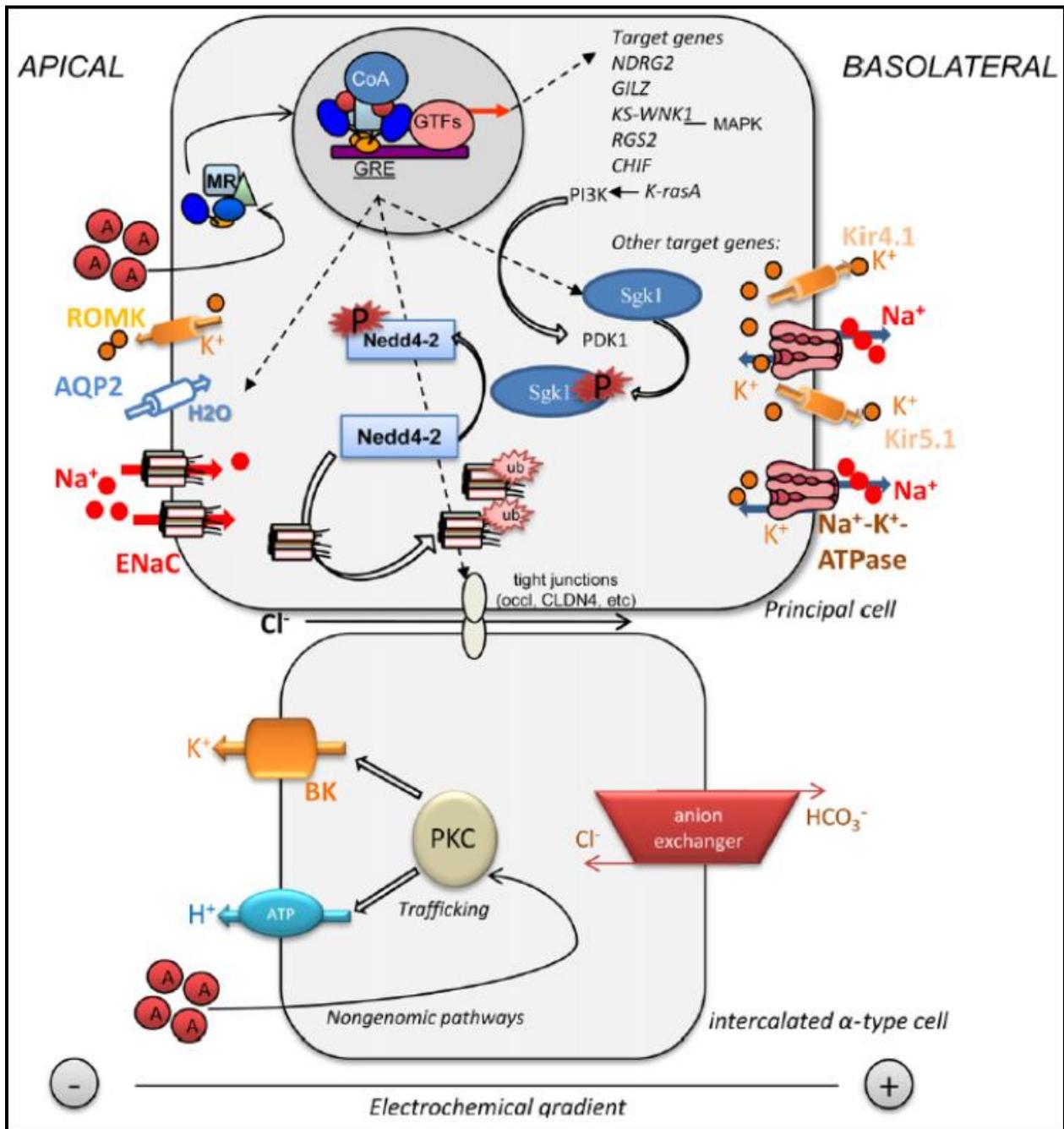


Figure 8 : Régulation de l'excrétion urinaire du potassium, de la volémie et de la balance hydrosodée dans le néphron distal sensible à l'aldostérone. D'après (Zennaro, 2012)

## ***2. Effets non génomiques***

L'aldostérone a également des effets non génomiques, c'est-à-dire ne passant pas par la transcription de gènes, médiés ou non par le MR. Ces effets ont lieu dans les minutes, voire dans les secondes, qui suivent le traitement à l'hormone, et ne sont pas affectés par des antagonistes du MR (Thomas, 2011). De plus ces effets ne sont pas bloqués par l'actinomycine D, agent intercalant de l'ADN qui inhibe la transcription des ARN messagers (Funder, 2005).

Par exemple un travail récent de Gros et collaborateurs. a montré l'action rapide de l'aldostérone dans les cellules musculaires lisses via un récepteur orphelin couplé aux protéines G : le GPR30 (Gros, 2011). En effet, l'aldostérone induit l'apoptose de cellules de l'endothélium vasculaire. Ces effets ne sont inhibés que partiellement par les antagonistes minéralocorticoïdes.

Il a également été montré que l'aldostérone diminue la contractilité des trabécules dans l'oreillette et le ventricule, et potentialise la réponse contractile des artères coronaires à l'angiotensine II. Ces effets ne sont pas inhibés par les antagonistes du MR (Chai, 2005).

## **D. PATHOPHYSIOLOGIE**

L'importance de la régulation de l'aldostérone est illustrée par la finesse de la régulation de sa biosynthèse. Cependant dans certains cas, une ou les deux surrénales peuvent s'autonomiser. Elles ne répondent alors plus ou tout du moins que partiellement aux facteurs de régulation vu plus haut. Cet HAP (défini page 13) se caractérise par des anomalies dans la régulation de la volémie, et de la kaliémie. De plus l'aldostérone en excès va également avoir des effets délétères sur le système cardiovasculaire.

Il existe différentes formes d'HAP : unilatérale (Adénome produisant de l'aldostérone [APA], hyperplasie unilatérale des surrénales) et bilatérales (Hyperplasie bilatérale des surrénales), des formes familiales et sporadiques... Cette multiplicité des phénotypes de la pathologie se reflète au niveau physiopathologique avec plusieurs mécanismes impliqués.

## I. Rôle des canaux potassiques

### 1. La dépolarisation de la cellule glomérulée

En général, le potentiel de membrane cellulaire dépend des potentiels d'équilibre et des conductances des différents ions. La cellule glomérulée est le type cellulaire le plus sensible aux concentrations de potassium extracellulaire. Elle a un potentiel de membrane hyperpolarisé, proche du potentiel d'équilibre du potassium. Ceci est dû à une conductance très élevée aux ions  $K^+$  par rapport aux autres ions (comme le chlore, le sodium ou le calcium). Par conséquent, le potentiel de membrane des cellules glomérulées, qui est de - 80 mV en condition de repos, suit de près le potentiel d'équilibre du  $K^+$ , ce qui permet la détection des moindres variations du potassium plasmatique (Guagliardo, 2012). Cette propriété fait des cellules de la zone glomérulée des senseurs extrêmement sensibles des modifications de la concentration extracellulaire en potassium. Ainsi des modifications de quelques dizaines de mmol de la concentration de potassium vont avoir un effet sur la synthèse d'aldostérone (Spat, 2004). L'hyperkaliémie ou l'inhibition de la conductance potassique par l'Angiotensin II induisent une dépolarisation de la membrane, suivie de l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. Ainsi, la dépolarisation est traduite en un signal calcique aboutissant à l'augmentation de la synthèse d'aldostérone. Parmi les différents canaux potassiques, le rôle fonctionnel des canaux TASK et des canaux potassiques à rectification entrante  $K_{ir}$ , activés par les protéines G, a été récemment mis en évidence dans des modèles animaux et chez l'homme.

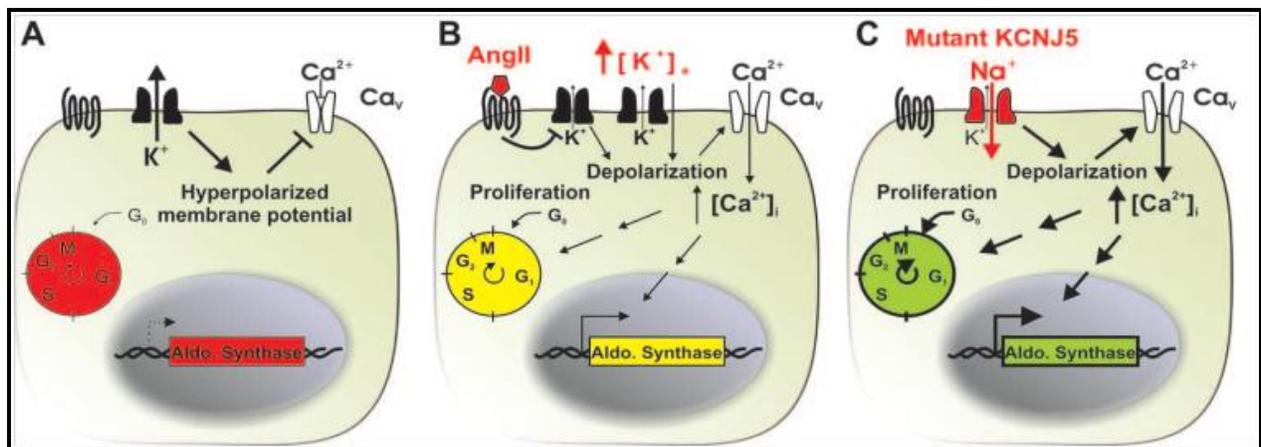
### 2. Le canal $K_{ir} 3.4$

Grâce au séquençage de l'exome de 4 APA de patients présentant un HAP, l'équipe de Lifton a identifié des mutations somatiques situées sur le gène *KCNJ5* dans 2 tumeurs (Choi, 2011). Le séquençage de 18 tumeurs supplémentaires a confirmé la présence de mutations somatiques sur le gène *KCNJ5* chez 6 patients. Deux mutations faux-sens ont été identifiées chez ces patients : la substitution d'une Leucine par une Arginine en position 168 (L168R) et celle d'une Glycine en Arginine en position 151 (G151R). Ces mutations très proches sont situées dans une région de la protéine responsable de la sélectivité du canal  $K_{ir}3.4$ .

Par la suite, d'autres mutations ont été identifiées :

- E 145Q: Acide Glutamique en Glutamine en position 145 (Akerstrom, 2012)
- delI157 : la délétion de l'isoleucine en 157 (Azizan, 2012). Cette mutation a la particularité de ne pas être une mutation faux-sens. Il s'agit d'une délétion de 3 paires de bases, n'entraînant donc pas de décalage du cadre de lecture.

Toutes ces mutations, localisées dans la même région de la protéine, agissent sur la sélectivité du canal Kir 3.4. En effet Choi et collaborateurs ont montré que ces mutations conduisent à une perte de sélectivité du canal, qui devient ainsi perméable au sodium. Les auteurs émettent alors l'hypothèse suivante : l'entrée du sodium dans la cellule induirait une dépolarisation membranaire, ce qui permettrait l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants, l'activation des voies de signalisation calciques et la production d'aldostérone (Choi, 2011) (cf. Figure 9).



**Figure 9: Mode d'action des mutations de KCNJ5 conduisant à la production d'aldostérone. D'après (Choi, 2011)**

*A : Cellule de la glomérulée en absence de stimulation. La membrane est hyperpolarisée, et il n'y a donc pas de production d'aldostérone.*

*B : en présence d'angiotensine II ou d'une augmentation de la concentration extracellulaire en potassium, la dépolarisation de la membrane induit un influx de calcium intracellulaire, ce qui active la production d'aldostérone et stimule la prolifération cellulaire.*

*C : En présence d'une mutation, le canal Kir 3.4 devient perméable au sodium, il s'en suit une dépolarisation chronique de la membrane conduisant à une surproduction d'aldostérone.*

Le lien entre la présence d'une mutation sur le gène *KCNJ5* et la production d'aldostérone a été clairement établi par Oki et collaborateurs dans un modèle cellulaire dérivé des H295R (Oki, 2012). La surexpression du mutant T158A résulte en une augmentation de la production d'aldostérone d'un facteur supérieur à 5.

A contrario, l'effet de ces différentes mutations sur *KCNJ5* sur la prolifération cellulaire reste controversé. *In vivo*, la présence d'une mutation sur le gène *KCNJ5* au niveau germinale s'accompagne d'une hyperplasie des surrénales (Choi, 2011; Charmandari, 2012). Et certaines séries ont montré que les APA ont une taille plus importante lorsqu'ils sont porteurs de la mutation somatique (Akerstrom, 2012; Azizan, 2012).

Cependant ces résultats ne sont pas confirmés *in vitro*. En effet, la surexpression du mutant T158A induit une diminution de la prolifération cellulaire de 25% comparée aux cellules contrôles (Oki, 2012). Dans une autre étude, la surexpression du mutant G151E conduit à la mort cellulaire en 36 heures, probablement en raison des influx massifs de sodium dans les cellules (Scholl, 2012).

La découverte des mutations dans le gène *KCNJ5* constitue une avancée majeure dans la compréhension de l'HAP sporadique. Dans le cadre du réseau ENS@T, le Dr Zennaro a coordonné une large étude afin de déterminer la prévalence des mutations *KCNJ5* dans 380 APA. Nous avons ainsi pu montrer que 34% des patients opérés d'un APA étaient porteurs d'une mutation somatique (cf. Annexe 6). Aucune mutation n'a été identifiée ni dans d'autres types de tumeurs surrénales (adénomes produisant du cortisol), ni dans le cortex adjacent au nodule pour les patients opérés. De plus aucune mutation germinale n'a été identifiée chez 518 patients atteints d'HAP secondaire à un APA ou à une hyperplasie bilatérale des surrénales. Les corrélations génotype-phénotype ont montré que les mutations sont plus fréquentes chez les patients jeunes, de sexe féminin, avec des concentrations d'aldostérone préopératoires plus élevées. Cependant aucun lien n'a été identifié entre la présence d'une mutation germinale et l'issue post opératoire.

Depuis d'autres études ont été publiées avec une prévalence de mutation somatique oscillant entre 34 et 65% (cf. Tableau 1).

Série	Nombre de tumeurs dans la cohorte	Nombre de tumeurs mutées	Prévalence de la mutation (%)
(Akerstrom, 2012)	351	136	47
(Boulkroun, 2012)	380	129	34
(Choi, 2011)	22	8	36
(Azizan, 2012)	73	30	41
(Monticone, 2012)	47	18	38
(Taguchi, 2012)	23	15	65

**Tableau 1: Résumé de la prévalence des mutations somatiques *KCNJ5* dans les APA**

Les corrélations génotype/phénotype de ces différentes études confirment le lien entre la prévalence de mutations somatiques et le sexe (Boulkroun, 2002; Akerstrom, 2012), ainsi que celui avec l'âge (Akerstrom, 2012; Azizan, 2012; Boulkroun, 2012). De plus elle montre également un lien avec la taille de la tumeur (les APA mutés seraient plus gros que les APA non mutés (Akerstrom, 2012; Azizan, 2012)).

L'identification de mutations somatiques sur le gène *KCNJ5* a constitué une avancée majeure dans la compréhension de la pathogénèse de l'HAP en raison de la prévalence de ces mutations. Cependant l'importance de l'implication des canaux potassiques dans la pathogénie de l'HAP avait déjà été montrée par l'analyse de modèles animaux invalidés pour d'autres canaux potassiques, notamment les canaux TASK.

### **3. *Autres canaux potassiques.***

D'autres canaux potassiques sont impliqués dans l'HAP : les TWIK-related acid sensitive potassium channels ou canaux TASK et les canaux potassiques calcium dépendants de grande conductance [BK]. Ces canaux sont exprimés dans le cortex surrénal et sont essentiels pour le maintien de la polarité des cellules de la glomérulée (Bandulik, 2010). Le rôle de ces canaux TASK et BK a été mis en évidence par le biais de modèles animaux.

## **Les canaux TASK**

Des modèles murins invalidés pour les gènes *KCNK3* et *KCNK9* codant respectivement pour les canaux TASK 1 et TASK3, ayant un niveau d'expression important dans les surrénales, ont été étudiés.

Les souris femelles invalidées pour le gène TASK1 (appelées TASK1<sup>-/-</sup>) présentent un hyperaldostéronisme indépendant de l'apport sodé, associé à une hypokaliémie, une diminution des concentrations de rénine et une HTA. Des études d'immunofluorescence ont montré que *CYP11B2* est exprimé dans les cellules de la zone fasciculée. Cette anomalie de la zonation de la surrénale, ne s'accompagne pas d'anomalie de sécrétion du cortisol. Cependant les anomalies observées sur la PA, les taux d'aldostérone, de rénine... sont réversibles après l'administration de Dexaméthasone, ce qui peut suggérer que l'expression de *CYP11B2* est dépendante de l'ACTH.

De façon surprenante, ce phénotype observé chez les souris mâles avant la puberté n'est plus présent chez les souris mâles adultes. Différentes expériences (étude de souris avant la puberté, castration des souris mâles, administration de testostérone à des souris femelles), ont permis de conclure à un rôle « protecteur » des androgènes (Heitzmann, 2008).

De plus l'étude de l'expression d'un autre canal potassique, le canal KCNK9 (codé par le gène *TASK3*) connu pour interagir avec *KCNK3* a été étudié chez les souris TASK1<sup>-/-</sup>. Il est alors apparu que l'expression de *TASK3* est augmentée chez les souris mâles adultes (qu'elles soient porteuses d'une mutation sur le canal *KCNK3* ou non) par rapport aux souris femelles et aux souris étudiées avant la puberté.

Une modification de l'expression du canal *TASK3* pourrait donc avoir un rôle dans les différences de phénotype observées en fonction du sexe.

Un modèle de souris mâles invalidées pour les deux gènes *TASK1* et *TASK3* a été étudié secondairement (Davies, 2008). Ces souris appelées TASK<sup>-/-</sup> sont viables et n'ont pas de trouble du comportement.

Au niveau de leur phénotype, ces souris présentent une hypokaliémie modérée associée à une élévation de la PA. Les dosages hormonaux montrent une élévation des concentrations d'aldostérone plasmatique avec diminution des concentrations de rénine quel que soit le régime.

On note également que la sécrétion d'aldostérone n'est pas suppressible, ni par un apport sodé important, ni par un traitement par le Candesartan (antagoniste du récepteur AT1 de l'angiotensine II).

La zonation du cortex surrénal des souris mâles *TASK<sup>-/-</sup>* ne semble pas altérée ni au niveau histologique, ni au niveau fonctionnel (*CYP11B1* est exprimé dans les zones fasciculée et réticulée, et *CYP11B2* dans la zone glomérulée).

Ces résultats sont confirmés par l'étude de souris invalidées exclusivement pour le gène *TASK3* (appelées *TASK3<sup>-/-</sup>*) (Guagliardo, 2012; Penton, 2012). Ces souris mâles présentent une HTA associée à une élévation des concentrations d'aldostérone et une diminution des concentrations de rénine. Cependant ce phénotype s'apparente davantage à une HTA à rénine basse qu'à un HAP en raison de la persistance de la régulation de l'aldostérone par le système rénine angiotensine, en régime normosodé et pauvre en sel, et de l'amplitude des anomalies hormonales et tensionnelles qui sont moins sévères que celles des souris invalidées pour les gènes *TASK1* et *TASK3*.

Ainsi ces modèles de souris ont permis de montrer l'implication des canaux potassiques dans la production d'aldostérone, ainsi que dans la zonation de la surrénale. *TASK1* serait essentiellement impliqué dans la zonation de l'expression de l'aldostérone synthase. *TASK3* quant à lui est impliqué dans le contrôle du potentiel membranaire de repos.

Malgré ces données fort prometteuses dans les modèles murins, aucune mutation sur les gènes *TASK1* et *TASK3* n'a été identifiée à ce jour ni en somatique, ni en germlinal chez des patients présentant un HAP (Boukroun; Choi, 2011).

### **Le canal BK**

Les souris invalidées pour le gène codant pour la sous-unité  $\beta 1$  du canal BK présentent également un hyperaldostéronisme associé à une HTA. Ces anomalies sont liées à un défaut de la sécrétion de potassium par le rein, mais également à une augmentation de la sensibilité des cellules de la glomérulée au potassium. Un régime riche en potassium exacerbe la rétention hydro sodée et l'HTA. Ce modèle est cependant différent de l'HAP humain étant donné que les souris mutées peuvent avoir un phénotype associant un hyperaldostéronisme, une HTA et une hyperkaliémie.

## II. Autres voies de signalisation potentiellement impliquées

D'autres voies de signalisation pouvant être impliquées dans la pathogénie de l'APA ont été étudiées.

L'analyse d'un transcriptome de 8 APA a mis en évidence 53 gènes différentiellement exprimés parmi lesquels Teratocarcinoma Derived Growth factor 1 (*TDGFI*) (Williams, 2010) et Visinin-like 1 (*VSNL1*) (Williams, 2012).

*TDGFI* intervient dans le développement des vertébrés et dans la tumorigénèse. Alors que son expression est limitée à la zone glomérulée dans la surrénale normale, elle s'étend à tout le cortex surrénal dans les APA. Des études *in vitro* ont montré que *TDGFI* active la voie Akt impliquée dans de nombreux types de tumeurs et augmente la production d'aldostérone par des cellules H295R (Williams, 2012).

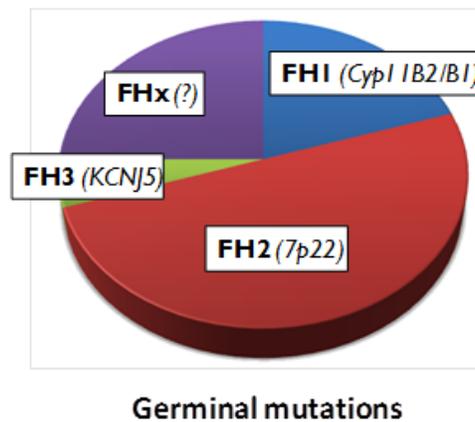
*VSNL1* est quant à lui impliqué dans la voie calcique. Une étude récente a montré que *VSNL1* est positivement régulé par SF1 (Ferraz-de-Souza, 2011), il pourrait donc être impliqué dans le développement de la surrénale et dans la stéroïdogénèse. De plus *VSNL1* est surexprimé dans les APA mutés pour *KCNJ5* (Williams, 2012), il pourrait donc être impliqué dans la pathogénie des APA, notamment via ses propriétés anti-apoptotiques.

L'implication de la voie Wnt/ $\beta$  caténine dans les tumeurs de la surrénale est bien connue. Récemment il a été montré que des souris transgéniques avec une mutation activatrice de la  $\beta$ -caténine présentent un HAP à 10 mois dans un contexte d'hyperplasie de la surrénale et de zone glomérulée ectopique. Ces souris développeront par la suite des tumeurs surrénales malignes à 17 mois (Berthon, 2010).

Dans les APA, l'activation de la voie Wnt- $\beta$  Caténine est présente dans 50% des cas (Boulkroun, 2011). Elle n'a pas de conséquence phénotypique évidente. Cependant l'analyse transcriptomique montre que les APA présentant une localisation nucléaire (et donc une activation) de la  $\beta$  Caténine ont un profil d'expression différent de ceux qui n'ont pas d'activation de la voie. Au niveau somatique aucune mutation sur le gène *CTNNB1* (Catenin (cadherin-associated protein), beta 1) n'a été identifiée (Boulkroun, 2011).

### III. Formes familiales

Bien que plus de 90% des HAP soient apparemment sporadiques, 3 formes familiales autosomiques dominantes ont été décrites (cf. Figure 10).

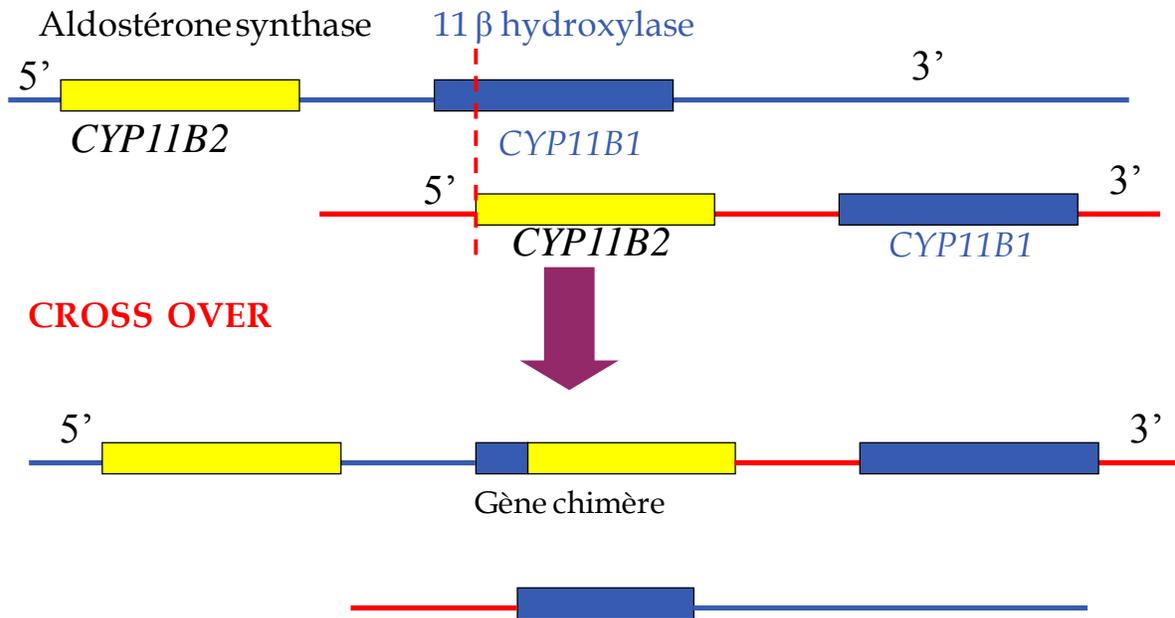


**Figure 10: Répartition des formes familiales d'HAP. D'après (Zennaro, 2011)**

#### 1. FH1 : Hyperaldostéronisme Familial de type 1

L'hyperaldostéronisme familial 1 [FH1], aussi appelé Glucocorticoid Suppressible hyperAldosteronism (hyperaldostéronisme suppressible par la Dexaméthasone), a été décrit pour la première fois en 1966 (Sutherland, 1966). Cette forme d'HAP se caractérise par une HTA sévère et précoce, le plus souvent avant l'âge de 20 ans, associée à un hyperaldostéronisme d'intensité variable et dans certains cas à des nodules surrénaux (Stowasser, 2001).

En 1992, Lifton décrivit pour la première fois le gène hybride responsable du FH1 (Lifton, 1992). Ce gène hybride *CYP11B1/CYP11B2* situé sur le chromosome 8q21-q22 code pour une enzyme qui participe à la synthèse de l'aldostérone car ses séquences en 3' proviennent de *CYP11B2*. Cependant contrairement à *CYP11B2*, ce gène hybride est régulé par l'ACTH plutôt que par l'angiotensine II, et répond donc aux glucocorticoïdes car ses séquences 5' dérivent de *CYP11B1*, (cf. Figure 11). De plus ce gène s'exprime dans les trois couches du cortex de la surrénale alors que *CYP11B2* n'est exprimé que dans la glomérulée (Pascoe, 1995).



**Figure 11: Gène hybride *CYP11B1/CYP11B2*.**

*L'homologie importante et la proximité des gènes *CYP11B1* et *CYP11B2* induit un « cross over ». Il en résulte un gène chimère avec le promoteur du gène *CYP11B1* (sensible à l'ACTH) et la région codante du gène *CYP11B2*.*

L'expression aberrante d'une activité aldostérose synthase dans la zone fasciculée est probablement à l'origine de glucocorticoïdes hybrides les 18 hydroxy cortisol et 18 oxo-cortisol (Ulick, 1982)(Ulick, 1982)(Ulick, 1982)(Ulick, 1982)(Ulick, 1982).

La prévalence de FH1 est estimée à 0,3% des patients atteints d'HAP, mais peut atteindre 3% dans les cohortes pédiatriques. Le traitement repose sur la prescription de très faibles doses de Dexaméthasone (Zennaro, 2012).

## ***2. FH2 : Hyperaldostéronisme Familial de type 2***

Il existe un second type d'hyperaldostéronisme familial : le FH2, qui est une maladie à transmission autosomique dominante, non associée à un gène hybride *CYP11B1/CYP11B2*. Son phénotype est variable allant de l'APA à l'hyperplasie bilatérale des surrénales. Les caractéristiques cliniques et biologiques des patients atteints de FH2 sont similaires à ceux des patients ayant un HAP sporadique. Le FH2 se définit donc par la présence d'au moins deux cas d'HAP parmi des apparentés du premier degré.

La prévalence du FH2 est estimée entre 2,8 et 6% des patients présentant un HAP (Mulatero, 2011).

Dans une grande famille atteinte de FH2, le locus associé à la maladie a été localisé au niveau du chromosome 7p22 (Lafferty, 2000), mais à ce jour, aucun gène précis n'a été identifié pour cette pathologie.

### **3. FH3 : Hyperaldostéronisme Familial de type 3**

Très récemment, une troisième forme familiale, appelée FH3 pour Hyperaldostéronisme Familial de type 3, a été décrite (Choi, 2011). La première description a été faite dans une famille ayant un phénotype sévère associant une HTA résistante au traitement, un hyperaldostéronisme primaire marqué associé à une élévation des taux de 18 oxo-cortisol et 18 hydroxy-cortisol sans réponse à la Dexaméthasone. Une surrénalectomie bilatérale a été réalisée montrant une hyperplasie massive des deux surrénales. Le gène en cause est le gène *KCNJ5* qui code pour le canal potassique Kir3.4 comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent.

Plusieurs mutations faux-sens ont été décrites dans ces formes germinales : la substitution d'une Thréonine en Alanine en position 158 (T158A)(Choi, 2011), la substitution d'une Isoleucine en Serine en position 157 (I157S) (Charmandari, 2012), et la substitution en position 151 d'une Glycine en Acide Glutamique (G151E)(Mulatero, 2012).

Le phénotype de ces quelques familles est variable ; ainsi, la famille Italienne a une forme moins sévère avec des surrénales normales au TDM (Mulatero, 2012). Les deux patientes (mère et fille) décrites par Charmandari et collaborateurs ont elles une forme sévère avec une HTA réfractaire associée à une hyperplasie bilatérale des surrénales (Charmandari, 2012).

## **E. ÉPIDÉMIOLOGIE**

Dans les séries de plus de 1000 patients hypertendus, la prévalence d'une élévation du rapport aldostérone sur rénine [RAR] varie de 6,4 à 22,8% (Nishikawa, 2000; Rossi, 2002; Mulatero, 2004; Rossi, 2006; Fogari, 2007; Douma, 2008; Hannemann, 2012). L'HAP n'est ensuite confirmé que chez 3,8 à 11,3% des patients inclus dans ces études, et l'existence d'un APA n'est retrouvée que chez 1,5 à 4,8% des patients. Ces chiffres sont probablement surestimés en raison de biais de recrutement des centres qui ont mené les études.

Ainsi, si l'on considère que les praticiens spécialisés en HTA de par leur biais de recrutement prennent en charge deux fois plus de patients présentant un HAP que les autres médecins (Amar, 2010), cela signifierait que la prévalence ne serait que de 3 à 6% des patients hypertendus.

Cependant au vu de la prévalence de HTA qui est estimée à 14 millions de la population âgée de 18 à 74 ans en France, l'HAP toucherait 420 à 850 000 personnes en France. Il s'agit donc bien d'une pathologie fréquente, première cause d'HTA secondaire.

## **F. DIAGNOSTIC**

### **I. Mode de découverte**

Les patients ayant un HAP n'ont classiquement aucune symptomatologie spécifique. En effet, l'excès d'aldostérone entraîne une HTA souvent sévère et/ou résistante au traitement, qui peut être associée à une hypokaliémie. Ainsi les rares manifestations cliniques décrites sont liées à l'hypokaliémie (Medeau, 2008) : crampes, faiblesse musculaire, paresthésies, troubles du rythme cardiaque....

L'âge moyen au moment du diagnostic varie entre 45 et 55 ans en fonction des séries (Rossi, 2006; Douma, 2008; Matrozova, 2009). Par ailleurs, le diagnostic d'HTA a classiquement été posé 5 à 10 ans avant le diagnostic d'HAP ce qui indique un délai significatif entre l'apparition de la maladie et son diagnostic.

Une HTA de grade III - avec une PA supérieure ou égale à 180/100 mmHg – ou une HTA résistante – PA supérieure à 140/90 mmHg malgré trois classes d'antihypertenseurs comprenant un diurétique thiazidique - est plus fréquemment rapportée chez les patients atteints d'HAP que parmi les hypertendus essentiels (Calhoun, 2002; Strauch, 2003; Rossi, 2006).

L'hypokaliémie, généralement définie par une kaliémie  $\leq 3,5$  mmol/l, n'est présente en réalité que chez une minorité de patients (Nishikawa, 2000; Mulatero, 2004; Rossi, 2006; Fogari, 2007). Dans l'étude PAPY (Rossi, 2006), la prévalence de l'hypokaliémie a été évaluée à 7% dans les HTA essentielles, 17% dans les HAP par hyperplasie bilatérale des surrénales et 48% dans les APA. Il existe de rares cas où l'HAP ne se manifeste que par une hypokaliémie, généralement symptomatique et sévère associée une PA normale avec ou sans adénome surrénal (Medeau, 2008).

L'HAP peut également être diagnostiqué suite à la découverte fortuite d'un nodule surrénal (appelé alors incidentalome surrénal) lors d'une imagerie abdominale faite pour une pathologie

autre. Dans une enquête sur 1096 patients avec un incidentalome, 16 avaient un HAP, tous étaient hypertendus (Mantero, 2000). Les recommandations de la Société Française d'Endocrinologie sur la prise en charge des incidentalomes stipulent que « La recherche d'une hypersécrétion d'aldostérone ne sera proposée que chez les sujets présentant une hypertension et/ou une hypokaliémie. » (Tabarin, 2008).

## II. Indications du dépistage de l'HAP

Dans ce contexte, les recommandations proposent de rechercher un HAP (Funder, 2008) chez les patients présentant :

- une HTA modérée à sévère (HTA grade 2 – PA $\geq$  160/100 mmHg)
- une HTA résistante
- une HTA associée à une hypokaliémie spontanée ou induite par des diurétiques
- une HTA associée à un incidentalome surrénal.

## III. Critères biologiques

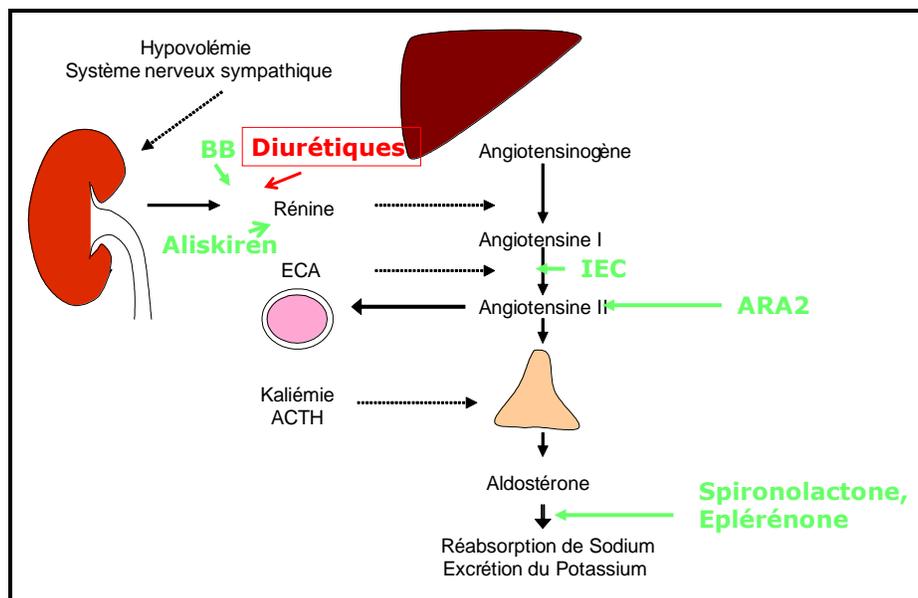
Le diagnostic d'HAP repose sur des critères biologiques. Il y a deux étapes pour poser le diagnostic : un test de dépistage qui repose sur la détermination du RAR suivi d'un test de confirmation.

### *1. Examen de dépistage*

Le dépistage d'HAP repose sur le RAR. Celui-ci a été décrit pour la première fois en 1981 (Hiramatsu, 1981). En Effet Hiramatsu ayant constaté les difficultés diagnostiques engendrées par les variations des taux d'aldostérone au cours du nyctémère et d'un jour à l'autre, a proposé d'utiliser le rapport aldostérone sur rénine. En 1991, McKenna confirmait la reproductibilité de ce rapport chez des volontaires sains prélevés dans des conditions de clinostatisme ou d'orthostatisme et dans des conditions pathologiques : HAP, mais également hyperaldostéronisme secondaire, insuffisance surrénale, insuffisance rénale (McKenna, 1991).

La généralisation de l'utilisation du RAR comme examen de dépistage pour l'HAP a permis d'identifier un plus grand nombre de patients ayant potentiellement un HAP. Cependant le RAR doit être utilisé et surtout interprété avec précaution (Gordon, 2004) :

- Il est tout d'abord essentiel d'être vigilant sur les conditions de prélèvement. En effet la rénine et l'aldostérone fluctuent en fonction de la volémie, il est donc essentiel d'effectuer les prélèvements en condition de normovolémie. Ainsi la natriurèse qui est un reflet de cette normovolémie doit fluctuer entre 75 mmol/24h et 150 mmol/24h (Letavernier, 2008). L'hypokaliémie, fréquente dans ce contexte de suspicion d'HAP, inhibe la sécrétion d'aldostérone. Il faut donc corriger l'hypokaliémie avant d'effectuer les dosages hormonaux.
- Les médicaments antihypertenseurs interagissent pour beaucoup d'entre eux avec l'axe rénine-angiotensine-aldostérone (cf. Figure 12). Ils peuvent donc interférer avec les dosages d'aldostérone et de rénine. Il est recommandé d'interrompre ces traitements pour une durée allant de 2 à 6 semaines avant d'effectuer les dosages. (cf. Tableau 2). Les médicaments ayant un profil neutre pouvant être prescrits lorsqu'il existe une HTA sévère sont les inhibiteurs calciques non dihydropyridine, les alpha bloquants et si nécessaire les antihypertenseurs centraux.



**Figure 12: Interactions médicamenteuses avec le système rénine Angiotensine Aldostérone**

*BB : Beta Bloquants, IEC : Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ARA2 : Antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II.*

*Les médicaments inhibiteurs sont représentés en vert, et les médicaments activateurs en rouge*

	$\beta$ bloquants	Antagonistes MR	Diurétiques	IEC/ARA2
(Funder, 2008)	2 semaines	4 semaines	4 semaines	2 semaines
(Douma, 2008)	2 semaines	4 semaines	4 semaines	2 semaines
(Tiu, 2005)	2 semaines	6 semaines	6 semaines	2 semaines
(Rossi, 2006)	4 semaines	4 semaines	4 semaines	4 semaines
(Schwartz, 2002)	4 semaines	4 semaines	4 semaines	4 semaines
(Letavernier, 2008)	2 semaines	6 semaines	2 semaines	2 semaines

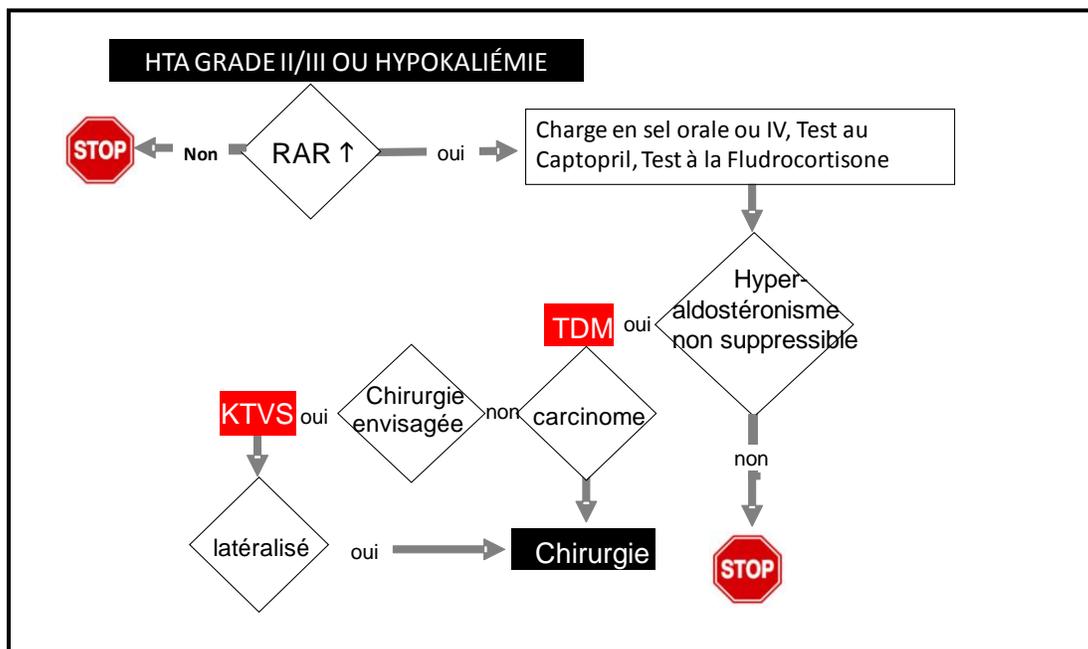
**Tableau 2: Durée d'arrêt des traitements avant dosages hormonaux**

## *2. Examen de confirmation*

La dissociation rénine-aldostérone est un élément majeur pour le diagnostic d'HAP. Cependant ce test est un examen sensible mais peu spécifique (Newton-Cheh, 2007). Il est donc nécessaire de confirmer le diagnostic d'HAP avant de poursuivre les explorations.

Les recommandations pour le diagnostic et le traitement de l'HAP prônent l'utilisation d'un test de freination : charge orale en sodium, perfusion de sérum sodé isotonique, test au Captopril ou test à la Fludrocortisone (Funder, 2008) (cf. Figure 13). L'utilisation de ces tests implique que le diagnostic d'HAP repose sur l'existence d'une sécrétion autonome d'aldostérone par une ou les deux surrénales. Le test plus utilisé et le plus étudié est la charge en sel intraveineuse dont la sensibilité diagnostique est de 73%, et la spécificité de 76% en utilisant un seuil d'aldostérone plasmatique de 6,8ng/dl (Rossi, 2007).

Cependant comme il est précisé dans les recommandations, ces tests n'ont pour la plupart été évalués que rétrospectivement, dans des séries de petite taille, et généralement en comparaison les uns avec les autres.



**Figure 13: Démarche diagnostique dans l'hyperaldostéronisme primaire d'après les recommandations (Funder, 2008)**

L'utilisation des tests de freination peut conduire à de faux négatifs. En effet, des cas d'APA « répondant à l'angiotensine » et guéris par l'intervention chirurgicale ont déjà été décrits dans la littérature (Gordon, 1987; Irony, 1990).

Dans le service d'HTA de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, nous avons étudié 72 patients qui avaient eu une charge en sel et un cathétérisme des veines surrénales [KTVS]. Nous avons montré que parmi les patients ayant une hypersécrétion d'aldostérone latéralisée, plus de 10% répondent à l'angiotensine II (cf. Tableau 3).

Ces données, en cours de publication, présentées au congrès de la Société Européenne d'HTA en 2012(Amar), illustrent bien le fait que la charge en sel est un examen sensible pour le diagnostic d'HAP, mais non spécifique, puisque l'existence d'une freination ne permet pas d'exclure le diagnostic d'HAP latéralisé.

		KTVS		
		Non latéralisé (ratio<4)	Latéralisé (Ratio≥4)	Total
Aldostéronémie Post Charge en Sel Pmol/l	<138	7	5	12
	138≤ <276	14	12	26
	≥276	9	25	34
Total		30	42	72

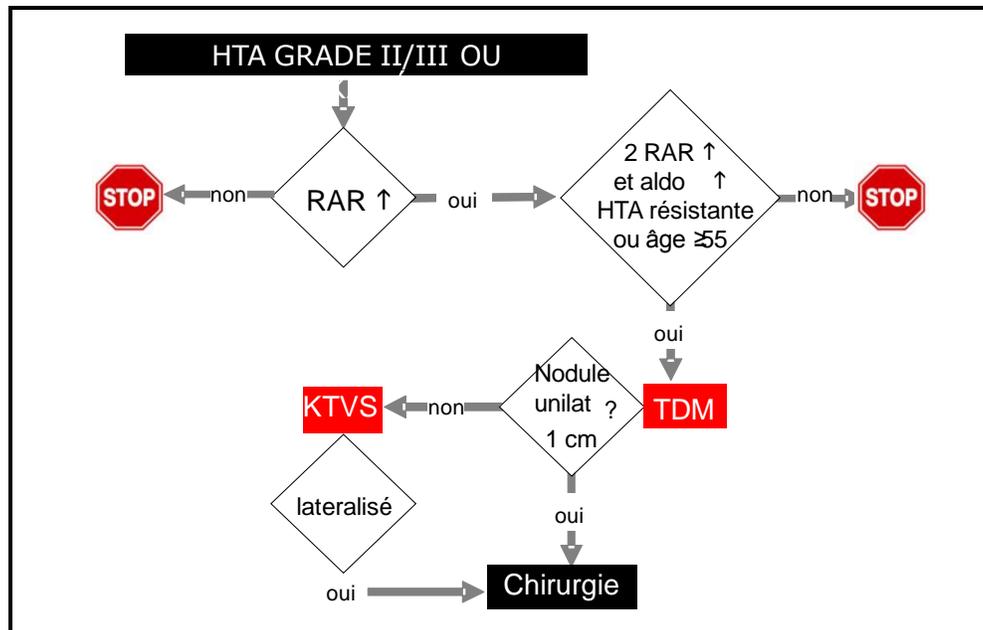
**Tableau 3: Place de la charge en sel dans le diagnostic d'HAP latéralisé**

*Le KTVS est considéré comme latéralisé si le ratio aldostérone/cortisol d'une veine surrénale à l'autre est  $\geq 4$ . Même si l'on prend le seuil de freination le plus stringent (<138 pmol/l), 5 patients sur les 42 présentant une forme latéralisée ont une aldostéronémie freinée par la charge en sel.*

Il existe une approche alternative pour confirmer le diagnostic d'HAP, il s'agit de déterminer si le patient a une hypersécrétion absolue d'aldostérone ou non, avec des concentrations élevées dans le plasma et/ou dans les urines. De nombreux auteurs exigent la combinaison d'un RAR élevé et d'une concentration d'aldostérone élevée pour distinguer d'HAP de l'HTA essentielle à rénine basse (Loh, 2000; Rayner, 2001; Williams, 2006; Young, 2007; Douma, 2008; Letavernier, 2008). Cependant, il est possible que cette approche conduise également à des faux négatifs. En effet une étude dans la littérature décrit un groupe de 21 patients avec un APA, parmi lesquels 4 avaient une concentration plasmatique d'aldostérone inférieure à 416 pmol/l (Stowasser, 2004).

Dans le service d'HTA de l'Hôpital Européen Georges Pompidou, nous utilisons les critères diagnostiques suivants (Letavernier, 2008), puis l'algorithme présenté en Figure 14

- Un RAR élevé ( $> 63$  pmol/mU), à deux reprises en ajustant la rénine à 5 mUI/l lorsqu'elle est inférieure
- Une aldostérone plasmatique haute ( $> 500$  pmol / l en position couchée ou  $> 550$  pmol / l,) ou urinaire ( $> 63$  nmol / jour)



**Figure 14: Alternative pour la stratégie diagnostique dans l'hyperaldostéronisme primaire. D'après (Steichen, 2012)**

## G. IMAGERIE

### I. La tomodensitométrie [TDM]

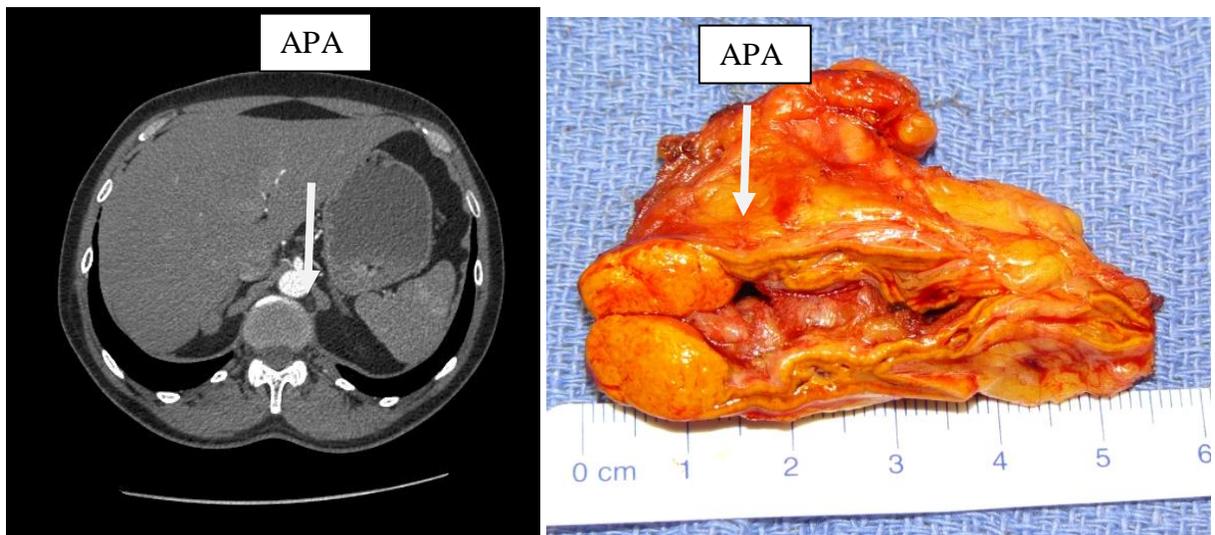
Une fois le diagnostic hormonal d'HAP posé selon ces critères, les patients ont une imagerie surrénale le plus souvent par TDM. L'objectif est double :

- Orienter vers le caractère tumoral ou non de HAP en étudiant l'aspect des surrénales. En effet un nodule surrénal unique mesurant de 10 à 20 mm de grand axe, sans lésion sur la surrénale controlatérale orientera davantage vers une cause unilatérale de type

adénome de Conn, alors que la présence de deux surrénales normales ou de deux surrénales hyperplasiques orientera vers une cause bilatérale.

- Eliminer une lésion maligne par la taille de la tumeur, ainsi que la densité non injectée (une lésion inférieure à 10 Unités Hounsfield est un adénome dans 98% des cas (Boland, 1998)).

Bien qu'elle soit un indicateur de l'étiologie de l'HAP, le TDM ne permet pas d'affirmer avec certitude conclure sur la nature uni ou bilatérale de l'HAP. En effet, plusieurs études ont montré que si la décision de surrénalectomie n'était prise que sur la tomodensitométrie, 20% des patients avec une forme latéralisée n'auraient pas été opérés, et la chirurgie aurait été proposée à 25% des patients ayant une forme bilatérale (Young, 2004).



**Figure 15: Adénome surrénalien droit visualisé sur un TDM et macroscopiquement en post opératoire.**

## II. Le cathétérisme veineux surrénal

L'examen de référence pour diagnostiquer un HAP latéralisé est actuellement le cathétérisme veineux surrénal bilatéral [KTVS].

Cet examen consiste en l'introduction de deux cathéters le long de la veine cave inférieure jusqu'aux veines surrénales, ce qui permet de prélever du sang de façon simultanée dans les deux effluents surrénaux ainsi que dans la veine cave inférieure. La comparaison des concentrations de

cortisol dans les veines surrénales et dans la veine cave inférieure permet d'affirmer la validité de l'examen ( $\text{Ratio Cortisol}_{\text{Veine Surrénale}} / \text{Cortisol}_{\text{Veine Cave Inférieure}} \geq 2$ ). Il s'agit d'un examen invasif, techniquement difficile de part la petite taille et l'angulation des veines surrénales.

Si la validité de l'examen est établie, la comparaison des rapports de concentration aldostérone sur cortisol dans les deux veines surrénales permet d'affirmer ou d'exclure la latéralisation.

Cependant cet examen considéré comme examen de référence présente de nombreuses difficultés :

- C'est un examen invasif qui comporte donc un risque de iatrogénie, et qui de part sa difficulté technique doit impérativement être réalisé par un opérateur entraîné (généralement un radiologue interventionnel). Une étude rétrospective récente regroupant les données de 20 centres et de 2604 KTVS réalisés sur 6 ans a montré que le KTVS est réalisé chez 77% des patients ayant un diagnostic d'HAP, potentiellement opérables et que le risque de rupture de la veine surrénale au cours de l'examen est estimé à 0,61% (Rossi, 2012).
- Il existe une grande hétérogénéité dans les procédures. Certains préconisent la réalisation d'un cathétérisme simultané des deux veines surrénales. D'autres préfèrent une cathétérisation séquentielle, dans ce cas il est habituel de perfuser de l'ACTH pour stimuler au maximum les sécrétions d'aldostérone et de cortisol et réduire les fluctuations dues au stress.
- L'interprétation des résultats est variable selon les équipes avec des seuils de sélectivité et de latéralisation qui fluctuent considérablement en fonction des différents centres (Harvey, 2006) comme le montre le Tableau 4.

	Cortisol VCI/surrénale	Ratio A/C Côté Dominant /Coté Dominé	Ratio A/C Côté Dominé sur VCI
<b>KTVS sans stimulation par l'ACTH</b>			
(Rossi, 2008)	>1,1	>2	Non Utilisé
(Stowasser, 2004)	>3	>2	<1
(Zarnegar, 2008)	>1	>4 ou 5	Non Utilisé
(Letavernier, 2008)	>2	>5	Non Utilisé
(Mulatero, 2008)	>2	>4	<1
<b>KTVS avec stimulation par l'ACTH</b>			
(Espiner, 2003)	>2	>4	<1
(Murashima, 2009)	>10	>4	Non Utilisé
(Young, 2004)	>5	>4	Non Utilisé
(Auchus, 2009)	>3	>4	Non Utilisé

**Tableau 4: Seuils de sélectivités et de latéralisations du KTVS en fonction des différents centres.**

A : Aldostérone, C : Cortisol, VCI : Veine Cave Inférieure.

## **H. ÉTIOLOGIES**

La question principale qui se pose devant un HAP sporadique est celle de son étiologie tumorale ou non. L'hétérogénéité de la présentation clinique ainsi que les données moléculaires connues laissent à penser que l'HAP sporadique regroupe un ensemble de pathologies hétérogènes.

Au niveau clinique, on différenciera tout d'abord les formes unilatérales des formes bilatérales.

Les formes unilatérales regroupent :

- L' APA encore appelé adénome de Conn. Il s'agit d'une hypersécrétion localisée au sein d'un adénome radiologiquement unique.
- Les hyperplasies unilatérales des surrénales : il s'agit d'une hypersécrétion unilatérale d'aldostérone sans adénome visualisé sur le TDM

- Les corticosurrénales ou formes malignes.

Les formes bilatérales regroupent :

- Les hyperplasies bilatérales des surrénales
- Les formes familiales

L'intérêt principal de différencier les différentes formes de la maladie résulte des implications thérapeutiques. En effet les formes unilatérales pourront bénéficier d'un traitement chirurgical, et les formes bilatérales seront traitées médicalement.

## I. COMPLICATIONS

On a longtemps considéré que l'importance de la prise en charge de l'HAP résultait de la nécessité de contrôler l'HTA et l'hypokaliémie et que les complications cardiaques et vasculaires étaient liées à ces deux symptômes de la maladie.

Cependant depuis les années, 2000, il est apparu une autre problématique, celle de l'aldostérone et de ses effets cardiovasculaires propres indépendamment de l'HTA et de l'hypokaliémie.

L'identification de la présence de MR dans le cœur, les vaisseaux et dans le cerveau a conduit à l'hypothèse que l'aldostérone aurait un effet propre sur ces organes indépendamment de l'angiotensine II (Rocha, 2002).

En 1992, Brilla et Weber ont montré que l'excès d'aldostérone associé à un régime riche en sel chez le rat conduisait à une fibrose myocardique (Brilla, 1992). Par la suite ces observations ont été retrouvées chez l'homme dans des études basées sur l'échographie cardiaque, ainsi que plus récemment sur l'imagerie par résonance magnétique cardiaque.

Ainsi les principaux effets délétères de l'aldostérone sur le système cardiovasculaire sont (Epstein, 2001; Duprez, 2007; Nguyen Dinh Cat, 2012):

- au niveau cardiaque : hypertrophie ventriculaire gauche [HVG], troubles du rythme, remodelage cardiaque, fibrose myocardique, inflammation, stress oxydatif
- au niveau vasculaire : dysfonction endothéliale, remodelage vasculaire, rigidité artérielle, stress oxydatif.

Chez l'homme, un lien entre aldostérone et insuffisance cardiaque congestive ainsi que l'effet bénéfique des traitements anti minéralocorticoïdes en terme de mortalité ont été démontrés dans plusieurs grandes études multicentriques randomisées en double aveugle.

Ainsi dans l'étude RALES (Randomized Aldactone Evaluation Study), 1663 patients avec une insuffisance cardiaque et une fraction d'éjection inférieure à 35% ont été randomisés pour recevoir soit 25 mg de spironolactone une fois par jour, soit un placebo (Pitt, 1999). L'étude a été interrompue prématurément au bout de 24 mois en raison d'une diminution significative de la morbidité et de la mortalité (réduction des décès de 30%, des hospitalisations pour événement cardiovasculaire de 30%).

Dans l'étude EPHEUS (Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study), plus de 6600 patients présentant une insuffisance cardiaque séquellaire d'un infarctus du myocarde ont été randomisés pour recevoir soit 25 à 50 mg d'éplérénone, soit un placebo (Pitt, 2003). Après un suivi moyen de 16 mois, l'Eplérénone a permis une diminution de la mortalité et de la morbidité (réduction des décès de 15%, des hospitalisations pour événement cardiovasculaire de 9%).

L'effet bénéfique de l'éplérénone a également été montré dans l'étude EMPHASIS-HF chez des patients présentant une insuffisance cardiaque chronique associé à une symptomatologie modérée (Zannad, 2011). Ainsi l'adjonction d'éplérénone à leur traitement usuel a permis de réduire aussi bien le risque de décès que le risque d'hospitalisation (réduction des hospitalisations de 22% et des hospitalisations pour événement cardiovasculaire de 28%).

Toutes ces études ont conduit à étudier les complications cardiaques et vasculaires liées à l'HAP.

Au niveau cardiaque, il a ainsi été montré que des patients ayant un HAP appariés à des hypertendus essentiels sur le niveau de PA, la durée de l'HTA, l'âge et le sexe ont une masse ventriculaire gauche plus élevée associée à une dysfonction diastolique (Rossi, 2002).

Il a également été montré que le traitement de l'HAP conduit à une réduction de ces anomalies cardiaques. Une régression des signes d'HVG définie sur électrocardiogramme a été montrée après traitement de l'HAP (Pringle, 1988). La réversion de l'HVG mesurée en échographie a été suggérée dans une étude récente rétrospective sur 20 sujets HAP après 20 mois de suivi. Les prédictors de la diminution de masse VG étaient le degré d'HVG préopératoire et la baisse de la PAS (Lin, 2011).

Une étude récente a également montré que les patients présentant un HAP ont un index de fibrose évalué en IRM cardiaque bien plus élevé que des volontaires sains appariés sur l'âge (Su, 2012). Cependant cette étude préliminaire doit être réalisée avec un groupe contrôle de patients hypertendus afin de dissocier les effets dus à l'aldostérone des effets dus à l'HTA.

Concernant le risque vasculaire, plusieurs études ont été réalisées. Dans une première étude comprenant 124 patients présentant un HAP, appariés à 465 hypertendus essentiels sur le sexe, l'âge et la pression artérielle, il a été montré que l'HAP est associé un sur-risque d'accident Vasculaire cérébral (OR=4,2), d'infarctus du myocarde (OR=6,5) et de fibrillation auriculaire (OR=12) (Milliez, 2005).

Catena a montré quant à lui que non seulement il existe bien un sur-risque vasculaire chez les patients présentant un HAP par rapport à des patients ayant une HTA essentielle, mais que de plus ce sur-risque est réversible par le traitement de l'HAP qu'il soit chirurgical ou médical (spironolactone) (Catena, 2008).

Une étude de notre établissement a également montré une prévalence plus importante des événements cardiovasculaires chez des sujets HAP en comparaison à un groupe hypertendus essentiels (Steichen, 2009) (cf. Tableau 5).

	HAP	HE	Odds Ratio* [IC 95%]
Insuffisance cardiaque	7.4%	3.6%	2.2 [1.3, 3.7]
Maladie Coronaire	5.6%	1.0%	5.5 [2.3, 13.3]
Fibrillation auriculaire	2.0%	0.3%	2.6 [0.5, 14.8]
AVC	7.5%	10.3%	0.6 [0.4, 1.0]
DFG < 60 ml/min/1.73m <sup>2</sup>	13.1%	7.5%	2.1 [1.5, 3.1]

**Tableau 5: Comparaison de la prévalence des événements cardiovasculaires entre des sujets présentant un HAP (n=460) et des hypertendus essentiels (HE) (n=1291).**

*HE Hypertension Essentielle IC 95% : Intervalle de confiance 95% DFG : Débit de Filtration glomérulaire*

Au niveau rénal, plusieurs études ont montré la relation entre des taux élevés d'aldostérone et la dégradation de la fonction rénale (Ruggenti, 1998). Chez les patients présentant un HAP, il existe une élévation de la microalbuminurie. Ce marqueur d'un dysfonctionnement rénal est partiellement réversible avec le traitement de l'HAP (Sechi, 2006).

## **J. TRAITEMENT**

Le traitement de l'hyperaldostéronisme primaire a donc trois objectifs principaux : le contrôle de la kaliémie, la guérison ou du moins l'amélioration du contrôle de la PA, et le contrôle de l'hyperaldostéronisme.

### **I. Le Traitement Chirurgical**

Chez les patients présentant une forme unilatérale, le traitement le plus logique pour atteindre ces objectifs est la suppression de l'hypersécrétion d'aldostérone par exérèse de la surrénale.

#### ***1. Technique chirurgicale et morbidité***

Depuis la première description de la surrénalectomie laparoscopique en 1992 (Gagner, 1992), la laparoscopie est devenue la voie d'abord de référence, en raison de sa plus faible morbidité et de séjours hospitaliers plus courts. Cette voie d'abord moins invasive a permis une augmentation de la prévalence de la surrénalectomie dans les HAP (27% après l'introduction de la laparoscopie par rapport à 13% avant,  $p < 0,05$ ) (Chavez-Rodriguez, 2005).

La durée opératoire moyenne de la surrénalectomie laparoscopique dans les séries hospitalières varie entre 2 à 3 heures, avec un taux de conversion en chirurgie ouverte de 3,4% et une durée moyenne de séjour de 3 jours (Brunt, 2006).

Dans une série de 560 procédures chez 520 patients, les complications majeures sont survenues chez 1,3% des patients (7/520: pneumothorax, pneumonie, infarctus du myocarde, insuffisance cardiaque, saignement nécessitant une transfusion) et les complications mineures dans 14,4% (principalement assouplissement temporaire et / ou une hypoesthésie de la paroi abdominale) (Walz, 2006). Ainsi, la surrénalectomie laparoscopique semble avoir un faible taux de morbidité, mais les équipes qui publient leurs données sont généralement très expérimentées, avec seulement un ou deux chirurgiens spécialisés opérant tous les patients. Plusieurs cas de complications majeures en dehors des centres de référence ont été rapportés (Tessier, 2009).

## ***2. Résultats de la surrénalectomie laparoscopique***

### Kaliémie et anomalies hormonales

Le traitement chirurgical permet de guérir l'hypokaliémie chez plus de 95% des patients, et abolit l'hypersécrétion d'aldostérone chez plus de 90% chez les patients ayant une atteinte unilatérale (Ishidoya; Zarnegar, 2007; Walz, 2008).

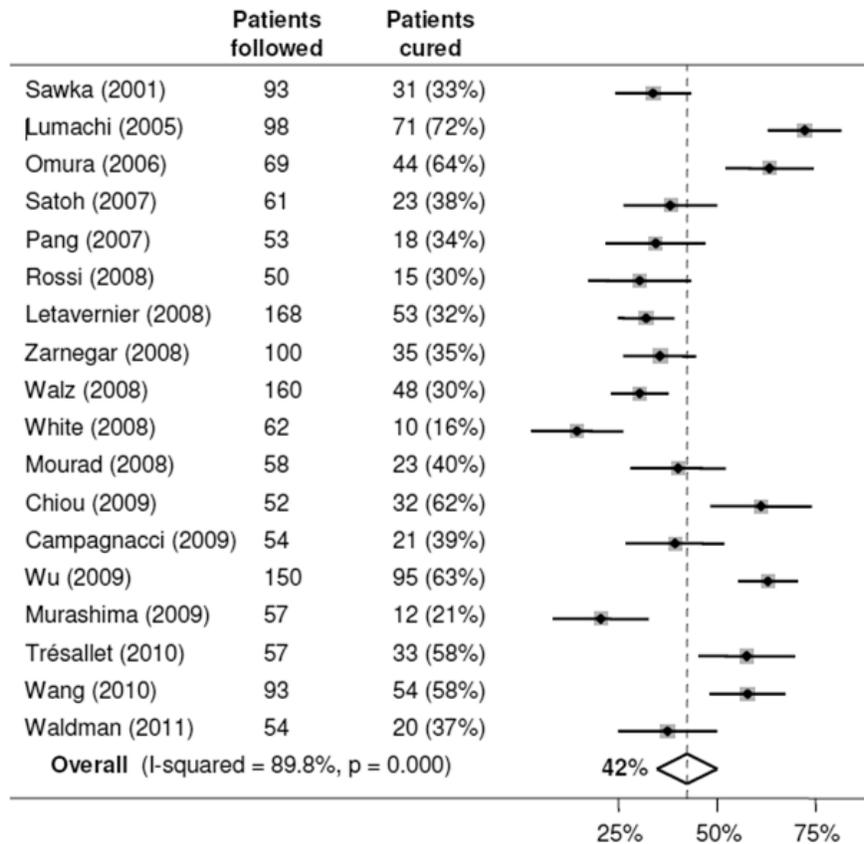
### Pression artérielle

Concernant le taux de guérison de l'HTA, il est autour de 40% si l'on prend en considération toutes les séries de la littérature incluant plus de 50 patients et publiées après 2000 (Steichen, 2012) (cf. Figure 16).

Cependant, même lorsque la surrénalectomie ne permet pas la guérison de l'HTA, elle mène habituellement à une amélioration cliniquement significative du contrôle tensionnel, avec des niveaux de PA inférieurs (typiquement de -25 à -40 mmHg) associés ou non à une réduction du score de traitement (généralement -1 à -2 classes de médicaments). Ainsi, si l'on prend en compte la guérison et l'amélioration, 74 à 100% des patients ont un bénéfice tensionnel suite à l'intervention chirurgicale (Steichen, 2012).

Beaucoup de facteurs prédictifs de guérison ou de la persistance d'HTA ont été signalés dans les différentes séries. Si l'on ne prend en considération que les facteurs qui ont été identifiés comme étant statistiquement significatifs dans au moins une étude multivariée, les facteurs de mauvais pronostic sont : le sexe masculin, l'âge, la présence d'antécédents familiaux d'HTA, la durée de l'HTA, une PA préopératoire élevée, un score de traitement préopératoire élevé, un Index de masse corporelle élevé, une kaliémie préopératoire plus élevée, l'existence d'une artériolosclérose (Steichen, 2012).

Ces paramètres doivent être considérés avec précaution car aucun ne ressort dans toutes les études. Ainsi à l'échelon d'un individu à ce jour, il est impossible de prédire l'issue tensionnelle en préopératoire. De plus l'accent mis sur la guérison de l'HTA obscurcit la guérison probable de l'hypokaliémie et de l'hyperaldostéronisme ainsi que l'amélioration des niveaux de PA atteints même chez les patients souffrant d'HTA persistante après la chirurgie.



**Figure 16: Analyse des séries de plus de 50 patients pour le bénéfice tensionnel du traitement chirurgical publiées après 2000.**

## II. Le Traitement Médical

Bien que la surrénalectomie unilatérale ait été proposée par une équipe chez des patients ayant une hyperplasie bilatérale des surrénales avec un taux de guérison de 15% et une amélioration chez 20% des patients (Sukor, 2009), le traitement médicamenteux reste le traitement de référence dans les formes bilatérales. Il repose en premier lieu sur les antagonistes du MR : la spironolactone et l'éplérénone.

### 1. La spironolactone

Le médicament de référence est la spironolactone en raison de la physiopathologie de l'HAP et de la longue expérience clinique de cette molécule.

En effet cet antagoniste de l'aldostérone se lie par compétition au MR et empêche donc la liaison de l'aldostérone ou de toute autre hormone minéralocorticoïde avec le récepteur.

Cette molécule, de résorption digestive lente (son action débute 24 heures après l'absorption du comprimé et dure 24-48 heures) a un métabolisme complexe. Son élimination est urinaire (30% en 5 jours) et fécale (20% en 5 jours). Les propriétés pharmacocinétiques de la spironolactone peuvent avoir des conséquences délétères à l'introduction du traitement (efficacité retardée notamment sur la kaliémie) et à l'arrêt du traitement (effet rémanent pendant plusieurs jours).

Les études observationnelles réalisées chez plus de 100 patients atteints d'HAP ont montré une diminution de la PAS de 25% et de la PAD de 22% (posologie variant de 50 à 400 mg par jour avec une durée de traitement de 1 à 96 mois) (Lim, 2001).

La spironolactone n'est pas spécifique du MR, elle agit également sur le récepteur à la progestérone (cagoniste) et sur le récepteur aux androgènes (action antagoniste) ce qui lui confère des propriétés antiandrogéniques. Les conséquences de cette non-spécificité sont une incidence élevée d'effets indésirables tels qu'une dysfonction érectile, une gynécomastie douloureuse chez l'homme et des dysménorrhées chez la femme. Ces effets sont dose-dépendants : l'incidence des gynécomasties chez l'homme est de 6,9% après 6 mois pour une posologie inférieure à 50 mg/jour et de 52% lorsque la posologie dépasse 150 mg/jour (Jeunemaitre, 1987).

### *2. L'éplérénone*

L'éplérénone est un antagoniste spécifique du MR qui n'a donc pas d'effet anti-androgénique comme la spironolactone. Ce traitement représente une alternative thérapeutique à la spironolactone très intéressante au vu de sa meilleure tolérance. Cependant ce médicament, utilisé aux Etats-Unis et au Japon dans le traitement de l'HTA, n'a pas d'autorisation de mise sur le marché en Europe pour cette indication.

De plus ce médicament, moins puissant que la spironolactone, est donc moins efficace. Une étude multicentrique randomisée en double aveugle a ainsi montré qu'après 16 semaines de traitement la diminution de la PA était moindre sous éplérénone (PAS/PAD :-9,9±2,3 mmHg/ -5,6±1,3 mmHg) que sous spironolactone (-27,0 ± 2,3 mmHg/-12,5 mmHg) (Parthasarathy, 2011).

Ainsi les bloqueurs du MR bien qu'intéressants au niveau physiopathologie ne suffisent pas pour contrôler la PA.

Il est possible d'adjoindre d'autres antihypertenseurs à ces molécules spécifiques. Les diurétiques épargneurs potassiques de type Amiloride sont indiqués en première intention étant donné qu'ils bloquent le canal ENaC. Les autres antihypertenseurs : inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, inhibiteurs calciques peuvent également être prescrits, mais une résistance à une plurithérapie peut malgré tout persister.

## **QUESTIONS POSEES ET OBJECTIFS DE LA THESE**

L'HAP est une pathologie fréquente, à tel point que les recommandations japonaises, publiées en 2011, conseillent de le rechercher chez tout patient présentant une HTA (Nishikawa, 2011).

Les difficultés diagnostiques et thérapeutiques sont en partie dues à l'hétérogénéité de cette pathologie. En effet il existe différents phénotypes : APA, Hyperplasie bilatérale des surrénales, Hyperplasie unilatérale d'une surrénale, FH1, FH2, FH3). De plus les analyses transcriptomiques mettent en évidence plusieurs sous groupes d'APA, et seulement 34-45% des APA sont porteurs de mutation somatique sur *KCNJ5* (ce qui signifie qu'il y a d'autres gènes que *KCNJ5* impliqués dans la pathogénie de l'HAP).

L'HAP représente un continuum entre l'HTA à rénine basse qui est une forme d'HTA essentielle et l'APA (McAreevey, 1983). C'est ce qui explique le fait que la notion de seuil soit à ce point essentiel pour les dosages de rénine et d'aldostérone, ainsi que les difficultés et hétérogénéités diagnostiques décrites précédemment.

Il reste donc difficile de proposer à ces patients une prise en charge consensuelle tant pour le diagnostic que pour la thérapeutique.

Les principales questions qui se posent dans la pratique clinique sont :

- Quelle alternative médicamenteuse peut-être proposée pour le traitement de l'HAP ?
- Comment peut-on améliorer le diagnostic d'HAP par l'identification de nouveaux biomarqueurs ?

La première partie de la thèse abordera les études cliniques que nous avons menées avec une nouvelle classe thérapeutique : les inhibiteurs de l'aldostérone synthase, ainsi que les questions non résolues que nous pose cette nouvelle classe d'antihypertenseurs.

La seconde partie de la thèse sera consacrée à la recherche de marqueurs diagnostiques. La recherche de nouveaux biomarqueurs pour le diagnostic d'HAP nous a conduits à nous intéresser aux microARN [miR] pour identifier ceux impliqués dans la pathogénie de l'HAP afin d'identifier de nouveaux ARN cibles impliqués dans la maladie et de tester la possibilité de les

utiliser comme biomarqueur. L'hypothèse était qu'une dérégulation de leur expression pouvait être impliquée dans la tumorigénèse et la surproduction d'aldostérone.

Cette difficulté à établir des marqueurs diagnostiques provient en partie de l'absence d'examen de référence permettant d'affirmer le diagnostic d'HAP et donc de valider des biomarqueurs potentiels. Nous avons donc également recherché un marqueur immunohistochimique qui pourrait être utilisé en post opératoire. Cette partie sera développée dans la troisième partie de la thèse.

# **CHAPITRE 1**

INHIBITION DE L'ALDOSTÉRONE SYNTHASE



## **A. TRAVAUX ANTÉRIEURS**

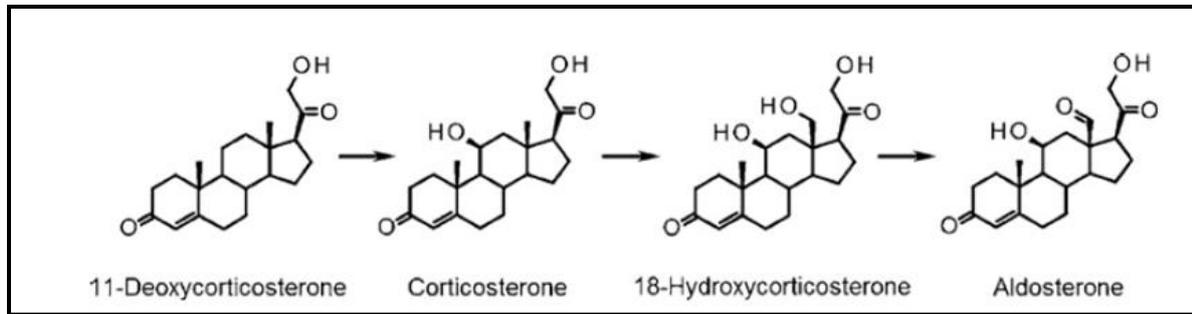
Comme nous l'avons vu en introduction, l'aldostérone a des effets génomiques et non génomiques rénaux et extrarénaux (Fuller, 2005; Funder, 2005). Les effets non génomiques ne nécessitent pas de signalisation à travers les voies classiques de l'activation des gènes, la transcription et la synthèse des protéines. L'ampleur de ces deux types d'effets dépend des concentrations circulantes de l'aldostérone produite par la surrénale et éventuellement par d'autres organes qui expriment également l'aldostérone synthase (Bassett, 2004). Les contributions relatives des effets génomiques et non génomiques de l'aldostérone sur les pathologies rénales et cardiovasculaires, le syndrome métabolique et sur l'HTA résistante ne sont pas clairement élucidées (Funder, 2005).

La possibilité de développer de nouveaux agents pharmaceutiques permettant de bloquer les effets non génomiques de l'aldostérone représente donc une option thérapeutique intéressante.

### **I. L'aldostérone synthase**

Comme vu en introduction, la capacité des cellules glomérulées à produire de l'aldostérone est largement contrôlée par la régulation de la transcription de *CYP11B2*. Ce gène situé sur le chromosome 8q22 contient neuf exons et huit introns. L'AS, qui est située dans la membrane mitochondriale interne, catalyse les trois dernières étapes de synthèse dans l'aldostérone: 11  $\beta$  hydroxylation de la DOC en corticostérone (B), suivie par 18-hydroxylation de la corticostérone en 18-hydroxycorticostérone et la 18-oxydation de la 18 hydroxycorticostérone en aldostérone (Bassett, 2004) (cf. Figure 17).

Cette enzyme a été purifiée pour la première fois en 1991 à partir de mitochondries d'APA (Ogishima, 1991). Cependant depuis 20 ans, il existe de nombreuses difficultés pour étudier cette protéine de membrane en raison de son caractère hydrophobe. Cette enzyme, responsable de l'étape finale de la synthèse d'aldostérone, nécessite un transfert d'électrons à partir du système adrénodoxine réductase / adrénodoxine pour catalyser la production de l'aldostérone. Récemment, l'expression d'AS humaine dans la bactérie *Escherichia Coli* a permis d'identifier de nouveaux composés issus de la 19- et de la 18-hydroxylation de la DOC (Hobler, 2012).



**Figure 17: Schéma de la synthèse de l'aldostérone à partir de la DOC**

*L'aldostérone synthase, transforme la DOC en corticostérone par une 11  $\beta$  hydroxylation ensuite, la corticostérone est 18-hydroxylée en 18-hydroxycorticostérone et enfin 18-oxydée en aldostérone.*

La synthèse de l'aldostérone est étroitement liée à celle du cortisol, qui se produit dans la zone fasciculée du cortex surrénalien et dont la dernière étape est l'hydroxylation du 11-désoxycortisol (encore appelé composé S) en cortisol.

Les gènes *CYP11B2* et *CYP11B1* sont situés à 40 kb d'écart, sur le chromosome 8q22. Les séquences des régions codantes de ces gènes sont identiques à 95% et les protéines codées sont identiques à 93% (Bassett, 2005; Connell, 2008). Toutefois, l'expression *CYP11B2* est confinée à la zone glomérulée, alors que *CYP11B1* est exprimée dans la zone fasciculée et dans la zone réticulée. Par ailleurs, il existe des différences importantes entre les régions régulatrices des deux gènes. En effet, comme nous l'avons vu en introduction, la région promotrice de *CYP11B2* située en 5' est régulée par l'angiotensine II et le potassium, tandis que la région promotrice de *CYP11B1* comprend des éléments sensibles à l'ACTH.

## II. Le déficit en aldostérone synthase

### 1. Modèles murins d'inactivation de l'AS

Afin d'étudier les effets de l'aldostérone, Makhanova et collaborateurs ont étudié un modèle murin de souris invalidées pour le gène de l'AS. Ils ont ainsi montré que ces souris AS<sup>-/-</sup> survivent en régime normosodé, mais ont une PA basse associée à des troubles ioniques. Les concentrations d'aldostérone sont indétectables avec des taux de rénine à 40 fois la normale et une augmentation des taux de corticostérone (Makhanova, 2006).

Les souris AS<sup>+/-</sup> n'ont quant à elles pas de phénotype spécifique, la PA est comparable à celle des souris AS<sup>+/+</sup> et il n'y a pas d'anomalie dans le ionogramme sanguin.

30% des souris  $AS^{-/-}$  décèdent prématurément de déshydratation. Par contre les souris adultes ont une hémocrite et une clairance de la créatinine normale ce qui est en faveur de mécanismes de régulation permettant de normaliser la balance sodée. En régime pauvre en sel, le phénotype de ces souris  $AS^{+/-}$  et  $AS^{-/-}$  est plus sévère

## 2. Pathologie humaine

Le déficit en aldostérone synthase appelé déficit en corticostérone méthyl oxydase (CMO) est classifié en deux groupes: le déficit en corticostérone methyl-oxydase de type I (CMO I) et de type II (CMO II).

Les patients avec un déficit en CMO de type I ont des niveaux d'aldostérone et de tétrahydroaldostérone très bas avec des niveaux de 18-hydroxycorticostérone normaux.

Les patients avec un déficit en CMO de type II on des niveaux de 18 hydroxy-corticostérone élevés associés à des niveaux indétectables d'aldostérone plasmatique et de tétrahydroaldostérone urinaire (Nguyen, 2010).

Les deux pathologies ont le même phénotype : retard de développement, vomissements, déshydratation, hyperkaliémie, hyponatrémie, acidose métabolique avec élévation des taux de rénine. Les symptômes ont tendance à régresser à l'âge adulte.

Le diagnostic doit être suspecté dans des cas de déshydratation néonatale sévère associée à une élévation de la rénine avec des taux d'aldostérone diminués (classiquement la concentration d'aldostérone est indosable dans le CMO I et diminuée dans le CMO II). Ensuite le dosage de corticostérone et le rapport corticostérone sur aldostérone permettent de poser le diagnostic. La distinction entre les deux types repose sur les rapports 18 hydroxycorticostérone sur aldostérone et corticostérone sur 18 hydroxycorticostérone (Peter, 1999).

Le traitement repose sur la prescription de Fludrocortisone généralement associée à une supplémentation en sel.

Au niveau génétique, les deux variants de la maladie sont associés à des mutations différentes du gène *CYP11B2* (Peter, 1999). Cependant il n'y a à ce jour pas d'explication moléculaire pour expliquer l'abolition de l'activité enzymatique de l'activité 18-hydroxylase dans le déficit en CMO I et la persistance d'une activité 18- hydroxylase associée à l'abolition de la 18-oxydation dans le déficit en CMO II. Dans les deux cas, il persiste une activité  $\beta$  hydroxylase.

### III. L'inhibition de l'aldostérone synthase dans l'HAP

Comme nous l'avons vu en introduction, le blocage des effets biologiques de l'aldostérone repose sur les antagonistes MR. Ils sont également utilisés pour le traitement de l'hypertension (Jansen, 2009), en particulier pour les formes d'HTA dans lesquelles l'aldostérone semble jouer un rôle majeur, comme l'HAP (Lim, 2001; Parthasarathy, 2011), l'hypertension à rénine basse (Hood, 2007), l'hypertension résistante (Chapman, 2007; Calhoun, 2008; Vaclavik, 2011), le syndrome métabolique (Briet, 2011) et l'hypertension compliquée d'une HVG (Pitt, 2003).

#### 1. *Facteurs limitants de l'utilisation des antagonistes MR*

Cependant, plusieurs facteurs peuvent limiter l'utilisation des antagonistes du MR. La spironolactone a un profil de tolérance médiocre (Menard, 2004). et l'éplérénone moins puissante que la spironolactone sur une base mg par mg, chez les patients atteints d'HTA essentielle (Weinberger, 2002) ou d'HAP (Parthasarathy, 2011).

De plus, ces deux médicaments induisent une augmentation de la rénine plasmatique et des concentrations d'aldostérone, limitant potentiellement l'efficacité du blocage MR et renforçant ainsi les effets MR-indépendants de l'aldostérone (Jansen, 2009).

L'inhibition de l'aldostérone synthase a ainsi émergé comme une nouvelle option thérapeutique. L'objectif est de diminuer les concentrations d'hormone à la fois dans le plasma et les tissus, réduisant ainsi les effets MR-dépendants et MR-indépendants de l'aldostérone dans les organes cibles cardiaques, vasculaires et rénaux.

Les premières tentatives pour inhiber la synthèse d'aldostérone impliquaient l'utilisation de différents inhibiteurs sélectifs de la stéroïdogénèse (Lim, 2001), comme l'Aminoglutéthimide ou Orimetène (inhibiteur de l'étape initiale de la synthèse des stéroïdes surrenaliens), la Métyrapone (inhibiteur de la 11- $\beta$ -hydroxylase) ou le Trilostane (inhibiteur de la 3- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase) pour traiter les petites séries de patients hypertendus avec ou sans HAP (Lim, 2001). L'inhibition, par ces médicaments, des premières étapes de la stéroïdogénèse impliqués dans les deux axes glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes était un problème majeur de sécurité et ces inhibiteurs n'ont généralement pas permis de contrôler efficacement dans la PA à long terme.

Les conséquences d'une approche ciblée à l'inhibition pharmacologique spécifique de la synthèse d'aldostérone n'ont été étudiées chez l'homme que récemment à la suite de la découverte des propriétés antialdostérone du Fadrozole, un inhibiteur non stéroïdien de l'aromatase, utilisé dans le traitement du cancer du sein avancé (à des posologies de 1 à 2 mg/jour). Ainsi Lamberts et collaborateurs ont montré que le Fadrozole inhibe la 11  $\beta$ -hydroxylase et l'aldostérone synthase in vitro et chez l'homme (Lamberts, 1989). L'administration de Fadrozole à des doses supérieures à 4 mg/jour pendant deux semaines chez les sujets sains de sexe masculin a bloqué la réponse de l'aldostérone lors d'une stimulation en aigu par le Synacthène sans pour autant modifier la réponse des glucocorticoïdes (Trunet, 1992).

## ***2. Premières études : LE FAD286A***

Le Fadrozole est un mélange racémique de deux énantiomères, le dextroénantiomère FAD286A étant plus spécifique de l'aldostérone synthase.

Cet énantiomère est donc une molécule candidate clé pour l'inhibition sélective de l'aldostérone synthase. Le Fadrozole et son dextroenantiomère FAD286A ont été caractérisés in vitro dans des systèmes cellulaires et in vivo dans diverses espèces.

In vitro, dans une lignée cellulaire stable de hamster V79, le FAD286A inhibe *CYP11B2* avec une concentration inhibitrice médiane (CI50) de 1,6 nM, mais aussi *CYP11B1*, avec une CI50 de 9,9nM, ce qui donne un rapport de sélectivité de seulement 6 (LaSala, 2009). Les études cinétiques ont montré que le FAD286A inhibe par compétition l'activité des deux enzymes avec des constantes d'inhibition de 0,8 pour *CYP11B2*, et de 2,2 pour *CYP11B1* (LaSala, 2009).

Le FAD286A entraîne une diminution de la production d'aldostérone dans des cellules corticosurrénales H295R (Fiebeler, 2005).

Les études de preuve de concept dans des modèles animaux ont montré que le FAD286A diminue les concentrations plasmatiques et urinaires d'aldostérone de façon dose-dépendante et augmente l'activité rénine plasmatique chez des rats spontanément hypertendus exposés à un régime pauvre en sel et riche en potassium (Menard, 2006).

Par ailleurs l'association de spironolactone avec le FAD286A chez ces mêmes rats spontanément hypertendus conduit à une déshydratation sévère et à une hyperkaliémie, ce qui démontre le rôle important des concentrations résiduelles d'aldostérone ainsi que du blocage du MR même en présence de faibles concentrations d'aldostérone (Menard, 2006).

Il a également été montré dans des modèles animaux que le FAD286A permet de protéger les organes cibles. Ainsi chez des rats surexprimant les gènes de la rénine et de l'angiotensinogène, l'administration de FAD286A diminue l'atteinte des organes cibles avec une diminution de la mortalité, de l'HVG et de l'albuminurie (Fiebeler, 2005). Dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque chronique, le FAD286A permet une amélioration de la fonction ventriculaire gauche et une diminution du remodelage, avec une efficacité similaire à celle de la spironolactone (Mulder, 2008). Des effets bénéfiques dans un modèle de fibrose rénale ont aussi été rapportés (Fiebeler, 2005).

Le FAD286A a servi de base pour la synthèse du LCI699 dont le développement clinique a été réalisé.

### **3. LCI699 : Phase I**

Le LCI699, dérivé du FAD286A est la première molécule administrée à l'homme de la classe des inhibiteurs de l'aldostérone synthase.

Les études chez le volontaire sain ont montré que le LCI699 est rapidement absorbé (T<sub>ma</sub> : 1 heure), a une demi-vie plasmatique de 4 heures et ne s'accumule pas après l'administration de plusieurs doses jusqu'à 3 mg par jour (Menard, 2010).

Après l'administration de la première dose de LCI699, l'aldostérone plasmatique a diminué de manière dose-dépendante (35-41%). Après 7 doses quotidiennes de LCI699 (1-10 mg), l'aldostérone plasmatique a diminué de 27 à 44% et l'aldostérone urinaire de 22 à 83%. En raison de la courte demi-vie de cette molécule, cet effet est réversible après 24 heures. L'administration répétée de LCI699 à des doses de 0,5 à 3 mg par jour en une prise régulière a été accompagnée par une augmentation dose-dépendante de l'activité rénine plasmatique, ce qui reflète la négativation de la balance sodée. Les effets de 0,5 mg par jour de LCI699 sur la volémie sont équivalents à ceux de 100 mg d'éplérénone par jour.

Jusqu'aux doses de 3 mg par jour, le LCI699 n'a eu aucun effet sur les taux plasmatiques de cortisol, ni sur la réponse lors du test au Synacthène. A partir de la dose de 3mg/ jour, un blocage partiel de la réponse du cortisol au test au Synacthène est observé témoignant de la non-sélectivité du LCI699 pour *CYP11B2*. À des doses supérieures à 3 mg/j, des signes minimes d'hypoaldostéronisme avec une tachycardie posturale, une perte de poids chez 3 volontaires sur 12, et une hyponatrémie modérée ont été observés (Menard, 2010).

## B. TRAVAUX ACTUELS : PREUVE DE CONCEPT CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'HAP : ARTICLE 1

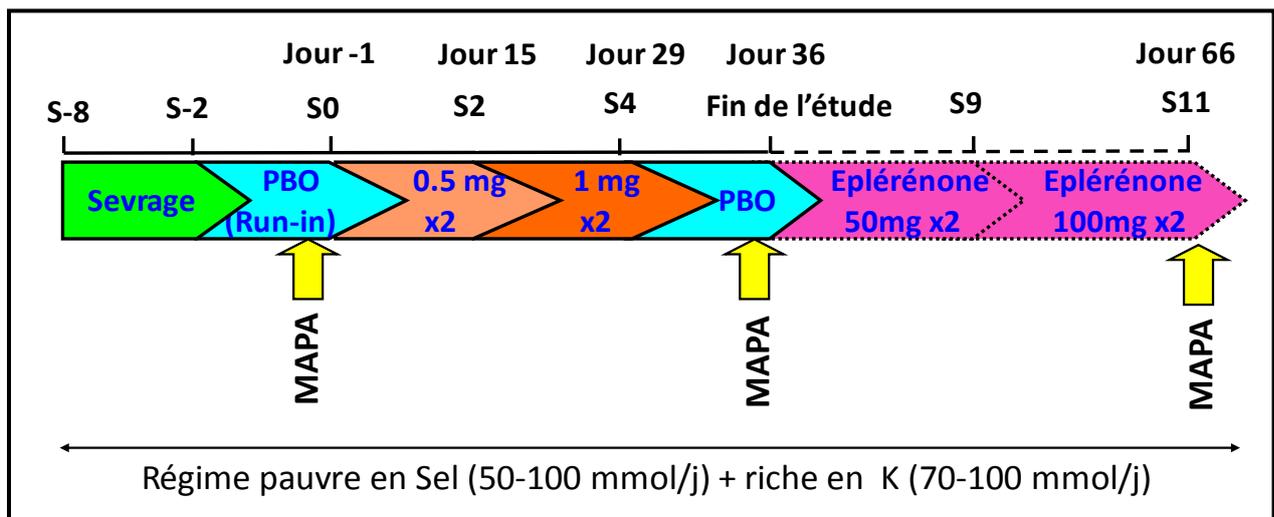
### I. Contexte

Suite aux résultats de ces études de phase I, nous avons pu administrer le LCI699 à des patients hypertendus présentant un HAP. Cette étude de phase IIa était la première administration d'un inhibiteur de l'aldostérone synthase à des patients. La phase II des études cliniques pour le développement d'un nouveau médicament a pour but de déterminer la dose optimale du médicament et ses éventuels effets indésirables. La phase IIa vise à estimer l'efficacité de la molécule sur un nombre limité de patients.

Cette étude de preuve de concept a été réalisée chez des patients présentant un HAP car cela permettait d'étudier les effets de la molécule dans un groupe homogène de patients présentant une hyperproduction d'aldostérone (en raison d'un APA ou d'une hyperplasie bilatérale des surrénales), et pour lesquels ces taux élevés d'aldostérone sont la cause ou tout du moins une des causes de leur HTA.

Le plan expérimental utilisé est un essai séquentiel en simple aveugle d'une durée de 10 semaines selon le schéma ci-dessous (cf. Figure 18). Le LCI699 a été administré à la dose de 0,5mg x2 pendant 15 jours, puis augmenté à 1mg x2 pendant 15 jours.

Cette étude a été réalisée dans le Centre d'Investigation Clinique 9201 de l'Hôpital Européen Georges Pompidou.



**Figure 18: Plan expérimental de l'étude**

MAPA : Mesure Ambulatoire de la PA, PBO : Placebo, S : Semaine

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de mon travail de thèse était d'étudier de nouvelles voies pouvant conduire à améliorer la prise en charge thérapeutique et diagnostique de l'HAP.

Dans une première partie, nous avons donc testé une nouvelle classe thérapeutique : un inhibiteur de l'aldostérone synthase. Nous avons pu montrer que la diminution des taux plasmatiques d'aldostérone chez des patients atteints d'HAP permet de normaliser la kaliémie, mais ne contrôle que partiellement leur HTA. De plus, le blocage de l'aldostérone synthase est moins efficace que le blocage du récepteur minéralocorticoïde.

Par la suite, nous allons tout d'abord faire un profil hormonal complet des stéroïdes urinaires chez ces patients par spectrométrie de masse. Pour cela nous allons collaborer avec le Pr Wiebke Arlt qui a mis au point cette technique (Arlt, 2011). Grâce à cette technique nous espérons pouvoir en savoir davantage sur le site exact du blocage enzymatique et avancer sur la pathogénie de l'HAP.

Nous allons également étudier les résultats de l'étude réalisée chez des patients atteints de maladie de Cushing en regardant notamment l'effet de 10 mg de LCI 699 sur les taux plasmatiques d'aldostérone.

Et bien entendu, il serait intéressant de pouvoir tester les nouveaux inhibiteurs de l'aldostérone synthase en cours de développement chez des patients atteints d'HAP.

La seconde partie de mon projet portait sur la recherche de biomarqueurs diagnostiques. Pour se faire, nous avons choisi une approche par analyse des miRs dans des APA.

Cette approche nous a permis d'identifier deux miRs potentiellement impliqués dans la pathogénie de l'HAP. Les études fonctionnelles préliminaires semblent montrer un effet sur la production d'aldostérone, nous devons encore étudier les effets sur la prolifération cellulaire, ce d'autant plus que ces deux miRs sont impliqués dans d'autres types de tumeurs. De plus ce travail a permis de restreindre la liste de gènes cibles potentiels qui avait été identifiés par l'étude transcriptomique. Et nous allons continuer à étudier les gènes régulés par ces miRs en étudiant l'effet de la transfection de ces miRs et des antagomiRs correspondants dans des cellules H295R.

Par ailleurs, l'analyse préliminaire que nous avons effectuée sur des miRs circulants montre un niveau d'expression du miR 375 différent entre les patients présentant un HAP, une HTA essentielle et les volontaires sains. Bien que cette étude préliminaire n'ait porté que sur peu de

patients, elle nous a permis de mettre au point la technique d'extraction des miRs circulants. Par la suite cette étude va être poursuivie pour voir si l'un des miRs pourrait devenir un marqueur diagnostique d'HAP.

Dans ce but et afin de valider ultérieurement d'autres biomarqueurs potentiels, nous avons commencé à conserver du plasma et des urines pour les patients présentant un HAP tumoral ou non vus dans le service d'HTA au sein de l'HEGP. Nous avons obtenu l'accord du Comité de Protection des Personnes le 29 juin 2012.

Au vu de l'hétérogénéité de la maladie et de la continuité entre le normal et le pathologique, nous pensons que seule une approche globale nous permettra d'identifier de nouveaux biomarqueurs. Nous allons donc travailler sur l'intégralité du génome (en recherchant des grands réarrangements par des techniques de SNP array, en réalisant un exome...), et sur la régulation au niveau protéique (analyse de l'ubiquitination, immunoprécipitation du complexe Argonaute...). L'ensemble de ces travaux, en réduisant la liste de gènes impliqués dans la pathogénie de l'HAP, permettra probablement un jour d'identifier « le » marqueur biologique de l'Hyperaldostérionisme primaire.

**BIBLIOGRAPHIE**

Akerstrom, T., J. Crona, A. Delgado Verdugo, L. F. Starker, K. Cupisti, H. S. Willenberg, W. T. Knoefel, W. Saeger, A. Feller, J. Ip, P. Soon, M. Anlauf, P. F. Alesina, K. W. Schmid, M. Decaussin, P. Levillain, B. Wangberg, J. L. Peix, B. Robinson, J. Zedenius, M. Backdahl, S. Caramuta, K. A. Iwen, J. Botling, P. Stalberg, J. L. Kraimps, H. Dralle, P. Hellman, S. Sidhu, G. Westin, H. Lehnert, M. K. Walz, G. Akerstrom, T. Carling, M. Choi, R. P. Lifton and P. Bjorklund (2012). "Comprehensive Re-Sequencing of Adrenal Aldosterone Producing Lesions Reveal Three Somatic Mutations near the KCNJ5 Potassium Channel Selectivity Filter." *PLoS One* 7(7): e41926.

Allen, R. G., C. Carey, J. D. Parker, M. T. Mortrud, S. H. Mellon and M. J. Low (1995). "Targeted ablation of pituitary pre-proopiomelanocortin cells by herpes simplex virus-1 thymidine kinase differentially regulates mRNAs encoding the adrenocorticotropin receptor and aldosterone synthase in the mouse adrenal gland." *Mol Endocrinol* 9(8): 1005-1016.

Amar, L., E. Kuipers, A. Raynaud, P. F. Plouin and O. Steichen "Suppressible aldosteronism on saline infusion test does not exclude lateralized primary aldosteronism. Presented at the Congress of the European Society of Hypertension 2012, London, GB." 3B.05

Amar, L., P. F. Plouin and O. Steichen (2010). "Aldosterone-producing adenoma and other surgically correctable forms of primary aldosteronism." *Orphanet J Rare Dis* 5: 9.

Arlt, W., M. Biehl, A. E. Taylor, S. Hahner, R. Libe, B. A. Hughes, P. Schneider, D. J. Smith, H. Stiekema, N. Krone, E. Porfiri, G. Opocher, J. Bertherat, F. Mantero, B. Allolio, M. Terzolo, P. Nightingale, C. H. Shackleton, X. Bertagna, M. Fassnacht and P. M. Stewart (2011). "Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 96(12): 3775-3784.

Auchus, R. J., C. Michaelis, F. H. Wians, Jr., B. L. Dolmatch, S. C. Josephs, C. K. Trimmer, M. E. Anderson and F. E. Nwariaku (2009). "Rapid cortisol assays improve the success rate of adrenal vein sampling for primary aldosteronism." *Ann Surg* 249(2): 318-321.

Azizan, E. A., B. Y. Lam, S. J. Newhouse, J. Zhou, R. E. Kuc, J. Clarke, L. Happerfield, A. Marker, G. J. Hoffman and M. J. Brown (2012). "Microarray, qPCR, and KCNJ5 sequencing of aldosterone-producing adenomas reveal differences in genotype and phenotype between zona glomerulosa- and zona fasciculata-like tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 97(5): E819-829.

Azizan, E. A., M. Murthy, M. Stowasser, R. Gordon, B. Kowalski, S. Xu, M. J. Brown and K. M. O'Shaughnessy (2012). "Somatic mutations affecting the selectivity filter of KCNJ5 are frequent in 2 large unselected collections of adrenal aldosteronomas." *Hypertension* 59(3): 587-591.

Bandulik, S., D. Penton, J. Barhanin and R. Warth (2010). "TASK1 and TASK3 potassium channels: determinants of aldosterone secretion and adrenocortical zonation." *Horm Metab Res* 42(6): 450-457.

Bassett, M. H., B. Mayhew, K. Rehman, P. C. White, F. Mantero, G. Arnaldi, P. M. Stewart, I. Bujalska and W. E. Rainey (2005). "Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease." *J Clin Endocrinol Metab* 90(9): 5446-5455.

Bassett, M. H., P. C. White and W. E. Rainey (2004). "The regulation of aldosterone synthase expression." *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2): 67-74.

Berthon, A., I. Sahut-Barnola, S. Lambert-Langlais, C. de Jossineau, C. Damon-Soubeyrand, E. Louiset, M. M. Taketo, F. Tissier, J. Bertherat, A. M. Lefrancois-Martinez, A. Martinez and P. Val (2010). "Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development." *Hum Mol Genet* 19(8): 1561-1576.

Bhalla, V. and K. R. Hallows (2008). "Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications." *J Am Soc Nephrol* 19(10): 1845-1854.

Bird, I. M., J. I. Mason and W. E. Rainey (1994). "Regulation of type 1 angiotensin II receptor messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical carcinoma H295 cells." *Endocrinology* 134(6): 2468-2474.

Boland, G. W., M. J. Lee, G. S. Gazelle, E. F. Halpern, M. M. McNicholas and P. R. Mueller (1998). "Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature." *AJR Am J Roentgenol* 171(1): 201-204.

Boulkroun, S., F. Beuschlein, G. P. Rossi, J. F. Golib-Dzib, E. Fischer, L. Amar, P. Mulatero, B. Samson-Couterie, S. Hahner, M. Quinkler, F. Fallo, C. Letizia, B. Allolio, G. Ceolotto, M. V. Cicala, K. Lang, H. Lefebvre, L. Lenzini, C. Maniero, S. Monticone, M. Perrocheau, C. Pilon, P. F. Plouin, N. Rayes, T. M. Seccia, F. Veglio, T. A. Williams, L. Zinamosca, F.

Mantero, A. Benecke, X. Jeunemaitre, M. Reincke and M. C. Zennaro (2012). "Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism." *Hypertension* 59(3): 592-598.

Boukroun, S., M. Fay, M. C. Zennaro, B. Escoubet, F. Jaisser, M. Blot-Chabaud, N. Farman and N. Courtois-Coutry (2002). "Characterization of rat NDRG2 (N-Myc downstream regulated gene 2), a novel early mineralocorticoid-specific induced gene." *J Biol Chem* 277(35): 31506-31515.

Boukroun, S., B. Samson-Couterie, J. F. Dzib, H. Lefebvre, E. Louiset, L. Amar, P. F. Plouin, E. Lalli, X. Jeunemaitre, A. Benecke, T. Meatchi and M. C. Zennaro (2010). "Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism." *Hypertension* 56(5): 885-892.

Boukroun, S., B. Samson-Couterie, J. F. Golib-Dzib, L. Amar, P. F. Plouin, M. Sibony, H. Lefebvre, E. Louiset, X. Jeunemaitre, T. Meatchi, A. Benecke, E. Lalli and M. C. Zennaro (2011). "Aldosterone-producing adenoma formation in the adrenal cortex involves expression of stem/progenitor cell markers." *Endocrinology* 152(12): 4753-4763.

Boukroun, S., S. Tareen, H. Perdry, J. F. Golib-Dzib, O. Karam, B. Samson-Couterie, C. Simian, S. Bendahhou, A. Benecke, J. Barhanin, X. Jeunemaitre and M. C. Zennaro "Study of the Role of KCNK3 and KCNK9 in the pathogenesis of primary aldosteronism. Paper presented at: ENDO 2011: The 93rd Annual Meeting, June 4–7, 2011; Boston, MA."

Briet, M. and E. L. Schiffrin (2011). "The role of aldosterone in the metabolic syndrome." *Curr Hypertens Rep* 13(2): 163-172.

Brilla, C. G. and K. T. Weber (1992). "Mineralocorticoid excess, dietary sodium, and myocardial fibrosis." *J Lab Clin Med* 120(6): 893-901.

Brunt, L. M. (2006). "Minimal access adrenal surgery." *Surg Endosc* 20(3): 351-361.

Calhoun, D. A., M. K. Nishizaka, M. A. Zaman, R. B. Thakkar and P. Weissmann (2002). "Hyperaldosteronism among black and white subjects with resistant hypertension." *Hypertension* 40(6): 892-896.

- Calhoun, D. A. and W. B. White (2008). "Effectiveness of the selective aldosterone blocker, eplerenone, in patients with resistant hypertension." *J Am Soc Hypertens* 2(6): 462-468.
- Catena, C., G. Colussi, E. Nadalini, A. Chiuch, S. Baroselli, R. Lapenna and L. A. Sechi (2008). "Cardiovascular outcomes in patients with primary aldosteronism after treatment." *Arch Intern Med* 168(1): 80-85.
- Chai, W., I. M. Garrelds, R. de Vries, W. W. Batenburg, J. P. van Kats and A. H. Danser (2005). "Nongenomic effects of aldosterone in the human heart: interaction with angiotensin II." *Hypertension* 46(4): 701-706.
- Chapman, N., J. Dobson, S. Wilson, B. Dahlof, P. S. Sever, H. Wedel and N. R. Poulter (2007). "Effect of spironolactone on blood pressure in subjects with resistant hypertension." *Hypertension* 49(4): 839-845.
- Charmandari, E., A. Sertedaki, T. Kino, C. Merakou, D. A. Hoffman, M. M. Hatch, D. E. Hurt, L. Lin, P. Xekouki, C. A. Stratakis and G. P. Chrousos (2012). "A Novel Point Mutation in the KCNJ5 Gene Causing Primary Hyperaldosteronism and Early-Onset Autosomal Dominant Hypertension." *J Clin Endocrinol Metab* 97(8): E1532-1539.
- Chavez-Rodriguez, J. and J. L. Pasiaka (2005). "Adrenal lesions assessed in the era of laparoscopic adrenalectomy: a modern day series." *Am J Surg* 189(5): 581-585; discussion 585-586.
- Chen, X., W. Li, H. Yoshida, S. Tsuchida, H. Nishimura, F. Takemoto, S. Okubo, A. Fogo, T. Matsusaka and I. Ichikawa (1997). "Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse." *Am J Physiol* 272(3 Pt 2): F299-304.
- Choi, M., U. I. Scholl, P. Yue, P. Bjorklund, B. Zhao, C. Nelson-Williams, W. Ji, Y. Cho, A. Patel, C. J. Men, E. Lolis, M. V. Wisgerhof, D. S. Geller, S. Mane, P. Hellman, G. Westin, G. Akerstrom, W. Wang, T. Carling and R. P. Lifton (2011). "K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension." *Science* 331(6018): 768-772.
- Conn, J. W. (1955). "Presidential address. I. Painting background. II. Primary aldosteronism, a new clinical syndrome." *J Lab Clin Med* 45(1): 3-17.

- Conn, J. W., E. L. Cohen and D. R. Rovner (1964). "Suppression of Plasma Renin Activity in Primary Aldosteronism." *Jama* 190: 213-221.
- Connell, J. M., S. M. MacKenzie, E. M. Freel, R. Fraser and E. Davies (2008). "A lifetime of aldosterone excess: long-term consequences of altered regulation of aldosterone production for cardiovascular function." *Endocr Rev* 29(2): 133-154.
- Davies, L. A., C. Hu, N. A. Guagliardo, N. Sen, X. Chen, E. M. Talley, R. M. Carey, D. A. Bayliss and P. Q. Barrett (2008). "TASK channel deletion in mice causes primary hyperaldosteronism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(6): 2203-2208.
- Denner, K., W. E. Rainey, V. Pezzi, I. M. Bird, R. Bernhardt and J. M. Mathis (1996). "Differential regulation of 11 beta-hydroxylase and aldosterone synthase in human adrenocortical H295R cells." *Mol Cell Endocrinol* 121(1): 87-91.
- Douma, S., K. Petidis, M. Doulas, P. Papaefthimiou, A. Triantafyllou, N. Kartali, N. Papadopoulos, K. Vogiatzis and C. Zamboulis (2008). "Prevalence of primary hyperaldosteronism in resistant hypertension: a retrospective observational study." *Lancet* 371(9628): 1921-1926.
- Duprez, D. A. (2007). "Aldosterone and the vasculature: mechanisms mediating resistant hypertension." *J Clin Hypertens (Greenwich)* 9(1 Suppl 1): 13-18.
- Epstein, M. (2001). "Aldosterone as a determinant of cardiovascular and renal dysfunction." *J R Soc Med* 94(8): 378-383.
- Espiner, E. A., D. G. Ross, T. G. Yandle, A. M. Richards and P. J. Hunt (2003). "Predicting surgically remedial primary aldosteronism: role of adrenal scanning, posture testing, and adrenal vein sampling." *J Clin Endocrinol Metab* 88(8): 3637-3644.
- Ferraz-de-Souza, B., R. E. Hudson-Davies, L. Lin, R. Parnaik, M. Hubank, M. T. Dattani and J. C. Achermann (2011). "Sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1, ACAT) is a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) in the human adrenal." *J Clin Endocrinol Metab* 96(4): E663-668.
- Fiebeler, A., J. Nussberger, E. Shagdarsuren, S. Rong, G. Hilfenhaus, N. Al-Saadi, R. Dechend, M. Wellner, S. Meiners, C. Maser-Gluth, A. Y. Jeng, R. L. Webb, F. C. Luft and D.

- N. Muller (2005). "Aldosterone synthase inhibitor ameliorates angiotensin II-induced organ damage." *Circulation* 111(23): 3087-3094.
- Fogari, R., P. Preti, A. Zoppi, A. Rinaldi, E. Fogari and A. Mugellini (2007). "Prevalence of primary aldosteronism among unselected hypertensive patients: a prospective study based on the use of an aldosterone/renin ratio above 25 as a screening test." *Hypertens Res* 30(2): 111-117.
- Fuller, P. J. and M. J. Young (2005). "Mechanisms of mineralocorticoid action." *Hypertension* 46(6): 1227-1235.
- Funder, J. W. (2005). "The nongenomic actions of aldosterone." *Endocr Rev* 26(3): 313-321.
- Funder, J. W., R. M. Carey, C. Fardella, C. E. Gomez-Sanchez, F. Mantero, M. Stowasser, W. F. Young, Jr. and V. M. Montori (2008). "Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline." *J Clin Endocrinol Metab* 93(9): 3266-3281.
- Gagner, M., A. Lacroix and E. Bolte (1992). "Laparoscopic adrenalectomy in Cushing's syndrome and pheochromocytoma." *N Engl J Med* 327(14): 1033.
- Gordon, R. D. (2004). "The challenge of more robust and reproducible methodology in screening for primary aldosteronism." *J Hypertens* 22(2): 251-255.
- Gordon, R. D., C. E. Gomez-Sanchez, S. M. Hamlet, T. J. Tunny and S. A. Klemm (1987). "Angiotensin-responsive aldosterone-producing adenoma masquerades as idiopathic hyperaldosteronism (IHA: adrenal hyperplasia) or low-renin essential hypertension." *J Hypertens Suppl* 5(5): S103-106.
- Gros, R., Q. Ding, L. A. Sklar, E. E. Prossnitz, J. B. Arterburn, J. Chorazyczewski and R. D. Feldman (2011). "GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone." *Hypertension* 57(3): 442-451.
- Guagliardo, N. A., J. Yao, C. Hu and P. Q. Barrett (2012). "Minireview: aldosterone biosynthesis: electrically gated for our protection." *Endocrinology* 153(8): 3579-3586.

Guagliardo, N. A., J. Yao, C. Hu, E. M. Schertz, D. A. Tyson, R. M. Carey, D. A. Bayliss and P. Q. Barrett (2012). "TASK-3 channel deletion in mice recapitulates low-renin essential hypertension." *Hypertension* 59(5): 999-1005.

Hannemann, A., M. Bidlingmaier, N. Friedrich, J. Manolopoulou, A. Spyroglou, H. Volzke, F. Beuschlein, J. Seissler, R. Rettig, S. B. Felix, R. Biffar, A. Doring, C. Meisinger, A. Peters, H. E. Wichmann, M. Nauck, H. Wallaschofski and M. Reincke (2012). "Screening for primary aldosteronism in hypertensive subjects: results from two German epidemiological studies." *Eur J Endocrinol* 167(1): 7-15.

Harvey, A., G. Kline and J. L. Pasiaka (2006). "Adrenal venous sampling in primary hyperaldosteronism: comparison of radiographic with biochemical success and the clinical decision-making with "less than ideal" testing." *Surgery* 140(6): 847-853; discussion 853-845.

Hattangady, N. G., L. O. Olala, W. B. Bollag and W. E. Rainey (2012). "Acute and chronic regulation of aldosterone production." *Mol Cell Endocrinol* 350(2): 151-162.

Heitzmann, D., R. Derand, S. Jungbauer, S. Bandulik, C. Sterner, F. Schweda, A. El Wakil, E. Lalli, N. Guy, R. Mengual, M. Reichold, I. Tegtmeier, S. Bendahhou, C. E. Gomez-Sanchez, M. I. Aller, W. Wisden, A. Weber, F. Lesage, R. Warth and J. Barhanin (2008). "Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis." *EMBO J* 27(1): 179-187.

Hench, P. S., E. C. Kendall and et al. (1949). "The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone; compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis." *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24(8): 181-197.

Hiramatsu, K., T. Yamada, Y. Yukimura, I. Komiya, K. Ichikawa, M. Ishihara, H. Nagata and T. Izumiyama (1981). "A screening test to identify aldosterone-producing adenoma by measuring plasma renin activity. Results in hypertensive patients." *Arch Intern Med* 141(12): 1589-1593.

Hobler, A., N. Kagawa, M. C. Hutter, M. F. Hartmann, S. A. Wudy, F. Hannemann and R. Bernhardt (2012). "Human aldosterone synthase: Recombinant expression in *E. coli* and purification enables a detailed biochemical analysis of the protein on the molecular level." *J Steroid Biochem Mol Biol* 132(1-2): 57-65.

Hood, S. J., K. P. Taylor, M. J. Ashby and M. J. Brown (2007). "The spironolactone, amiloride, losartan, and thiazide (SALT) double-blind crossover trial in patients with low-renin hypertension and elevated aldosterone-renin ratio." *Circulation* 116(3): 268-275.

Irony, I., C. E. Kater, E. G. Biglieri and C. H. Shackleton (1990). "Correctable subsets of primary aldosteronism. Primary adrenal hyperplasia and renin responsive adenoma." *Am J Hypertens* 3(7): 576-582.

Ishidoya, S., Y. Kaiho, A. Ito, R. Morimoto, F. Satoh, S. Ito, T. Ishibashi, Y. Nakamura, H. Sasano and Y. Arai "Single-center outcome of laparoscopic unilateral adrenalectomy for patients with primary aldosteronism: lateralizing disease using results of adrenal venous sampling." *Urology* 78(1): 68-73.

Jansen, P. M., A. H. Danser, B. P. Imholz and A. H. van den Meiracker (2009). "Aldosterone-receptor antagonism in hypertension." *J Hypertens* 27(4): 680-691.

Jansen, P. M., A. H. van den Meiracker and A. H. Jan Danser (2009). "Aldosterone synthase inhibitors: pharmacological and clinical aspects." *Curr Opin Investig Drugs* 10(4): 319-326.

Jeunemaitre, X., G. Chatellier, C. Kreft-Jais, A. Charru, C. DeVries, P. F. Plouin, P. Corvol and J. Menard (1987). "Efficacy and tolerance of spironolactone in essential hypertension." *Am J Cardiol* 60(10): 820-825.

Keegan, C. E. and G. D. Hammer (2002). "Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex." *Trends Endocrinol Metab* 13(5): 200-208.

Kempná, P. and C. E. Flück (2008). "Adrenal gland development and defects." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 22(1): 77-93.

King, J. A., D. J. Lush and J. C. Fray (1993). "Regulation of renin processing and secretion: chemiosmotic control and novel secretory pathway." *Am J Physiol* 265(2 Pt 1): C305-320.

Lafferty, A. R., D. J. Torpy, M. Stowasser, S. E. Taymans, J. P. Lin, P. Huggard, R. D. Gordon and C. A. Stratakis (2000). "A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22)." *J Med Genet* 37(11): 831-835.

Lamberts, S. W., H. A. Bruining, H. Marzouk, J. Zuiderwijk, P. Uitterlinden, J. J. Blijd, W. H. Hackeng and F. H. De Jong (1989). "The new aromatase inhibitor CGS-16949A suppresses aldosterone and cortisol production by human adrenal cells in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 69(4): 896-901.

LaSala, D., Y. Shibanaka and A. Y. Jeng (2009). "Coexpression of CYP11B2 or CYP11B1 with adrenodoxin and adrenodoxin reductase for assessing the potency and selectivity of aldosterone synthase inhibitors." *Anal Biochem* 394(1): 56-61.

Lefebvre, H., P. Compagnon, V. Contesse, C. Delarue, C. Thuillez, H. Vaudry and J. M. Kuhn (2001). "Production and metabolism of serotonin (5-HT) by the human adrenal cortex: paracrine stimulation of aldosterone secretion by 5-HT." *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 5001-5007.

Lefebvre, H., V. Contesse, C. Delarue, C. Soubrane, A. Legrand, J. M. Kuhn, L. M. Wolf and H. Vaudry (1993). "Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from the human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies." *J Clin Endocrinol Metab* 77(6): 1662-1666.

Letavernier, E., S. Peyrard, L. Amar, F. Zinzindohoue, B. Fiquet and P. F. Plouin (2008). "Blood pressure outcome of adrenalectomy in patients with primary hyperaldosteronism with or without unilateral adenoma." *J Hypertens* 26(9): 1816-1823.

Lieberman, S. and Y. Y. Lin (2001). "Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc)." *J Steroid Biochem Mol Biol* 78(1): 1-14.

Lifton, R. P., R. G. Dluhy, M. Powers, G. M. Rich, S. Cook, S. Ulick and J. M. Lalouel (1992). "A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension." *Nature* 355(6357): 262-265.

Lim, P. O., W. F. Young and T. M. MacDonald (2001). "A review of the medical treatment of primary aldosteronism." *J Hypertens* 19(3): 353-361.

Lin, Y. H., K. H. Huang, J. K. Lee, S. M. Wang, R. F. Yen, V. C. Wu, S. D. Chung, K. L. Liu, S. C. Chueh, L. Y. Lin, Y. L. Ho, M. F. Chen and K. D. Wu (2011). "Factors influencing left ventricular mass regression in patients with primary aldosteronism post adrenalectomy." *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12(1): 48-53.

- Loh, K. C., E. S. Koay, M. C. Khaw, S. C. Emmanuel and W. F. Young, Jr. (2000). "Prevalence of primary aldosteronism among Asian hypertensive patients in Singapore." *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2854-2859.
- Luo, X., Y. Ikeda and K. L. Parker (1994). "A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation." *Cell* 77(4): 481-490.
- Makhanova, N., G. Lee, N. Takahashi, M. L. Sequeira Lopez, R. A. Gomez, H. S. Kim and O. Smithies (2006). "Kidney function in mice lacking aldosterone." *Am J Physiol Renal Physiol* 290(1): F61-69.
- Manna, P. R., I. T. Huhtaniemi and D. M. Stocco (2009). "Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells." *Endocrinology* 150(7): 3308-3317.
- Manna, P. R., X. J. Wang and D. M. Stocco (2003). "Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression." *Steroids* 68(14): 1125-1134.
- Mantero, F., M. Terzolo, G. Arnaldi, G. Osella, A. M. Masini, A. Ali, M. Giovagnetti, G. Opocher and A. Angeli (2000). "A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology." *J Clin Endocrinol Metab* 85(2): 637-644.
- Matrozoza, J., O. Steichen, L. Amar, S. Zacharieva, X. Jeunemaitre and P. F. Plouin (2009). "Fasting plasma glucose and serum lipids in patients with primary aldosteronism: a controlled cross-sectional study." *Hypertension* 53(4): 605-610.
- McArdavey, D., G. D. Murray, A. F. Lever and J. I. Robertson (1983). "Similarity of idiopathic aldosteronism and essential hypertension. A statistical comparison." *Hypertension* 5(1): 116-121.
- McCurlley, A. and I. Z. Jaffe (2012). "Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease." *Mol Cell Endocrinol* 350(2): 256-265.

- McKenna, T. J., S. J. Sequeira, A. Heffernan, J. Chambers and S. Cunningham (1991). "Diagnosis under random conditions of all disorders of the renin-angiotensin-aldosterone axis, including primary hyperaldosteronism." *J Clin Endocrinol Metab* 73(5): 952-957.
- Medeau, V., F. Moreau, L. Trinquart, M. Clemessy, J. L. Wemeau, M. C. Vantyghem, P. F. Plouin and Y. Reznik (2008). "Clinical and biochemical characteristics of normotensive patients with primary aldosteronism: a comparison with hypertensive cases." *Clin Endocrinol (Oxf)* 69(1): 20-28.
- Menard, J. (2004). "The 45-year story of the development of an anti-aldosterone more specific than spironolactone." *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2): 45-52.
- Menard, J., M. F. Gonzalez, T. T. Guyene and A. Bissery (2006). "Investigation of aldosterone-synthase inhibition in rats." *J Hypertens* 24(6): 1147-1155.
- Menard, J., C. Watson, S. Rebello, Y. M. Zhang and W. P. Dole (2010). "HORMONAL AND ELECTROLYTE RESPONSES TO THE ALDOSTERONE SYNTHASE INHIBITOR LCI699 IN SODIUM DEPLETED HEALTHY SUBJECTS." *Journal of the American College of Cardiology* 55(10s1): A61.E583-A561.E583.
- Mesiano, S. and R. B. Jaffe (1997). "Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex." *Endocr Rev* 18(3): 378-403.
- Milliez, P., X. Girerd, P. F. Plouin, J. Blacher, M. E. Safar and J. J. Mourad (2005). "Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism." *J Am Coll Cardiol* 45(8): 1243-1248.
- Monticone, S., N. G. Hattangady, K. Nishimoto, F. Mantero, B. Rubin, M. V. Cicala, R. Pezzani, R. J. Auchus, H. K. Ghayee, H. Shibata, I. Kurihara, T. A. Williams, J. G. Giri, R. J. Bollag, M. A. Edwards, C. M. Isles and W. E. Rainey (2012). "Effect of KCNJ5 Mutations on Gene Expression in Aldosterone-Producing Adenomas and Adrenocortical Cells." *J Clin Endocrinol Metab* 97(8): E1567-1572.
- Mulatero, P., C. Bertello, D. Rossato, G. Mengozzi, A. Milan, C. Garrone, G. Giraud, G. Passarino, D. Garaballo, A. Verhovez, F. Rabbia and F. Veglio (2008). "Roles of clinical criteria, computed tomography scan, and adrenal vein sampling in differential diagnosis of primary aldosteronism subtypes." *J Clin Endocrinol Metab* 93(4): 1366-1371.

Mulatero, P., M. Stowasser, K. C. Loh, C. E. Fardella, R. D. Gordon, L. Mosso, C. E. Gomez-Sanchez, F. Veglio and W. F. Young, Jr. (2004). "Increased diagnosis of primary aldosteronism, including surgically correctable forms, in centers from five continents." *J Clin Endocrinol Metab* 89(3): 1045-1050.

Mulatero, P., P. Tauber, M. C. Zennaro, S. Monticone, K. Lang, F. Beuschlein, E. Fischer, D. Tizzani, A. Pallauf, A. Viola, L. Amar, T. A. Williams, T. M. Strom, E. Graf, S. Bandulik, D. Penton, P. F. Plouin, R. Warth, B. Allolio, X. Jeunemaitre, F. Veglio and M. Reincke (2012). "KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism." *Hypertension* 59(2): 235-240.

Mulatero, P., D. Tizzani, A. Viola, C. Bertello, S. Monticone, G. Mengozzi, D. Schiavone, T. A. Williams, S. Einaudi, A. La Grotta, F. Rabbia and F. Veglio (2011). "Prevalence and characteristics of familial hyperaldosteronism: the PATOGEN study (Primary Aldosteronism in TORino-GENetic forms)." *Hypertension* 58(5): 797-803.

Mulder, P., V. Mellin, J. Favre, M. Vercauteren, I. Remy-Jouet, C. Monteil, V. Richard, S. Renet, J. P. Henry, A. Y. Jeng, R. L. Webb and C. Thuillez (2008). "Aldosterone synthase inhibition improves cardiovascular function and structure in rats with heart failure: a comparison with spironolactone." *Eur Heart J* 29(17): 2171-2179.

Murashima, M., S. O. Trerotola, D. L. Fraker, D. Han, R. R. Townsend and D. L. Cohen (2009). "Change in the pattern of adrenal venous sampling over time in patients with primary aldosteronism." *J Hum Hypertens* 23(4): 292-294.

Narasaka, T., T. Suzuki, T. Moriya and H. Sasano (2001). "Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal." *Mol Cell Endocrinol* 174(1-2): 111-120.

Newton-Cheh, C., C. Y. Guo, P. Gona, M. G. Larson, E. J. Benjamin, T. J. Wang, S. Kathiresan, C. J. O'Donnell, S. L. Musone, A. L. Camargo, J. A. Drake, D. Levy, J. N. Hirschhorn and R. S. Vasan (2007). "Clinical and genetic correlates of aldosterone-to-renin ratio and relations to blood pressure in a community sample." *Hypertension* 49(4): 846-856.

Nguyen Dinh Cat, A. and F. Jaisser (2012). "Extrarenal effects of aldosterone." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21(2): 147-156.

Nguyen, H. H., F. Hannemann, M. F. Hartmann, E. M. Malunowicz, S. A. Wudy and R. Bernhardt (2010). "Five novel mutations in CYP11B2 gene detected in patients with aldosterone synthase deficiency type I: Functional characterization and structural analyses." *Mol Genet Metab* 100(4): 357-364.

Nishikawa, T. and M. Omura (2000). "Clinical characteristics of primary aldosteronism: its prevalence and comparative studies on various causes of primary aldosteronism in Yokohama Rosai Hospital." *Biomed Pharmacother* 54 Suppl 1: 83s-85s.

Nishikawa, T., M. Omura, F. Satoh, H. Shibata, K. Takahashi, N. Tamura and A. Tanabe (2011). "Guidelines for the diagnosis and treatment of primary aldosteronism--the Japan Endocrine Society 2009." *Endocr J* 58(9): 711-721.

Nishimoto, K., K. Nakagawa, D. Li, T. Kosaka, M. Oya, S. Mikami, H. Shibata, H. Itoh, F. Mitani, T. Yamazaki, T. Ogishima, M. Suematsu and K. Mukai (2010). "Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions." *J Clin Endocrinol Metab* 95(5): 2296-2305.

Ogishima, T., H. Shibata, H. Shimada, F. Mitani, H. Suzuki, T. Saruta and Y. Ishimura (1991). "Aldosterone synthase cytochrome P-450 expressed in the adrenals of patients with primary aldosteronism." *J Biol Chem* 266(17): 10731-10734.

Oki, K., M. W. Plonczynski, M. Luis Lam, E. P. Gomez-Sanchez and C. E. Gomez-Sanchez (2012). "Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis." *Endocrinology* 153(4): 1774-1782.

Okubo, S., F. Niimura, H. Nishimura, F. Takemoto, A. Fogo, T. Matsusaka and I. Ichikawa (1997). "Angiotensin-independent mechanism for aldosterone synthesis during chronic extracellular fluid volume depletion." *J Clin Invest* 99(5): 855-860.

Parthasarathy, H. K., J. Menard, W. B. White, W. F. Young, Jr., G. H. Williams, B. Williams, L. M. Ruilope, G. T. McInnes, J. M. Connell and T. M. MacDonald (2011). "A double-blind, randomized study comparing the antihypertensive effect of eplerenone and spironolactone in patients with hypertension and evidence of primary aldosteronism." *J Hypertens* 29(5): 980-990.

Pascoe, L., X. Jeunemaitre, M. C. Lebrethon, K. M. Curnow, C. E. Gomez-Sanchez, J. M. Gasc, J. M. Saez and P. Corvol (1995). "Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism and adrenal tumors occurring in a single French pedigree." *J Clin Invest* 96(5): 2236-2246.

Penton, D., S. Bandulik, F. Schweda, S. Haubs, P. Tauber, M. Reichold, L. D. Cong, A. El Wakil, T. Budde, F. Lesage, E. Lalli, M. C. Zennaro, R. Warth and J. Barhanin (2012). "Task3 potassium channel gene invalidation causes low Renin and salt-sensitive arterial hypertension." *Endocrinology* 153(10): 4740-4748.

Peter, M., J. M. Dubuis and W. G. Sippell (1999). "Disorders of the aldosterone synthase and steroid 11beta-hydroxylase deficiencies." *Horm Res* 51(5): 211-222.

Pitt, B., N. Reichek, R. Willenbrock, F. Zannad, R. A. Phillips, B. Roniker, J. Kleiman, S. Krause, D. Burns and G. H. Williams (2003). "Effects of eplerenone, enalapril, and eplerenone/enalapril in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy: the 4E-left ventricular hypertrophy study." *Circulation* 108(15): 1831-1838.

Pitt, B., W. Remme, F. Zannad, J. Neaton, F. Martinez, B. Roniker, R. Bittman, S. Hurley, J. Kleiman and M. Gatlin (2003). "Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction." *N Engl J Med* 348(14): 1309-1321.

Pitt, B., F. Zannad, W. J. Remme, R. Cody, A. Castaigne, A. Perez, J. Palensky and J. Wittes (1999). "The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators." *N Engl J Med* 341(10): 709-717.

Pringle, S. D., P. W. Macfarlane, C. G. Isles, H. L. Cameron, I. A. Brown, A. R. Lorimer and F. G. Dunn (1988). "Regression of electrocardiographic left ventricular hypertrophy following treatment of primary hyperaldosteronism." *J Hum Hypertens* 2(3): 157-159.

Rayner, B. L., J. E. Myers, L. H. Opie, Y. A. Trinder and J. S. Davidson (2001). "Screening for primary aldosteronism--normal ranges for aldosterone and renin in three South African population groups." *S Afr Med J* 91(7): 594-599.

Rocha, R., A. E. Rudolph, G. E. Frierdich, D. A. Nachowiak, B. K. Kekec, E. A. Blomme, E. G. McMahon and J. A. Delyani (2002). "Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(5): H1802-1810.

Rogerson, F. M., F. E. Brennan and P. J. Fuller (2004). "Mineralocorticoid receptor binding, structure and function." *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2): 203-212.

Rossi, E., G. Regolisti, A. Negro, C. Sani, S. Davoli and F. Perazzoli (2002). "High prevalence of primary aldosteronism using postcaptopril plasma aldosterone to renin ratio as a screening test among Italian hypertensives." *Am J Hypertens* 15(10 Pt 1): 896-902.

Rossi, G. P., M. Barisa, B. Allolio, R. J. Auchus, L. Amar, D. Cohen, C. Degenhart, J. Deinum, E. Fischer, R. Gordon, R. Kickuth, G. Kline, A. Lacroix, S. Magill, D. Miotto, M. Naruse, T. Nishikawa, M. Omura, E. Pimenta, P. F. Plouin, M. Quinkler, M. Reincke, E. Rossi, L. C. Rump, F. Satoh, L. Schultze Kool, T. M. Seccia, M. Stowasser, A. Tanabe, S. Trerotola, O. Vonend, J. Widimsky, Jr., K. D. Wu, V. C. Wu and A. C. Pessina (2012). "The Adrenal Vein Sampling International Study (AVIS) for identifying the major subtypes of primary aldosteronism." *J Clin Endocrinol Metab* 97(5): 1606-1614.

Rossi, G. P., A. Belfiore, G. Bernini, G. Desideri, B. Fabris, C. Ferri, G. Giacchetti, C. Letizia, M. Maccario, F. Mallamaci, M. Mannelli, D. Montemurro, G. Palumbo, D. Rizzoni, E. Rossi, A. Semplicini, E. Agabiti-Rosei, A. C. Pessina and F. Mantero (2007). "Prospective evaluation of the saline infusion test for excluding primary aldosteronism due to aldosterone-producing adenoma." *J Hypertens* 25(7): 1433-1442.

Rossi, G. P., G. Bernini, C. Caliumi, G. Desideri, B. Fabris, C. Ferri, C. Ganzaroli, G. Giacchetti, C. Letizia, M. Maccario, F. Mallamaci, M. Mannelli, M. J. Mattarello, A. Moretti, G. Palumbo, G. Parenti, E. Porteri, A. Semplicini, D. Rizzoni, E. Rossi, M. Boscaro, A. C. Pessina and F. Mantero (2006). "A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients." *J Am Coll Cardiol* 48(11): 2293-2300.

Rossi, G. P., M. Bolognesi, D. Rizzoni, T. M. Seccia, A. Piva, E. Porteri, G. A. Tiberio, S. M. Giulini, E. Agabiti-Rosei and A. C. Pessina (2008). "Vascular remodeling and duration of hypertension predict outcome of adrenalectomy in primary aldosteronism patients." *Hypertension* 51(5): 1366-1371.

Rossi, G. P., V. Di Bello, C. Ganzaroli, A. Sacchetto, M. Cesari, A. Bertini, D. Giorgi, R. Scognamiglio, M. Mariani and A. C. Pessina (2002). "Excess aldosterone is associated with alterations of myocardial texture in primary aldosteronism." *Hypertension* 40(1): 23-27.

Ruggenti, P., A. Perna, G. Gherardi, F. Gaspari, R. Benini and G. Remuzzi (1998). "Renal function and requirement for dialysis in chronic nephropathy patients on long-term ramipril: REIN follow-up trial. Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia (GISEN). Ramipril Efficacy in Nephropathy." *Lancet* 352(9136): 1252-1256.

Scholl, U. I., C. Nelson-Williams, P. Yue, R. Grekin, R. J. Wyatt, M. J. Dillon, R. Couch, L. K. Hammer, F. L. Harley, A. Farhi, W. H. Wang and R. P. Lifton (2012). "Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(7): 2533-2538.

Schwartz, G. L., A. B. Chapman, E. Boerwinkle, R. M. Kisabeth and S. T. Turner (2002). "Screening for primary aldosteronism: implications of an increased plasma aldosterone/renin ratio." *Clin Chem* 48(11): 1919-1923.

Sechi, L. A., M. Novello, R. Lapenna, S. Baroselli, E. Nadalini, G. L. Colussi and C. Catena (2006). "Long-term renal outcomes in patients with primary aldosteronism." *Jama* 295(22): 2638-2645.

Shinzawa, K., S. Ishibashi, M. Murakoshi, K. Watanabe, S. Kominami, A. Kawahara and S. Takemori (1988). "Relationship between zonal distribution of microsomal cytochrome P-450s (P-450(17)alpha,lyase and P-450C21) and steroidogenic activities in guinea-pig adrenal cortex." *J Endocrinol* 119(2): 191-200.

Simpson, S. A. and J. F. Tait (1952). "A quantitative method for the bioassay of the effect of adrenal cortical steroids on mineral metabolism." *Endocrinology* 50(2): 150-161.

Soundararajan, R., T. T. Zhang, J. Wang, A. Vandewalle and D. Pearce (2005). "A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport." *J Biol Chem* 280(48): 39970-39981.

Spat, A. and L. Hunyady (2004). "Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways." *Physiol Rev* 84(2): 489-539.

Staruschenko, A., P. Patel, Q. Tong, J. L. Medina and J. D. Stockand (2004). "Ras activates the epithelial Na(+) channel through phosphoinositide 3-OH kinase signaling." *J Biol Chem* 279(36): 37771-37778.

Steichen, O., L. Amar and P. F. Plouin (2009). "LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY IN PATIENTS WITH PRIMARY HYPERALDOSTERONISM: A CONTROLLED CROSS-SECTIONAL STUDY." *Journal of Hypertension* 27: S341-S341.

Steichen, O., F. Zinzindohoue, P. F. Plouin and L. Amar (2012). "Outcomes of adrenalectomy in patients with unilateral primary aldosteronism: a review." *Horm Metab Res* 44(3): 221-227.

Stewart, P. M. *The Adrenal Cortex. William's Textbook of Endocrinology. 10th Edition.* Larsen. 4: 491-551.

Stockand, J. D. (2002). "New ideas about aldosterone signaling in epithelia." *Am J Physiol Renal Physiol* 282(4): F559-576.

Stowasser, M. and R. D. Gordon (2004). "Primary aldosteronism--careful investigation is essential and rewarding." *Mol Cell Endocrinol* 217(1-2): 33-39.

Stowasser, M., T. G. Gunasekera and R. D. Gordon (2001). "Familial varieties of primary aldosteronism." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(12): 1087-1090.

Strauch, B., T. Zelinka, M. Hampf, R. Bernhardt and J. Widimsky, Jr. (2003). "Prevalence of primary hyperaldosteronism in moderate to severe hypertension in the Central Europe region." *J Hum Hypertens* 17(5): 349-352.

Su, M. Y., V. C. Wu, H. Y. Yu, Y. H. Lin, C. C. Kuo, K. L. Liu, S. M. Wang, S. C. Chueh, L. Y. Lin, K. D. Wu and W. Y. Tseng (2012). "Contrast-enhanced MRI index of diffuse myocardial fibrosis is increased in primary aldosteronism." *J Magn Reson Imaging* 35(6): 1349-1355.

Sukor, N., R. D. Gordon, Y. K. Ku, M. Jones and M. Stowasser (2009). "Role of unilateral adrenalectomy in bilateral primary aldosteronism: a 22-year single center experience." *J Clin Endocrinol Metab* 94(7): 2437-2445.

Sutherland, D. J., J. L. Ruse and J. C. Laidlaw (1966). "Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone." *Can Med Assoc J* 95(22): 1109-1119.

Tabarin, A., S. Bardet, J. Bertherat, B. Dupas, O. Chabre, E. Hamoir, F. Laurent, F. Tenenbaum, M. Cazalda, H. Lefebvre, N. Valli and V. Rohmer (2008). "Exploration and management of adrenal incidentalomas. French Society of Endocrinology Consensus." *Ann Endocrinol (Paris)* 69(6): 487-500.

Taguchi, R., M. Yamada, Y. Nakajima, T. Satoh, K. Hashimoto, N. Shibusawa, A. Ozawa, S. Okada, N. Rokutanda, D. Takata, Y. Koibuchi, J. Horiguchi, T. Oyama, I. Takeyoshi and M. Mori (2012). "Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas." *J Clin Endocrinol Metab* 97(4): 1311-1319.

Tessier, D. J., R. Iglesias, W. C. Chapman, K. Kercher, B. D. Matthews, D. L. Gorden and L. M. Brunt (2009). "Previously unreported high-grade complications of adrenalectomy." *Surg Endosc* 23(1): 97-102.

Thomas, W. and B. J. Harvey (2011). "Mechanisms underlying rapid aldosterone effects in the kidney." *Annu Rev Physiol* 73: 335-357.

Tissier, F. and C. Hoang (2007). *Anatomie, embryologie et histologie de la surrénale*. EMC - Endocrinologie-Nutrition: 1-6 [Article 10-014-A-010].

Tiu, S. C., C. H. Choi, C. C. Shek, Y. W. Ng, F. K. Chan, C. M. Ng and A. P. Kong (2005). "The use of aldosterone-renin ratio as a diagnostic test for primary hyperaldosteronism and its test characteristics under different conditions of blood sampling." *J Clin Endocrinol Metab* 90(1): 72-78.

Trunet, P. F., P. Mueller, F. Girard, B. Aupetit, A. S. Bhatnagar, F. Zognbi, F. Ezzet and J. Menard (1992). "The effects of fadrozole hydrochloride on aldosterone secretion in healthy male subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 74(3): 571-576.

Ulick, S. and M. D. Chu (1982). "Hypersecretion of a new corticosteroid, 18-hydroxycortisol in two types of adrenocortical hypertension." *Clin Exp Hypertens A* 4(9-10): 1771-1777.

Vaclavik, J., R. Sedlak, M. Plachy, K. Navratil, J. Plasek, J. Jarkovsky, T. Vaclavik, R. Husar, E. Kocianova and M. Taborsky (2011). "Addition of spironolactone in patients with resistant arterial hypertension (ASPIRANT): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Hypertension* 57(6): 1069-1075.

- Walz, M. K., P. F. Alesina, F. A. Wenger, A. Deligiannis, E. Szuczik, S. Petersenn, A. Ommer, H. Groeben, K. Peitgen, O. E. Janssen, T. Philipp, H. P. Neumann, K. W. Schmid and K. Mann (2006). "Posterior retroperitoneoscopic adrenalectomy--results of 560 procedures in 520 patients." *Surgery* 140(6): 943-948; discussion 948-950.
- Walz, M. K., R. Gwosdz, S. L. Levin, P. F. Alesina, A. C. Suttorp, K. A. Metz, F. A. Wenger, S. Petersenn, K. Mann and K. W. Schmid (2008). "Retroperitoneoscopic adrenalectomy in Conn's syndrome caused by adrenal adenomas or nodular hyperplasia." *World J Surg* 32(5): 847-853.
- Weinberger, M. H., B. Roniker, S. L. Krause and R. J. Weiss (2002). "Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in mild-to-moderate hypertension." *Am J Hypertens* 15(8): 709-716.
- Williams, J. S., G. H. Williams, A. Raji, X. Jeunemaitre, N. J. Brown, P. N. Hopkins and P. R. Conlin (2006). "Prevalence of primary hyperaldosteronism in mild to moderate hypertension without hypokalaemia." *J Hum Hypertens* 20(2): 129-136.
- Williams, T. A., S. Monticone, V. Crudo, R. Warth, F. Veglio and P. Mulatero (2012). "Visinin-like 1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations and protects from calcium-induced apoptosis." *Hypertension* 59(4): 833-839.
- Williams, T. A., S. Monticone, F. Morello, C. C. Liew, G. Mengozzi, C. Pilon, S. Asioli, A. Sapino, F. Veglio and P. Mulatero (2010). "Teratocarcinoma-derived growth factor-1 is upregulated in aldosterone-producing adenomas and increases aldosterone secretion and inhibits apoptosis in vitro." *Hypertension* 55(6): 1468-1475.
- Yagci, A., M. Oertle, H. Seiler, D. Schmid, C. Campofranco and J. Muller (1996). "Potassium induces multiple steroidogenic enzymes in cultured rat zona glomerulosa cells." *Endocrinology* 137(6): 2406-2414.
- Young, W. F. (2007). "Primary aldosteronism: renaissance of a syndrome." *Clin Endocrinol (Oxf)* 66(5): 607-618.
- Young, W. F., A. W. Stanson, G. B. Thompson, C. S. Grant, D. R. Farley and J. A. van Heerden (2004). "Role for adrenal venous sampling in primary aldosteronism." *Surgery* 136(6): 1227-1235.

Zannad, F., J. J. McMurray, H. Krum, D. J. van Veldhuisen, K. Swedberg, H. Shi, J. Vincent, S. J. Pocock and B. Pitt (2011). "Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms." *N Engl J Med* 364(1): 11-21.

Zarnegar, R., A. I. Bloom, J. Lee, R. K. Kerlan, Jr., M. W. Wilson, J. M. Laberge, R. L. Gordon, E. Kebebew, O. H. Clark and Q. Y. Duh (2008). "Is adrenal venous sampling necessary in all patients with hyperaldosteronism before adrenalectomy?" *J Vasc Interv Radiol* 19(1): 66-71.

Zarnegar, R., J. Lee, L. Brunaud, S. Lindsay, E. Kebebew, O. H. Clark and Q. Y. Duh (2007). "Good blood pressure control on antihypertensives, not only response to spironolactone, predicts improved outcome after adrenalectomy for aldosteronoma." *Surgery* 142(6): 921-929; discussion 921-929.

Zennaro, M. C., E. L. Hubert and F. L. Fernandes-Rosa (2012). "Aldosterone resistance: structural and functional considerations and new perspectives." *Mol Cell Endocrinol* 350(2): 206-215.

Zennaro, M. C. and X. Jeunemaitre (2011). "Mutations in *KCNJ5* gene cause hyperaldosteronism." *Circ Res* 108(12): 1417-1418.

Zennaro, M. C., X. Jeunemaitre and S. Boulkroun (2012). "Integrating Genetics and Genomics in Primary Aldosteronism." *Hypertension*.

# **ANNEXES**



# **ANNEXE 1**

Plan des TLDA A et B

# PLAQUE A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-miR-1	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	MammU6	MammU6	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22
2	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	MammU6	MammU6	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-32	hsa-miR-33b	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-92a	hsa-miR-93
3	hsa-miR-95	hsa-miR-96	hsa-miR-98	hsa-miR-99a	hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-106b	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-129-5p
4	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-147b
5	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	RNU48	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-194
6	hsa-miR-195	hsa-miR-196b	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-208b	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-216a	hsa-miR-216b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-221
7	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	ath-miR159a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-331-5p
8	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-155	hsa-let-7b	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-345	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374a
9	hsa-miR-374b	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449a	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p
10	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-496
11	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516b	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c
12	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-519a	hsa-miR-519d	hsa-miR-519e	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-520g	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-526b	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532-5p
13	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548d-3p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-579	hsa-miR-582-3p
14	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-652	hsa-miR-653	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p
15	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-888	hsa-miR-889	hsa-miR-890	hsa-miR-891a	hsa-miR-891b	hsa-miR-892a	hsa-miR-147
16	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-220	hsa-miR-220b	hsa-miR-220c	hsa-miR-298	hsa-miR-325	hsa-miR-346	hsa-miR-376c	hsa-miR-384	hsa-miR-412	hsa-miR-448	hsa-miR-492	hsa-miR-506	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-517b	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-520b	hsa-miR-520e	hsa-miR-520f

# PLAQUE B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	dme-miR-7	hsa-miR-548l	hsa-miR-30a-3p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-30d	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-34b	hsa-miR-126	hsa-miR-154	hsa-miR-182	U6 snRNA	U6 snRNA	hsa-miR-206	hsa-miR-213	hsa-miR-302c	hsa-miR-302d	hsa-miR-378	hsa-miR-380-5p	hsa-miR-1257	hsa-miR-200a	hsa-miR-432	hsa-miR-432	hsa-miR-497	hsa-miR-500
2	hsa-miR-1238	hsa-miR-488	hsa-miR-517	hsa-miR-516-3p	hsa-miR-518c	hsa-miR-519e	hsa-miR-520h	hsa-miR-524	hsa-miR-7d	hsa-miR-363	U6 snRNA	U6 snRNA	hmo-miR-7	hsa-miR-656	hsa-miR-549	hsa-miR-657	hsa-miR-658	hsa-miR-659	hsa-miR-551a	hsa-miR-552	hsa-miR-553	hsa-miR-554	hsa-miR-555	hsa-miR-557
3	hsa-miR-558	hsa-miR-559	hsa-miR-562	hsa-miR-563	hsa-miR-564	hsa-miR-566	hsa-miR-567	hsa-miR-569	hsa-miR-586	hsa-miR-587	RNU44	hsa-miR-588	hsa-miR-589	hsa-miR-550	hsa-miR-591	hsa-miR-592	hsa-miR-593	hsa-miR-596	hsa-miR-622	hsa-miR-599	hsa-miR-623	hsa-miR-600	hsa-miR-624	hsa-miR-601
4	hsa-miR-626	hsa-miR-629	hsa-miR-630	hsa-miR-631	hsa-miR-603	hsa-miR-604	hsa-miR-605	hsa-miR-606	hsa-miR-607	hsa-miR-608	hsa-miR-609	hsa-miR-633	hsa-miR-634	hsa-miR-635	hsa-miR-637	hsa-miR-638	hsa-miR-639	hsa-miR-640	hsa-miR-641	hsa-miR-613	hsa-miR-614	hsa-miR-616	hsa-miR-617	hsa-miR-643
5	hsa-miR-644	hsa-miR-645	hsa-miR-621	hsa-miR-646	hsa-miR-647	hsa-miR-648	hsa-miR-649	hsa-miR-650	hsa-miR-661	hsa-miR-662	RNU48	hsa-miR-571	hsa-miR-572	hsa-miR-573	hsa-miR-575	hsa-miR-578	hsa-miR-580	hsa-miR-581	hsa-miR-583	hsa-miR-584	hsa-miR-585	hmo-miR-29c	hsa-miR-766	hsa-miR-595
6	hsa-miR-668	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-454	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-770-5p	hsa-miR-769-3p	hsa-miR-802	hsa-miR-675	hsa-miR-505	hsa-miR-218-1	hsa-miR-221	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-136	hsa-miR-34b	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-195	hsa-miR-30c-1	hsa-miR-30c-2	hsa-miR-32	hsa-miR-31	hsa-miR-130b
7	hsa-miR-26a-2	hsa-miR-361-3p	hsa-let-7g	hsa-miR-302b	hsa-miR-302d	hsa-miR-367	hsa-miR-374a	hsa-miR-23b	hsa-miR-376a	hsa-miR-377	ath-miR159a	hsa-miR-30b	hsa-miR-122	hsa-miR-130a	hsa-miR-132	hsa-miR-148a	hsa-miR-33a	hsa-miR-33a	hsa-miR-92a-1	hsa-miR-92a-2	hsa-miR-93	hsa-miR-96	hsa-miR-99a	hsa-miR-100
8	hsa-miR-101	hsa-miR-138-2	hsa-miR-141	hsa-miR-143	hsa-miR-144	hsa-miR-145	hsa-miR-920	hsa-miR-921	hsa-miR-922	hsa-miR-924	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-125b-2	hsa-miR-135b	hsa-miR-148b	hsa-miR-146a	hsa-miR-149	hsa-miR-29b-1	hsa-miR-29b-2	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	hsa-miR-16-2	hsa-let-7i	hsa-miR-15b	hsa-miR-27b
9	hsa-miR-933	hsa-miR-934	hsa-miR-935	hsa-miR-936	hsa-miR-937	hsa-miR-938	hsa-miR-939	hsa-miR-941	hsa-miR-335	hsa-miR-942	hsa-miR-943	hsa-miR-944	hsa-miR-99b	hsa-miR-124	hsa-miR-541	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-888	hsa-miR-892b	hsa-miR-9	hsa-miR-411	hsa-miR-378	hsa-miR-151-3p	hsa-miR-340	hsa-miR-190b
10	hsa-miR-545	hsa-miR-183	hsa-miR-192	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-155	hsa-miR-10a	hsa-miR-214	hsa-miR-218-2	hsa-miR-129	hsa-miR-22	hsa-miR-425	hsa-miR-30d	hsa-let-7a	hsa-miR-424	hsa-miR-18b	hsa-miR-20b	hsa-miR-431	hsa-miR-2	hsa-miR-10b	hsa-miR-34a	hsa-miR-181a-2	hsa-miR-744	hsa-miR-452
11	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-181c	hsa-miR-196a	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-708	hsa-miR-92b	hsa-miR-551b	hsa-miR-202	hsa-miR-193b	hsa-miR-497	hsa-miR-518e	hsa-miR-543	hsa-miR-125b-1	hsa-miR-194	hsa-miR-106b	hsa-miR-302a	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-518f	hsa-miR-374b	hsa-miR-520c-3p	hsa-let-7b	hsa-let-7c	hsa-let-7e	hsa-miR-550
12	hsa-miR-593	hsa-let-7f-1	hsa-let-7f-2	hsa-miR-15a	hsa-miR-16-1	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b-1	hsa-miR-625	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-20a	hsa-miR-21	hsa-miR-23a	hsa-miR-24-1	hsa-miR-24-2	hsa-miR-25	hsa-miR-26a-1	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-29a	hsa-miR-151-5P	hsa-miR-765	hsa-miR-338-5P
13	hsa-miR-620	hsa-miR-577	hsa-miR-144	hsa-miR-590-3P	hsa-miR-191	hsa-miR-665	hsa-miR-520D-3P	hsa-miR-1224-3P	hsa-miR-1305	hsa-miR-513C	hsa-miR-513B	hsa-miR-1226	hsa-miR-1236	hsa-miR-1228	hsa-miR-1225-3P	hsa-miR-1233	hsa-miR-1227	hsa-miR-1286	hsa-miR-548M	hsa-miR-1179	hsa-miR-1178	hsa-miR-1205	hsa-miR-1271	hsa-miR-1201
14	hsa-miR-548J	hsa-miR-1263	hsa-miR-1294	hsa-miR-1269	hsa-miR-1265	hsa-miR-1244	hsa-miR-1303	hsa-miR-1259	hsa-miR-548P	hsa-miR-1264	hsa-miR-1255B	hsa-miR-1282	hsa-miR-1255A	hsa-miR-1270	hsa-miR-1197	hsa-miR-1324	hsa-miR-548H	hsa-miR-1254	hsa-miR-548K	hsa-miR-1251	hsa-miR-1285	hsa-miR-1245	hsa-miR-1292	hsa-miR-1301
15	hsa-miR-1200	hsa-miR-1182	hsa-miR-1288	hsa-miR-1291	hsa-miR-1275	hsa-miR-1183	hsa-miR-1184	hsa-miR-1276	hsa-miR-320B	hsa-miR-1272	hsa-miR-1180	hsa-miR-1256	hsa-miR-1278	hsa-miR-1262	hsa-miR-1243	hsa-miR-663B	hsa-miR-1252	hsa-miR-1298	hsa-miR-1290	hsa-miR-1249	hsa-miR-1248	hsa-miR-1289	hsa-miR-1204	hsa-miR-1826
16	hsa-miR-1304	hsa-miR-1203	hsa-miR-1206	hsa-miR-548G	hsa-miR-1208	hsa-miR-548E	hsa-miR-1274A	hsa-miR-1274B	hsa-miR-1267	hsa-miR-1250	hsa-miR-548N	hsa-miR-1283	hsa-miR-1247	hsa-miR-1253	hsa-miR-720	hsa-miR-1260	hsa-miR-664	hsa-miR-1302	hsa-miR-1300	hsa-miR-1284	hsa-miR-548L	hsa-miR-1293	hsa-miR-1825	hsa-miR-1296



## **ANNEXE 2**

Liste complète des cibles validées in vitro pour  
les miRs 137 et 375

hsa-mir-137			
<b>BAX</b>	BCL2-associated X protein	<b>LIF</b>	leukemia inhibitory factor
<b>CD36</b>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	<b>MCL1</b>	myeloid cell leukemia sequence 1
<b>CDC42</b>	cell division cycle 42	<b>MECP2</b>	methyl CpG binding protein 2
<b>CDK6</b>	cyclin-dependent kinase 6	<b>MET</b>	met proto-oncogene
<b>COX8A</b>	cytochrome c oxidase subunit VIIIA	<b>MIB1</b>	mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
<b>CTBP1</b>	C-terminal binding protein 1	<b>MITF</b>	microphthalmia-associated transcription factor
<b>DNMT1</b>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	<b>MYC</b>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>E2F6</b>	E2F transcription factor 6	<b>NCOA2</b>	nuclear receptor coactivator 2
<b>EGFR</b>	epidermal growth factor receptor	<b>PTK2</b>	PTK2 protein tyrosine kinase 2
<b>EIF2C2</b>	eukaryotic translation initiation factor 2C	<b>SIRT1</b>	sirtuin 1
<b>EZH2</b>	enhancer of zeste homolog 2	<b>SMARCA5</b>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5
<b>GYP A</b>	glycophorin A	<b>SOX2</b>	SRY (sex determining region Y)-box 2
<b>HDAC9</b>	histone deacetylase 9	<b>TFRC</b>	transferrin receptor
<b>JARID1B</b>	lysine (K)-specific demethylase 5B	<b>TIMM8A</b>	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A
<b>KDM1A</b>	lysine (K)-specific demethylase 1A	<b>VKORC1</b>	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1
<b>KRAS</b>	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog		
hsa-mir-375			
<b>ABCE1</b>	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	<b>DGCR8</b>	DiGeorge syndrome critical region gene 8
<b>ADIPOR2</b>	adiponectin receptor 2	<b>DICER1</b>	dicer 1, ribonuclease type III
<b>AKT1</b>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	<b>DLG4</b>	discs, large homolog 4
<b>ATN1</b>	atrophin 1	<b>DNAI1</b>	dynein, axonemal, intermediate chain 1
<b>ATP6VoA1</b>	ATPase, H+ transporting, lysosomal Vo subunit a1	<b>DNMT1</b>	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
<b>ATP8A2</b>	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8A, member 2	<b>EIF2C2</b>	eukaryotic translation initiation factor 2C
<b>BDNF</b>	brain-derived neurotrophic factor	<b>ELAVL4</b>	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4
<b>C1QBP</b>	complement component 1, q subcomponent binding protein	<b>EPHB2</b>	EPH receptor B2
<b>CCL1</b>	chemokine (C-C motif) ligand 1	<b>ESR1</b>	estrogen receptor 1
<b>CDK6</b>	cyclin-dependent kinase 6	<b>FABP4</b>	fatty acid binding protein 4
<b>COX8A</b>	cytochrome c oxidase subunit VIIIA	<b>GATA3</b>	GATA binding protein 3

hsa-mir-375 (suite)			
<b>GPR137B</b>	G protein-coupled receptor 137B	<b>PDCD4</b>	programmed cell death 4
<b>HNF1A</b>	HNF1 homeobox A	<b>PDK1</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
<b>HNF4A</b>	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	<b>PDPK1</b>	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
<b>IARS</b>	isoleucyl-tRNA synthetase	<b>PLAG1</b>	pleiomorphic adenoma gene 1 [polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit
<b>IFNG</b>	interferon, gamma	<b>POLD3</b>	
<b>IL13</b>	Interleukin 13	<b>PPARG</b>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
<b>IL17C</b>	Interleukin 17C	<b>RASD1</b>	RAS, dexamethasone-induced 1
<b>IL1A</b>	Interleukin 1A	<b>RBJ</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27
<b>IL23A</b>	Interleukin 23A	<b>RETNLB</b>	resistin like beta
<b>IQGAP1</b>	IQ motif containing GTPase activating protein 1	<b>RHOA</b>	ras homolog family member A
<b>JAK2</b>	Janus kinase 2 v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma	<b>RNASEN</b>	drosha, ribonuclease type III
<b>MAF</b>	oncogene homolog	<b>SMYD3</b>	SET and MYND domain containing 3
<b>MAPK14</b>	mitogen-activated protein kinase 14	<b>TCF7L2</b>	transcription factor 7-like 2 translocase of inner mitochondrial membrane
<b>MAPK3</b>	mitogen-activated protein kinase 13	<b>TIMM8A</b>	8 homolog A
<b>MTPN</b>	myotrophin	<b>USP1</b>	ubiquitin specific peptidase 1
<b>NCAM1</b>	neural cell adhesion molecule 1	<b>VIM</b>	vimentin
<b>NEUROG3</b>	neurogenin 3	<b>YAP1</b>	Yes-associated protein 1 v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene
<b>NODAL</b>	Nodal	<b>YES1</b>	homolog 1
<b>NPAT</b>	nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus oligonucleotide/oligosaccharide-binding	<b>YY1AP1</b>	YY1 associated protein 1
<b>OBFC2A</b>	fold containing 2A	<b>ZNFX1</b>	zinc finger, NFX1-type containing 1



## **ANNEXE 3**

Liste complète des ARNm inversement co-régulés entre les miRs 137 et 375 et les résultats du transcriptome.

Seuls les ARNm sur-exprimés sont cités ici (étant donné que les miRs 137 et 375 sont sous-exprimés dans les APA)



MiR 137			
<b>ANKIB1</b>	ankyrin repeat and IBR domain containing 1	<b>DSP</b>	desmoplakin
<b>ANKRD17</b>	ankyrin repeat domain 17	<b>DTX2</b>	deltex homolog 2 (Drosophila)
<b>ANKRD49</b>	ankyrin repeat domain 49	<b>EDEM1</b>	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
<b>ATF7IP2</b>	activating transcription factor 7 interacting protein 2	<b>EIF5</b>	eukaryotic translation initiation factor 5
<b>ATP5E</b>	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	<b>ENC1</b>	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB-like domain)
<b>ATPAF1</b>	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	<b>EXOC4</b>	exocyst complex component 4
<b>C14orf153</b>	apoptogenic 1, mitochondrial	<b>EXOSC8</b>	exosome component 8 FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain
<b>C20orf142</b>	fat storage-inducing transmembrane protein 2 [	<b>FARP1</b>	protein 1
<b>C9orf25</b>	family with sequence similarity 219, member A	<b>FLRT2</b>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2
<b>CDO1</b>	cysteine dioxygenase, type I	<b>FOSL2</b>	FOS-like antigen 2
<b>CDRT4</b>	CMT1A duplicated region transcript 4	<b>FTSJ3</b>	FtsJ homolog 3
<b>CGNL1</b>	cingulin-like 1	<b>GOLGA4</b>	golgin A4
<b>CHD4</b>	chromodomain helicase DNA binding protein 4	<b>GOLPH3</b>	golgi phosphoprotein 3
<b>CLGN</b>	calmegin	<b>GRM3</b>	glutamate receptor, metabotropic 3
<b>CNOT6</b>	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	<b>GSPT1</b>	G1 to S phase transition 1
<b>COX11</b>	COX11 cytochrome c oxidase assembly homolog	<b>HDAC2</b>	histone deacetylase 2
<b>CPOX</b>	coproporphyrinogen oxidase	<b>HMGB1</b>	high mobility group box 1
<b>CRTAP</b>	cartilage associated protein	<b>HSD3B2</b>	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2
<b>CTNND2</b>	catenin (cadherin-associated protein), delta 2	<b>HSDL2</b>	hydroxysteroid dehydrogenase like 2
<b>CTPS</b>	CTP synthase 1	<b>IQSEC1</b>	IQ motif and Sec7 domain 1
<b>CYFIP2</b>	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	<b>ITGB1</b>	integrin, beta 1
<b>DCTN4</b>	dynactin 4 (p62)	<b>KIAA015</b>	2 malectin
<b>DDEF2</b>	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 2	<b>KIAA152</b>	2 KIAA1522
<b>DDEFL1</b>	ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 3	<b>KLHL24</b>	kelch-like 24 (Drosophila)
<b>DDX46</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	<b>LAPTM5</b>	lysosomal protein transmembrane 5
<b>DHX40</b>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40	<b>LMO7</b>	LIM domain 7
<b>DLC1</b>	deleted in liver cancer 1	<b>LOC202</b>	oligosaccharyltransferase complex subunit
<b>DNAJA2</b>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	<b>459</b>	pseudogene 1
		<b>LOC400</b>	
		<b>506</b>	chromosome 16 open reading frame 88

MiR 137 (suite)			
<b>LRP6</b>	low density lipoprotein receptor-related protein 6	<b>SPECC1</b>	sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1
<b>LRRC8D</b>	leucine rich repeat containing 8 family, member D	<b>SPG20</b>	spastic paraplegia 20
<b>MAP4K2</b>	kinase 2	<b>SPTBN1</b>	spectrin, beta, non-erythrocytic 1
<b>MGAT2</b>	mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	<b>ST13</b>	suppression of tumorigenicity 13
<b>MRPS16</b>	mitochondrial ribosomal protein S16	<b>ST5</b>	suppression of tumorigenicity 5
<b>NAV3</b>	neuron navigator 3	<b>STAG2</b>	stromal antigen 2
<b>NETO2</b>	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	<b>STK10</b>	serine/threonine kinase 10
<b>NR4A3</b>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	<b>SYNGAP1</b>	synaptic Ras GTPase activating protein 1
<b>OAZ2</b>	ornithine decarboxylase antizyme 2	<b>TBC1D1</b>	TBC1 (tre-2/USP6, BUB2, cdc16) domain family, member 1
<b>OMD</b>	ornithine decarboxylase antizyme 2	<b>TCOF1</b>	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1
<b>P15RS</b>	regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A	<b>TCP1</b>	t-complex 1
<b>PDK4</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	<b>TMED2</b>	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2
<b>PIP5K1B</b>	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, beta	<b>TRIM44</b>	tripartite motif containing 44
<b>PNRC2</b>	proline-rich nuclear receptor coactivator 2	<b>TRIM45</b>	tripartite motif containing 45
<b>PPA2</b>	pyrophosphatase (inorganic) 2	<b>TUSC1</b>	tumor suppressor candidate 1
<b>PTPLAD2</b>	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2	<b>UBE2H</b>	ubiquitin-conjugating enzyme E2H
<b>RAB33B</b>	RAB33B, member RAS oncogene family	<b>UBXD2</b>	UBX domain protein 4
<b>RDX</b>	radixin	<b>UQCRB</b>	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein
<b>REPIN1</b>	replication initiator 1	<b>UTRN</b>	utrophin
<b>RICS</b>	Rho GTPase activating protein 32	<b>WWP1</b>	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
<b>RPESP</b>	somatomedin B and thrombospondin, type 1 domain containing	<b>ZFP36L2</b>	zinc finger protein 36, C3H type-like 2
<b>RPL39L</b>	ribosomal protein L39-like	<b>ZNF12</b>	zinc finger protein 12
<b>RPS23</b>	ribosomal protein S23	<b>ZNF208</b>	zinc finger protein 208
<b>RRS1</b>	RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae)	<b>ZNF641</b>	zinc finger protein 641
<b>SCFD1</b>	sec1 family domain containing 1	<b>ZNF681</b>	zinc finger protein 681
<b>SEC23IP</b>	SEC23 interacting protein		
<b>SLMAP</b>	sarcolemma associated protein		

Mir 375			
<b>ACBD4</b>	acyl-CoA binding domain containing 4 [	<b>MTA1</b>	metastasis associated 1
<b>ALS2</b>	amyotrophic lateral sclerosis 2	<b>NAP1L1</b>	nucleosome assembly protein 1-like 1
<b>ANKMY2</b>	ankyrin repeat and MYND domain containing 2	<b>NEK9</b>	NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 9
<b>ANXA2</b>	annexin A2	<b>NPTX1</b>	neuronal pentraxin I
<b>ARIH1</b>	ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1	<b>NSMAF</b>	neutral sphingomyelinase (N-SMase) activation associated factor
<b>ARNT2</b>	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	<b>PCP4</b>	Purkinje cell protein 4
		<b>PDE8B</b>	phosphodiesterase 8B
<b>ACBD4</b>	acyl-CoA binding domain containing 4 [	<b>PEA15</b>	phosphoprotein enriched in astrocytes 15
<b>ALS2</b>	amyotrophic lateral sclerosis 2	<b>PHLDB1</b>	pleckstrin homology-like domain, family B, member 1
<b>ANKMY2</b>	ankyrin repeat and MYND domain containing 2	<b>PLXDC2</b>	plexin domain containing 2
<b>ANXA2</b>	annexin A2	<b>PPT2</b>	palmitoyl-protein thioesterase 2
<b>ARIH1</b>	ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1	<b>PRKCH</b>	protein kinase C, eta
<b>ARNT2</b>	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	<b>R3HDM1</b>	R3H domain containing 1
<b>AUTS2</b>	autism susceptibility candidate 2	<b>RIMS2</b>	regulating synaptic membrane exocytosis 2
<b>BMF</b>	Bcl2 modifying factor	<b>RP13-347D8.3</b>	KIAA1210 solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3
<b>C14orf119</b>	chromosome 14 open reading frame 119	<b>SLC29A3</b>	member 3
<b>C1QB</b>	complement component 1, q subcomponent binding protein	<b>SMAD3</b>	SMAD family member 3
<b>C20orf30</b>	transmembrane protein 230	<b>SPRY4</b>	sprouty homolog 4 (Drosophila)
<b>COL27A1</b>	collagen, type XXVII, alpha 1	<b>SULF2</b>	sulfatase 2
<b>CREB3L3</b>	cAMP responsive element binding protein 3-like 3	<b>TRIM2</b>	tripartite motif containing 2
<b>DDX56</b>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 56	<b>UBA2</b>	ubiquitin-like modifier activating enzyme 2
<b>DENND2D</b>	DENN/MADD domain containing 2D	<b>VASH1</b>	vasohibin 1 [ <i>Homo sapiens</i> ]
<b>DIRAS3</b>	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	<b>ZC3H10</b>	zinc finger CCCH-type containing 10
<b>EPB41L2</b>	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	<b>ZNF91</b>	zinc finger protein 91
<b>HSPH1</b>	heat shock 105kDa/110kDa protein 1		
<b>IL17D</b>	interleukin 17D		
<b>METTL5</b>	methyltransferase like 5		

## **ANNEXE 4**

### **Aldosterone synthase inhibition in humans**

Michel Azizi MD, PhD, Laurence Amar, MD, Joël Menard, MD, MSc

Accepted in August 2012 in Nephrology Dialysis Transplantation

## **ANNEXE 5**

### **Adrenal cortex remodeling and functional zona glomerulosa hyperplasia in primary aldosteronism**

Boukroun S, Samson-Couterie B, Dzib JF, Lefebvre H, Louiset E, Amar L, Plouin PF, Lalli E, Jeunemaitre X, Benecke A, Meatchi T, Zennaro MC.

Hypertension. 2010 Nov;56(5):885-92.

## **ANNEXE 6**

### **Prevalence, clinical, and molecular correlates of KCNJ5 mutations in primary aldosteronism.**

Boukroun S, Beuschlein F, Rossi GP, Golib-Dzib JF, Fischer E, Amar L, Mulatero P, Samson-Couterie B, Hahner S, Quinkler M, Fallo F, Letizia C, Allolio B, Ceolotto G, Cicala MV, Lang K, Lefebvre H, Lenzini L, Maniero C, Monticone S, Perrocheau M, Pilon C, Plouin PF, Rayes N, Seccia TM, Veglio F, Williams TA, Zinamosca L, Mantero F, Benecke A, Jeunemaitre X, Reincke M, Zennaro MC.

Hypertension. 2012 Mar;59(3):592-8.

## **ANNEXE 7**

### **A clinical prediction score to diagnose unilateral primary aldosteronism**

Kuipers E, Amar L, Raynaud A, Plouin PF, Steichen O

Accepted in September 2012 in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism