

UNIVERSITE PARIS 5 RENE DESCARTES

Ecole Doctorale Gc2iD

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 5 RENE DESCARTES

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Delphine VEZZOSI

Le 30 novembre 2012

**Altérations de la voie de l'AMPc dans la  
tumorigénèse cortico-surrénalienne: étude des  
phosphodiésterases PDE11A et PDE8B**

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jérôme Bertherat

**Jury**

Dr Grégoire VANDESCASTEELE

Président

Pr Olivier CHABRE

Rapporteur

Dr Pierre VAL

Rapporteur

Dr Estelle LOUISET

Examineur

Pr Jérôme BERTHERAT

Directeur de recherche

UNIVERSITE PARIS 5 RENE DESCARTES

Ecole Doctorale Gc2iD

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 5 RENE DESCARTES

Discipline : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Delphine VEZZOSI

Le 30 novembre 2012

**Altérations de la voie de l'AMPc dans la  
tumorigénèse cortico-surrénalienne: étude des  
phosphodiesterases PDE11A et PDE8B**

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Jérôme Bertherat

**Jury**

Dr Grégoire VANDESCASTEELE

Président

Pr Olivier CHABRE

Rapporteur

Dr Pierre VAL

Rapporteur

Dr Estelle LOUISET

Examineur

Pr Jérôme BERTHERAT

Directeur de recherche

# Remerciements

Je remercie tout d'abord M le Pr BERTHERAT pour m'avoir intégré au sein de votre équipe et pour m'avoir fait confiance pendant ces années de thèse. J'espère avoir été à la hauteur de vos espérances. Merci également pour toutes vos remontées de moral et vos réassurances dans les périodes de doutes « mais si c'est certain, tu vas réussir à la terminer cette thèse ». Merci...

Je remercie également M le Dr Pierre VAL et M le Pr Olivier CHABRE pour avoir accepté la lourde charge d'être rapporteurs et pour avoir consacré de votre temps à lire le manuscrit. Vous avez contribué par vos remarques et vos suggestions à améliorer la qualité du mémoire, et je vous en suis très reconnaissante.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à M le Dr Grégoire VANDECASTEELE pour m'avoir accueilli dans ton laboratoire, m'avoir initié aux expériences de FRET, et avoir accepté de juger ce travail en tant que président du jury.

J'associe à ces remerciements Mme le Dr Estelle LOUISET pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail et pour avoir accepté de siéger à ce jury de thèse.

Un travail de thèse ne se fait jamais en solitaire et je remercie donc de tout cœur tous les membres de l'Equipe 10 Tumeurs endocrines et signalisation de l'Institut Cochin, anciens et nouveaux, qui ont participé de près ou de loin à cette aventure : Marthe pour ton sourire, tes encouragements et pour m'avoir tenu la main lors des manips de l'activité PKA, Guillaume pour ton aide précieuse lors du travail sur le transcriptome, Bruno pour m'avoir initié à toutes les techniques de biologie moléculaire et aux secrets des muffins, Fernande pour avoir toujours accepté avec le sourire de m'aider pour les broyages de tumeurs, Rossella pour ton aide dans le travail sur PDE11, et tous les autres avec qui j'ai passé de très bons moments au labo, Karine, Léopoldine, Lionel, Pierre, Lucie, Amato, Olivia, Hortense, Stéphane, Laure, Sébastien, Marine, Camille, Stéphanie, Frédérique, Marie Laure...

Je n'oublie pas mes petites cellules HEK 293 et H295R qui ont sacrifié leur vie pour que je puisse soutenir cette thèse.

Cette thèse a été réalisée grâce au soutien financier de l'INCa que je remercie. Sans eux ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens également à remercier toute l'équipe d'endocrinologie du CHU de Toulouse avec qui j'ai beaucoup de plaisir à travailler quotidiennement.

Je n'oublie évidemment pas ceux qui me sont chers, ma maman pour son soutien indéfectible et mon papa qui, je l'espère, aurait été fier de moi, ainsi que le reste de ma famille, ma belle famille et mes amis.

Enfin un merci tout spécial à mes deux amours : Grégoire pour tout ce que nous partageons et pour ton aide et ta patience lors des moments de rush lors de la préparation de cette thèse et Tom, parce que te voir grandir est un bonheur de tous

## Remerciements

les jours. Merci aussi Tom pour tes 100 000 « et pourquoi ? » quotidiens qui nous permettent ton papa et moi de nous remettre en question tous les jours.

# Liste des abréviations

ACTH: Adreno-corticotropique hormone

AIMAH: ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia

AIP: aryl hydrocarbure

AKAP: A kinase anchoring protein

AMPC: adenosine monophosphate cyclique

ANP: atrial natriuretic peptide

ATP: adenosine-5'-triphosphate

BPCO: Bronchopneumopathie chronique obstructive

GMPc: guanosine-3'-5'monophosphate

GDP: Guanosine diphosphate

GTP: Guanosine triphosphate

HCG: Human Chorionic Gonadotropin

IBMX: 3-isobutyl-1-méthylxanthine

IGF1: Insulin-Like Growth Factor 1

GLP1: Glucagon-like peptide-1

LH: Luteinizing hormone

MAP-kinase: Mitogen-activated protein kinase

NO : Oxyde nitrique

PDE : Phosphodiesterase

PPNAD : Primary Pigmented Nodular Adrenal Disease = dysplasie micronodulaire pigmentée bilatérale des surrénales

PRKAR1A: Sous unité régulatrice R1A de la protéine kinase A

RCPG : Récepteur couplé aux protéines G

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>2</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>7</b>
<b>1 FIGURES .....</b>	<b>7</b>
<b>2 TABLEAUX .....</b>	<b>7</b>
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>8</b>
<b>1 LA VOIE DE L'AMP CYCLIQUE (AMPC).....</b>	<b>8</b>
<b>2 VOIE DE L'AMPC ET STEROÏDOGENESE.....</b>	<b>10</b>
<b>3 VOIE DE L'AMPC ET TUMEURS ENDOCRINES .....</b>	<b>11</b>
<b>4 LES TUMEURS DE LA CORTICOSURRENALE .....</b>	<b>16</b>
4.1 LES LESIONS BENIGNES DE LA CORTICOSURRENALE.....	17
4.1.1 <i>L'adénome corticosurrénalien .....</i>	<i>17</i>
4.1.2 <i>L'hyperplasie corticosurrénalienne .....</i>	<i>19</i>
4.1.3 <i>Les lésions malignes de la corticosurrénale.....</i>	<i>20</i>
<b>5 LES PHOSPHODIESTERASES .....</b>	<b>20</b>
5.1 STRUCTURE DES PDES .....	22
5.1.1 <i>Le domaine catalytique.....</i>	<i>23</i>
5.1.2 <i>Le domaine N-terminal .....</i>	<i>26</i>
5.1.3 <i>Le domaine C-terminal .....</i>	<i>29</i>
5.2 DIMERISATION DES PDES .....	29
5.3 LOCALISATION TISSULAIRE DES PDES.....	30
5.3.1 <i>PDE1 .....</i>	<i>30</i>
5.3.2 <i>PDE2.....</i>	<i>31</i>
5.3.3 <i>PDE3.....</i>	<i>31</i>
5.3.4 <i>PDE4.....</i>	<i>31</i>
5.3.5 <i>PDE5.....</i>	<i>32</i>
5.3.6 <i>PDE6.....</i>	<i>32</i>
5.3.7 <i>PDE7.....</i>	<i>32</i>
5.3.8 <i>PDE8.....</i>	<i>33</i>
5.3.9 <i>PDE9.....</i>	<i>33</i>
5.3.10 <i>PDE10.....</i>	<i>33</i>
5.3.11 <i>PDE11 .....</i>	<i>34</i>
5.4 LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES PDES .....	36
5.5 SPECIFICITES ET FONCTIONS DE CHACUNE DES PDES.....	39
5.5.1 <i>PDE 1.....</i>	<i>40</i>
5.5.2 <i>PDE 2.....</i>	<i>41</i>
5.5.3 <i>PDE 3.....</i>	<i>42</i>
5.5.4 <i>PDE 4.....</i>	<i>43</i>
5.5.5 <i>PDE 5.....</i>	<i>44</i>
5.5.6 <i>PDE 6.....</i>	<i>44</i>
5.5.7 <i>PDE 7.....</i>	<i>45</i>
5.5.8 <i>PDE 8.....</i>	<i>46</i>
5.5.9 <i>PDE 9.....</i>	<i>46</i>
5.5.10 <i>PDE 10.....</i>	<i>46</i>
5.5.11 <i>PDE 11.....</i>	<i>47</i>
5.6 PHOSPHODIESTERASES ET PATHOLOGIE HUMAINE .....	49

## Table des matières

5.6.1	<i>PDEs et pathologie humaine non endocrine</i> .....	49
5.6.2	<i>Phosphodiesterases et glandes endocrines</i> .....	53
5.6.3	<i>Inhibition des PDEs en thérapeutique</i> .....	65
<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL</b> .....		<b>72</b>
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b> .....		<b>75</b>
<b>1 CONSEQUENCES DE LA PRESENCE DE VARIANTS GENETIQUES DE PDE11A CHEZ DES PATIENTS AVEC UNE TUMEUR DE LA SURRENALE</b> .....		<b>75</b>
1.1	ARTICLE 1 .....	75
1.2	ARTICLE 2 .....	77
<b>2 TRANSCRIPTOME DES ADENOMES CORTICOSURRENALIENS</b> .....		<b>79</b>
<b>DISCUSSION</b> .....		<b>109</b>
<b>1 CONSEQUENCES DE LA PRESENCE DE VARIANTS GENETIQUES DE PDE11A CHEZ DES PATIENTS AVEC UNE TUMEUR DE LA SURRENALE</b> .....		<b>109</b>
<b>2 TRANSCRIPTOME DES ADENOMES CORTICOSURRENALIENS</b> .....		<b>115</b>
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>124</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....		<b>125</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>162</b>
<b>1 PHOSPHODIESTERASES IN ENDOCRINE PHYSIOLOGY AND DISEASE.</b> .....		<b>162</b>
<b>2 PATHOGENESIS OF BENIGN ADRENOCORTICAL TUMORS.</b> .....		<b>163</b>
<b>3 CARNEY COMPLEX. CLINICAL AND GENETIC 2010 UPDATE.</b> .....		<b>164</b>
<b>4 IDENTIFICATION OF NOVEL GENETIC VARIANTs IN PHOSPHODIESTERASE 8B (PDE8B), A CAMP-SPECIFIC PHOSPHODIESTERASE HIGHLY EXPRESSED IN THE ADRENAL CORTEX, IN A COHORT OF PATIENTS WITH ADRENAL TUMOURS.</b> .....		<b>165</b>

# Table des illustrations

## 1 Figures

Figure 1: Voie schématique des nucléotides cycliques .....	9
Figure 2: Action de l'ACTH sur la cellule corticosurrénalienne .....	11
Figure 3: Anomalies des acteurs de la voie de l'AMPc dans les tumeurs surréaliennes.....	12
Figure 4: Physiopathologie d'un syndrome de Cushing ACTH indépendant secondaire à la présence d'un récepteur au GIP surréalien.....	14
Figure 5: Physiopathologie du complexe de Carney. ....	15
Figure 6: Imagerie des tumeurs surréaliennes .....	16
Figure 7: Aspects macroscopiques d'un adénome surréalien (image de gauche) et d'un corticosurréalomme (image de droite).....	17
Figure 8: Caractéristiques sémiologiques d'un syndrome de Cushing clinique .....	18
Figure 9: Transformation de l'AMPc en 5'AMP par les phosphodiesterases .....	21
Figure 10: Structure schématique des 11 familles des PDEs.....	22
Figure 11: Structure du domaine catalytique des PDEs .....	23
Figure 12: Dimérisation de PDE6 .....	29
Figure 13: Exemple de compartimentation de l'AMPc grâce aux PDEs .....	38
Figure 14: Représentation schématique des 4 isoformes de PDE11 .....	48
Figure 15: Rôle des PDEs dans la stéroïdogénèse.....	54
Figure 16: Modèle de compartimentation de l'AMPc contrôlé par PDE8 et PDE4 dans la stéroïdogénèse des cellules de Leydig.....	61

## 2 Tableaux

Tableau 1: Spécificité et distribution tissulaire et subcellulaire de chacune des PDEs .....	36
Tableau 2: Inhibiteurs des phosphodiesterases .....	66



# Synthèse bibliographique

## 1 La voie de l'AMP cyclique (AMPc)

Earl Sutherland et son équipe ont été des pionniers dans la compréhension du second messenger AMPc dès 1958. Leurs travaux ont été couronnés par le prix Nobel de physiologie en 1972. La voie de l'AMPc est une voie de signalisation intracellulaire majeure impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires. En effet, l'action de nombreuses hormones et neurotransmetteurs est médiée par l'AMPc. Les modifications de la concentration d'AMPc total ou au niveau d'un compartiment intracellulaire contrôlent de nombreux processus physiologiques tels que la vision, l'olfaction, la fonction synaptique, la contraction musculaire, l'homéostasie de l'eau et des électrolytes, les réponses immunes, l'hémostase, le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que l'expression de nombreux gènes.

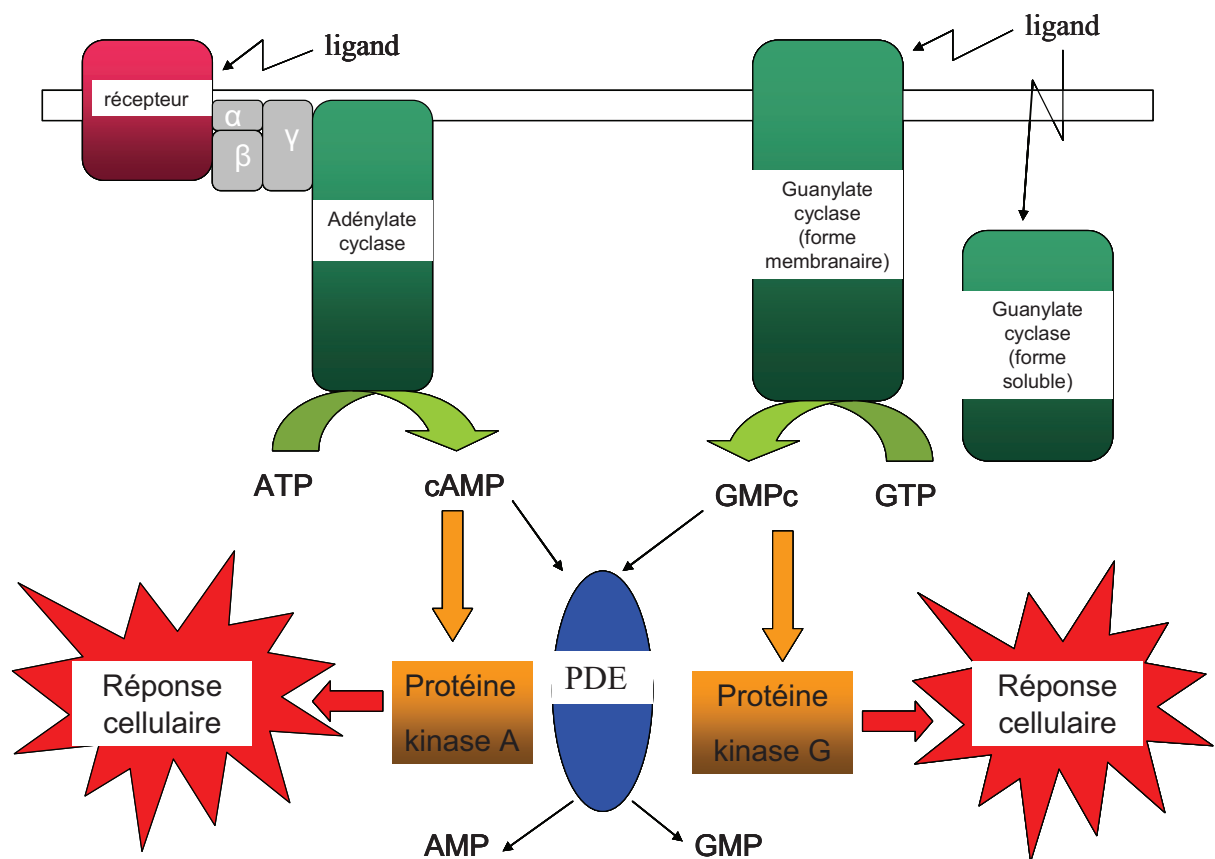
Les étapes principales de la voie de l'AMPc sont décrites dans la figure 1. Les actions cellulaires de l'AMPc sont médiées dans la majorité des cas par la protéine kinase A.

L'événement initial de l'activation de la voie de l'AMPc est la liaison d'un ligand extracellulaire (hormone, peptide, neurotransmetteur...) sur un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Cette interaction qui se fait de façon spécifique et avec une affinité élevée entraîne un changement conformationnel des domaines transmembranaire et cytoplasmique du récepteur. La protéine G est composée de trois sous unités alpha, beta et gamma qui, à l'état inactif, forme un complexe hétérotrimérique dont la sous unité  $G_{\alpha}$  est liée au guanosine diphosphate (GDP).

Lorsqu'un ligand se lie au récepteur à sept domaines transmembranaires, le GDP est libéré permettant ainsi la liaison du GTP à la protéine  $G_{\alpha}$ . Le complexe GTP- $G_{\alpha}$  ainsi formé va se libérer du complexe dimérique  $G_{\beta\gamma}$  et pourra alors activer l'adénylyl cyclase permettant ainsi la conversion de l'ATP en 3'5' AMP cyclique (AMPc). L'AMPc ainsi formé va se lier aux sous unités régulatrices du complexe

## Synthèse bibliographique : la voie de l'AMPc

hétérotétramérique de la protéine kinase A, entraînant une modification allostérique du complexe, ce qui permet la libération des sous unités catalytiques. Les sous unités catalytiques libérées des sous unités régulatrices peuvent alors phosphoryler les résidus sérines des protéines cibles dans différents compartiments cellulaires permettant ainsi de multiples actions cellulaires : activation ou inhibition enzymatique, perméabilité de l'eau et des ions, exocytose, transmission synaptique, contractilité, stéroïdogénèse, glycogénolyse, lipolyse, métabolisme calcique, transcription des gènes impliqué dans le métabolisme et la prolifération... Un prototype de ces protéines cibles de la PKA est au niveau nucléaire le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding).



**Figure 1: Voie schématique des nucléotides cycliques**

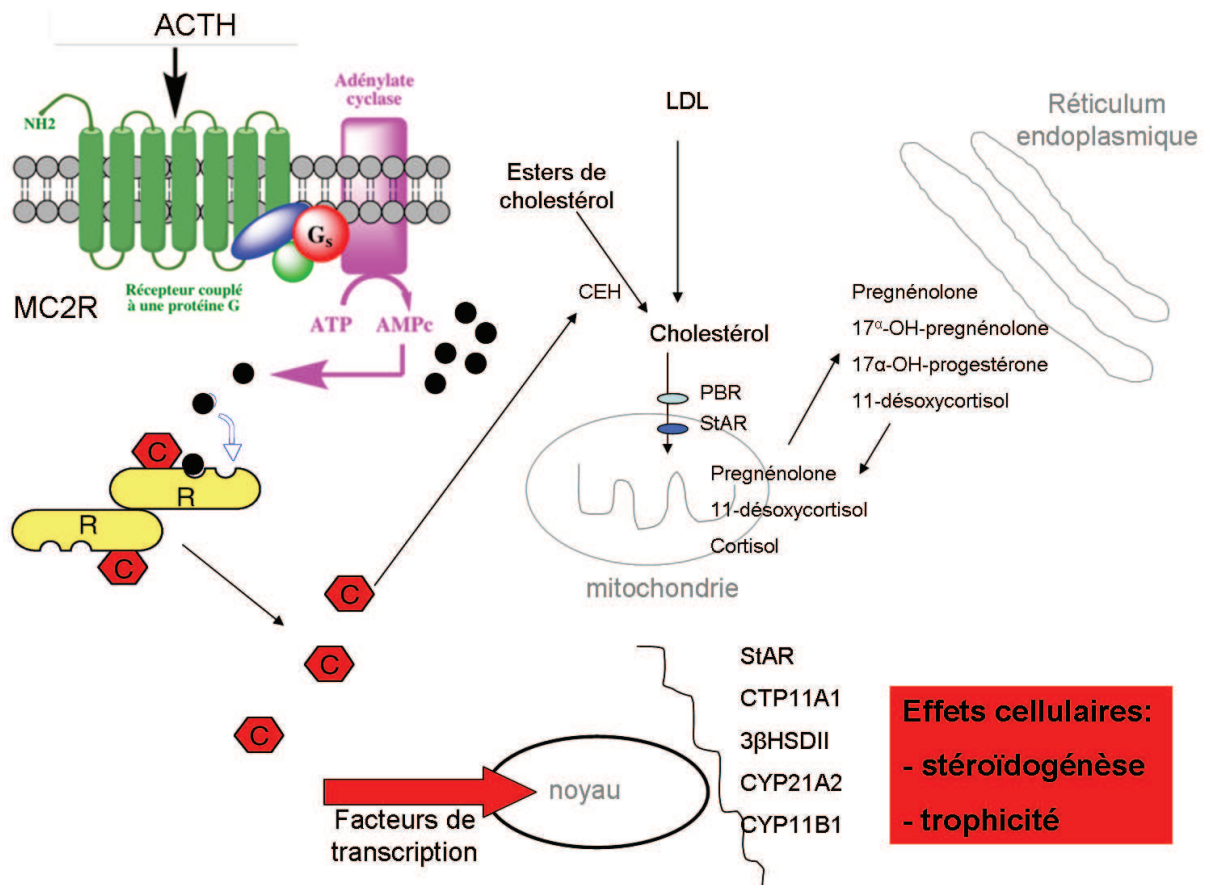
L'activation de la voie de l'AMPc débute par la liaison d'un ligand extra-cellulaire sur un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G. Cela entraîne l'activation de l'adénylyl cyclase permettant ainsi la conversion de l'ATP en AMPc. L'AMPc ainsi formé va se lier aux sous unités régulatrices de la protéine kinase A, ce qui permet la libération des sous unités catalytiques et la phosphorylation les résidus sérines des protéines cibles dans différents compartiments cellulaires permettant ainsi de multiples actions cellulaires. Les phosphodiesterases sont un élément de

régulation important de la voie puisqu'elles permettent la dégradation de l'AMPc en un composé inactif.

## 2 Voie de l'AMPc et stéroïdogénèse

L'ACTH exerce une action biphasique sur la stéroïdogénèse du cortex surrénalien impliquant en particulier l'AMPc (1). Il existe tout d'abord une réponse aigüe avec stimulation de la stéroïdogénèse en quelques minutes (2). Lorsque la stimulation de l'ACTH est prolongée, il existe ensuite une réponse chronique avec stimulation de la biosynthèse des enzymes de la stéroïdogénèse (3). L'activation de la PKA par l'AMPc va conduire à la mobilisation immédiate du cholestérol du compartiment cytoplasmique jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie où est localisé le cytochrome p450<sub>scc</sub> (CYP11A1, desmolase) qui catalyse la première étape de la stéroïdogénèse ou coupure de la chaîne latérale du cholestérol. Cet effet est médié par la protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein), protéine associée à la membrane mitochondriale externe (4, 5) (figure 2). Le transfert intra-mitochondrial de cholestérol dépendant de StAR est une étape limitante de la synthèse des stéroïdes. L'activité de la protéine StAR est rapidement stimulée par les hormones trophiques via la phosphorylation par la PKA d'un résidu sérine conservé chez l'homme et la souris (6). Cela donne à StAR un rôle essentiel dans la phase de réponse aigüe de la stéroïdogénèse.

Le transfert intra-mitochondrial de cholestérol dépend également d'une deuxième protéine, le PBR (peripheral type benzodiazepine receptor). Il est exprimé fortement dans les cellules de la corticosurrénale et son ligand endogène, DBI (Diazepam Binding Inhibitor) stimule son activité et induit la translocation du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne.



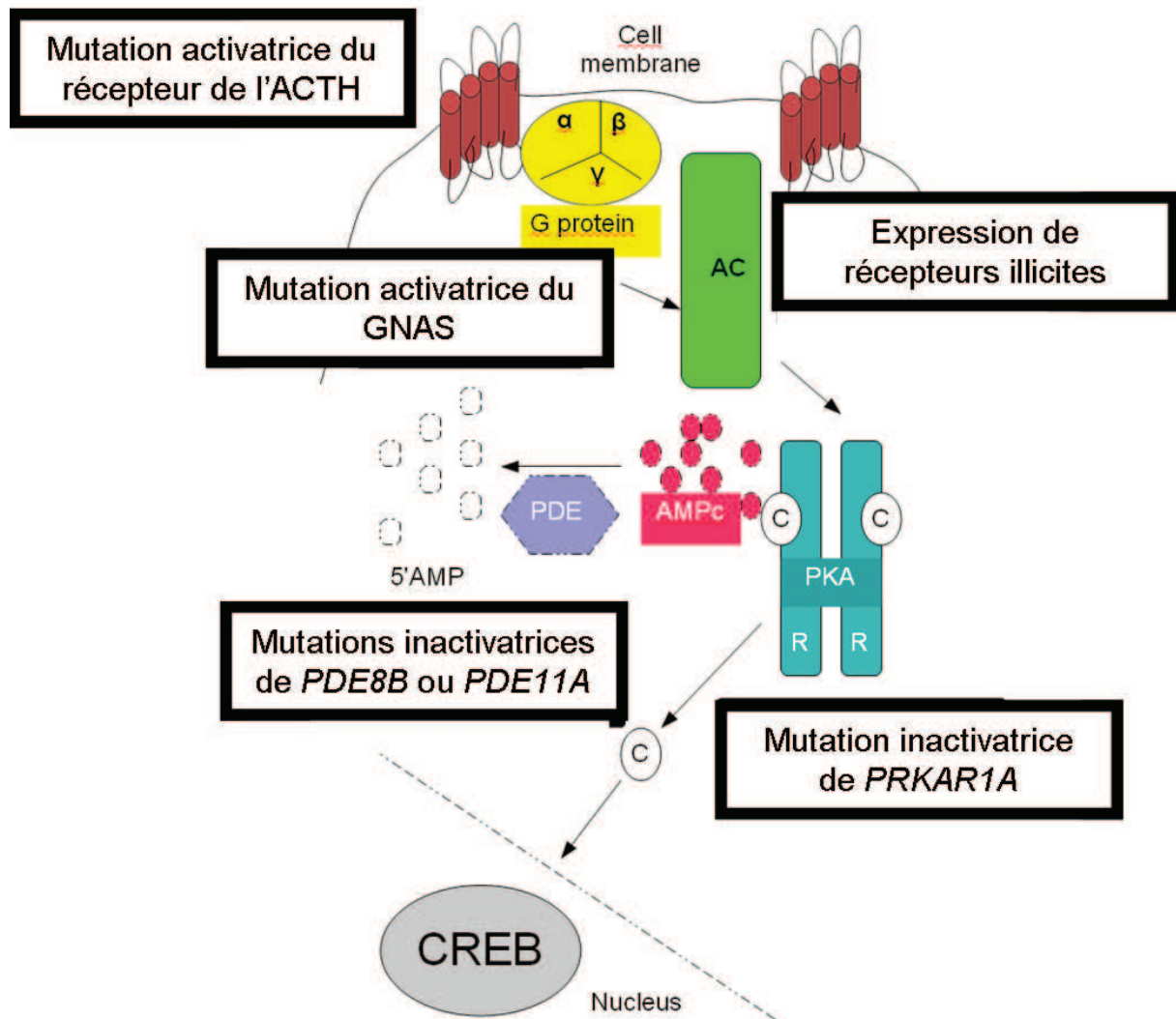
**Figure 2: Action de l'ACTH sur la cellule corticosurrénaliennne**

R = sous unité régulatrice de la protéine kinase A. C = sous unité catalytique de la protéine kinase A. CEH = Cholestérol ester hydrolase. StAR = steroidogenic acute regulatory protein. PBR = peripheral type benzodiazepine receptor.

L'activation de la PKA par l'AMPc va conduire à la mobilisation immédiate du cholestérol du compartiment cytoplasmique jusqu'à la membrane interne de la mitochondrie où est localisé le cytochrome p450<sub>scc</sub> (CYP11A1, desmolase) qui catalyse la première étape de la stéroïdogénèse. Cet effet est médié par la protéine StAR. Le transfert intra-mitochondrial de cholestérol dépend également d'une deuxième protéine, le PBR qui induit la translocation du cholestérol de la membrane mitochondriale externe vers la membrane interne.

### 3 Voie de l'AMPc et tumeurs endocrines

Des anomalies de différents éléments de la voie de l'AMPc conduisant à son activation sont fréquemment retrouvées dans les tumeurs endocrines, notamment les tumeurs surrénales (figure 3).



**Figure 3: Anomalies des acteurs de la voie de l'AMPc dans les tumeurs surrénaliennes**

Dans les tumeurs surrénaliennes, des mutations activatrices du récepteur de l'ACTH, une expression de récepteurs illicites, des mutations inactivatrices de *PRKAR1A*, des mutations inactivatrices de certaines phosphodiésterases ont été mises en évidence.

PDE = phosphodiésterase. PKA = protéine kinase A. AC = adénylyl cyclase. R = sous unité régulatrice de la protéine kinase A. GNAS = gène codant la sous unité α de la protéine G.

Les mutations des récepteurs couplés aux protéines G découvertes dans les tumeurs endocrines sont des mutations activatrices à l'origine d'une stimulation constitutive du récepteur en l'absence de son ligand. Ce sont tout d'abord des mutations somatiques du récepteur de la TSH qui ont été mises en évidence dans

## Synthèse bibliographique : Voie de l'AMPc et tumeurs endocrines

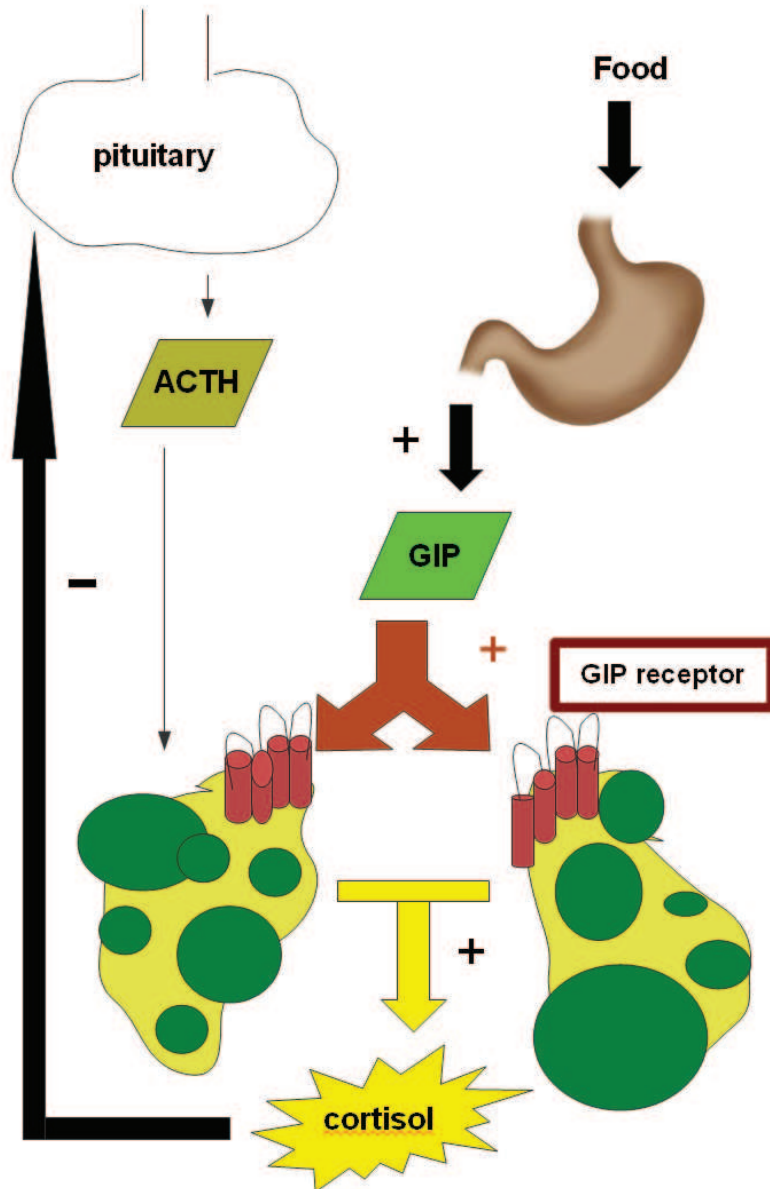
des nodules toxiques de la thyroïde avec une prévalence de 55 à 70 % (7-9). Des mutations germinales activatrices du récepteur de la TSH ont ensuite été identifiées chez des patients présentant une hyperthyroïdie familiale autosomique dominante non auto-immune avec goitre (10).

Des mutations germinales activatrices ou modifiant la spécificité du récepteur de la FSH ont été décrites chez des patientes présentant un syndrome d'hyperstimulation ovarienne de la grossesse (11). Les mutations germinales activatrices du récepteur de la LH sont responsables de puberté précoce masculine familiale avec hyperplasie des cellules de Leydig (12) alors que des mutations somatiques ont été mises en évidence dans les tumeurs des cellules de Leydig (13).

Enfin, une mutation activatrice du récepteur de l'ACTH a été décrite dans une famille présentant un hypercorticisme ACTH indépendant avec hyperplasie des surrénales (14).

Des anomalies au niveau de la protéine G ont également été rapportées. Ainsi, des mutations activatrices de la sous unité alpha de la protéine Gs (gène *GNAS1*) ont été tout d'abord décrites au niveau somatique dans les adénomes somatotropes présentant une forte activité de l'adénylyl cyclase (15). A l'état de mosaïque, elles sont responsables en clinique du syndrome de McCune-Albright. Dans ce syndrome, la sous unité G $\alpha$  est bloquée à l'état actif et stimule en permanence l'adénylyl cyclase et ainsi la production d'AMPc. Ce syndrome est défini par l'association d'une dysplasie fibreuse osseuse multiple, de taches cutanées café au lait et d'une puberté précoce. D'autres hyperactivités endocrines peuvent également être présentes (hyperthyroïdie, acromégalie, syndrome de Cushing ACTH indépendant par hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales, diabète phosphaté par tubulopathie distale).

L'activation de la voie de l'AMPc peut également être secondaire à l'expression d'un récepteur normalement absent (récepteurs ectopiques) ou surexprimé (récepteurs aberrants ou illégitimes). Ces récepteurs ectopiques ou aberrants sont responsables dans la surrénale d'une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales compliqué d'un hypercorticisme ACTH-indépendant dont les caractéristiques cliniques varient en fonction du récepteur aberrant impliqué. Ainsi les récepteurs du GIP (gastric inhibitory peptide), de la sérotonine, de la LH/hCG et le récepteur beta-adrénergique ont été impliqués dans ces hypersécrétions hormonales (16) (figure 4).

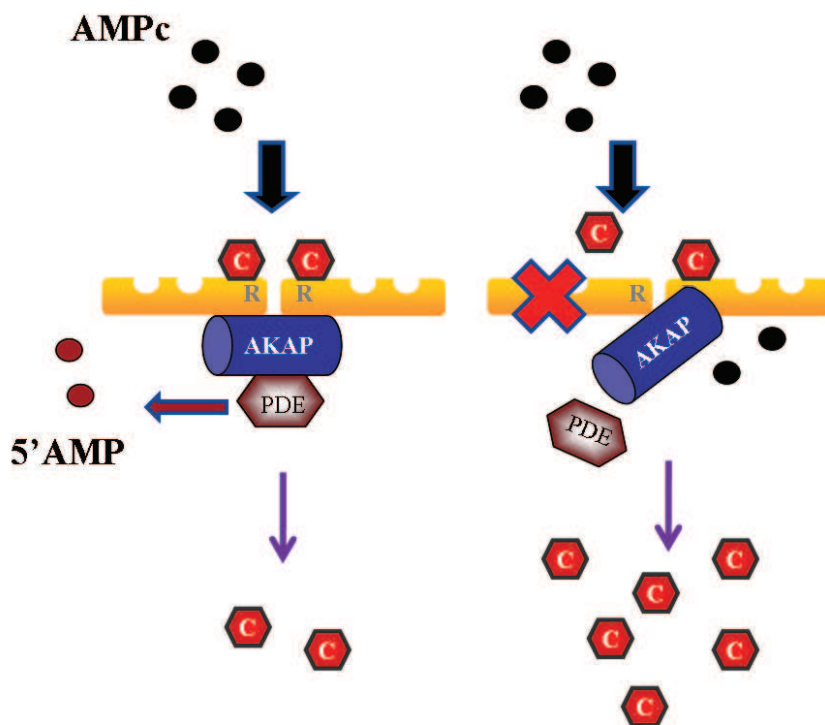


**Figure 4: Physiopathologie d'un syndrome de Cushing ACTH indépendant secondaire à la présence d'un récepteur au GIP surrénalien**

L'activation de la voie de l'AMPc peut également être secondaire à l'expression d'un récepteur normalement absent dans la surrénale tel que le récepteur au GIP (gastric inhibitory peptide). L'expression de ces récepteurs ectopiques sont responsables dans la surrénale d'une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales compliqué d'un hypercorticisme ACTH-indépendant.

Enfin, l'activation de la voie de l'AMPc peut être secondaire à des mutations germinales inactivatrices de *PRKAR1A* chez les patients porteurs d'un complexe de Carney (17, 18) (Vezzosi et al, annexe 3 (19)) (figure 5). Il s'agit d'une maladie à transmission autosomique dominante caractérisée par l'association de multiples

atteintes endocrines et non endocrines. La dysplasie micronodulaire bilatérale pigmentée des surrénales responsable de syndrome de Cushing ACTH indépendant est l'atteinte endocrine la plus fréquente du complexe de Carney (60%). Les autres atteintes endocrines rencontrées dans ce complexe sont les tumeurs thyroïdiennes bénignes ou malignes, les adénomes hypophysaires le plus souvent somatotropes, les tumeurs gonadiques telles que les tumeurs calcifiées des cellules de Sertoli ou des tumeurs ovariennes. Les atteintes non endocrines sont également fréquentes telles que les myxomes cardiaques, mammaires, muqueux ou cutanés, les lésions cutanées pigmentées telles que la lentiginose ou les naevus bleus ou enfin les schwannomes mélanocytaires.



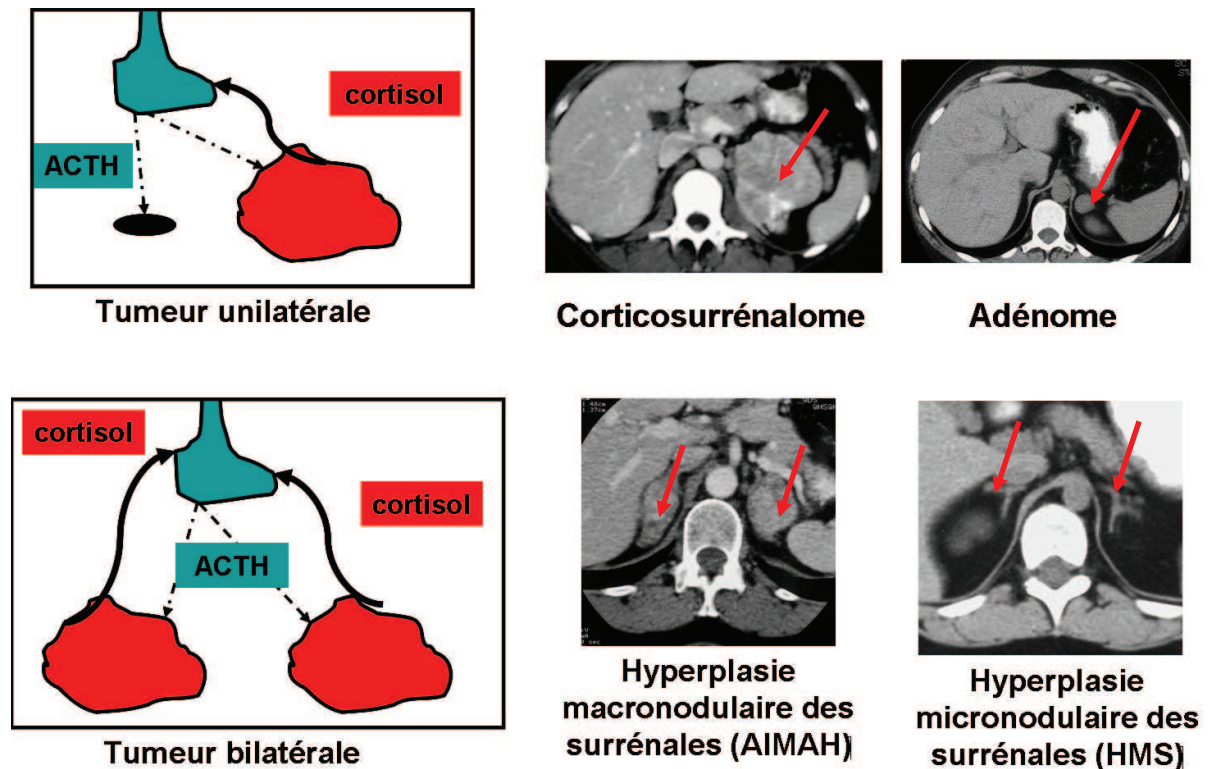
**Figure 5: Physiopathologie du complexe de Carney.**

La présence d'une mutation inactivatrice de la sous unité régulatrice R1A est responsable d'un défaut de liaison de la sous unité catalytique à la sous unité régulatrice. Cela entraîne par conséquent une stimulation continue de la voie AMPc/PKA.



## 4 Les tumeurs de la corticosurrénale

Les tumeurs de la corticosurrénale peuvent être bénignes ou plus rarement malignes, unilatérales ou plus rarement bilatérales, non sécrétantes ou plus rarement sécrétantes (figure 6). Les tumeurs de la corticosurrénale sont fréquentes puisqu'on les retrouve chez plus de 7% des sujets de plus de 50 ans (20, 21). Dans la grande majorité des cas, la découverte des lésions corticosurrénales non sécrétantes se fait de façon fortuite, à l'occasion d'imageries réalisées pour une symptomatologie n'ayant aucun rapport avec la lésion surrénalienne. On parle alors d'incidentalome surrénalien.



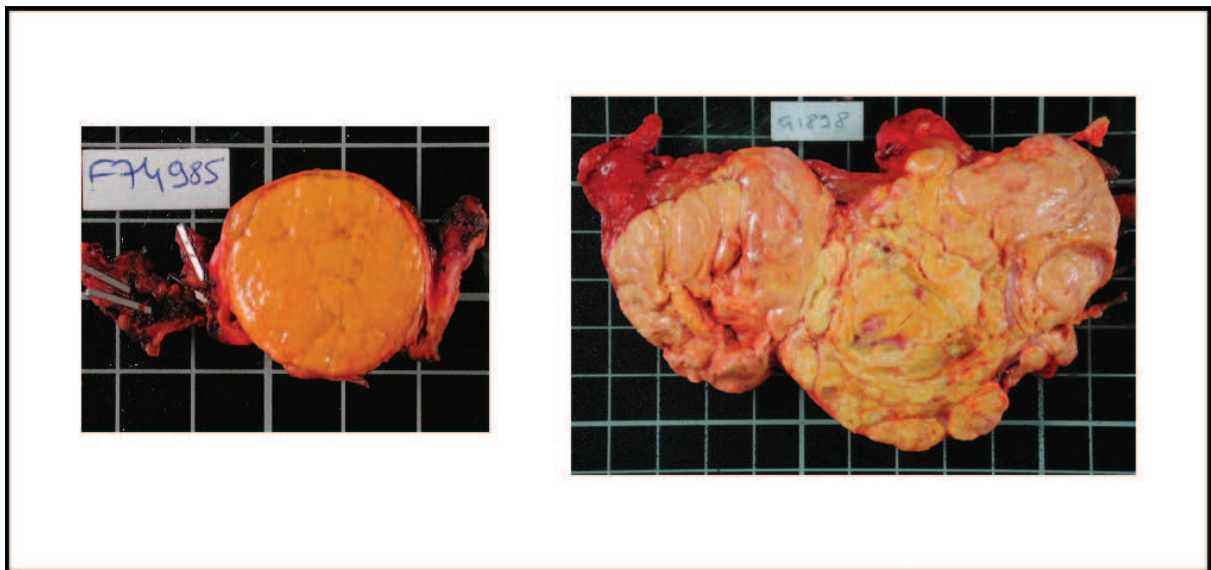
**Figure 6: Imagerie des tumeurs surrénaliennes**

Les tumeurs de la corticosurrénale peuvent être bénignes (adénome, hyperplasie micro ou macronodulaire bilatérale des surrénales) ou plus rarement malignes (corticosurréalome), unilatérales (adénome ou corticosurréalome) ou plus rarement bilatérales (hyperplasie micro ou macronodulaire bilatérale des surrénales), non sécrétantes ou plus rarement sécrétantes.

## 4.1 Les lésions bénignes de la corticosurrénale

### 4.1.1 L'adénome corticosurrénalien

L'adénome de la corticosurrénale est une tumeur bénigne développée à partir du cortex de la surrénale. Dans sa forme typique, l'adénome est une lésion unique de petite taille (figure 7). Il est non sécrétant dans la majorité des cas. La prévalence exacte de l'adénome bénin non sécrétant est difficile à établir, mais peut être appréciée à partir des études sur les incidentalomes surrénaliens. La prévalence de ces incidentalomes varie ainsi entre 1 et 7% en fonction des séries et des tranches d'âge étudiées (22, 23). La grande majorité de ces incidentalomes sont des adénomes bénins non sécrétants, qui ne nécessitent le plus souvent qu'une simple surveillance.



**Figure 7: Aspects macroscopiques d'un adénome surrénalien (image de gauche) et d'un corticosurréalome (image de droite)**

(F. Tissier, laboratoire d'anatomopathologie, CHU Cochin)

Un adénome surrénalien est le plus souvent macroscopiquement une tumeur homogène, jaunâtre, de petite taille, pesant moins de 50 g. Un corticosurréalome est le plus souvent une volumineuse tumeur lobulée présentant des remaniements nécrotiques étendus.

L'adénome sécrétant du cortisol est responsable d'un tableau clinique appelé syndrome de Cushing. Celui-ci comprend une répartition facio-tronculaire des

grasses, une atrophie cutanée avec troubles de la cicatrisation, des vergetures larges et pourpres, une érythrose faciale, une amyotrophie prédominant au niveau des ceintures, des troubles psychiques, une hypertension artérielle, un diabète, une ostéoporose, une prédisposition aux infections opportunistes, et chez la femme un hirsutisme et des troubles de cycles (figure 8).



**Figure 8: Caractéristiques sémiologiques d'un syndrome de Cushing clinique**

Le syndrome de Cushing clinique comprend en particulier une répartition facio-tronculaire des graisses, une atrophie cutanée avec troubles de la cicatrisation, des vergetures larges et pourpres, une érythrose faciale, une amyotrophie prédominant au niveau des ceintures.

L'adénome corticosurrénalien responsable d'un syndrome de Cushing franc, est cependant rare. Son incidence est estimée entre 0.6 et 2 cas par million et par an. Cette différenciation entre adénome sécrétant et non sécrétant est utile en pratique clinique pour décider de la prise en charge. En effet, un traitement est nécessaire pour les adénomes sécrétants alors qu'une simple surveillance est nécessaire pour les adénomes non sécrétants. Cependant, cette classification est probablement un peu inexacte. Il existe sans doute un continuum entre adénomes non sécrétants et sécrétants. Il existe ainsi probablement un nombre non négligeable d'adénomes mis en évidence chez des patients n'ayant pas un tableau clinique franc

d'hypercortisolisme mais présentant des anomalies biologiques discrètes en faveur d'une discrète autonomie de la sécrétion de cortisol. On parle alors de syndrome de Cushing infra-clinique.

Certains adénomes peuvent également sécréter des androgènes ou des œstrogènes. Il s'agit cependant d'observations exceptionnelles. En effet, les tumeurs sécrétant des hormones sexuelles sont le plus souvent malignes. Chez la femme, les symptômes observés sont en rapport avec un excès d'androgènes, c'est à dire un hirsutisme, une aménorrhée et/ou une virilisation. Chez l'homme, les symptômes observés sont en rapport avec un excès d'œstrogènes, c'est à dire une gynécomastie et/ou une impuissance.

Enfin, nous ne parlerons pas des adénomes produisant de l'aldostérone (encore appelés adénomes de Conn) qui forment un sous-groupe à part et sont responsables d'une hypertension artérielle et d'une hypokaliémie.

#### **4.1.2 L'hyperplasie corticosurrénalienne**

L'hyperplasie bilatérale des surrénales peut être micronodulaire lorsque les nodules surrénaux mesurent moins de 1 cm ou macronodulaire lorsqu'ils mesurent plus d'1 cm.

L'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales est une étiologie rare de syndrome de Cushing ACTH-indépendant puisqu'elle représente moins de 1% des causes d'hypercortisolisme (24, 25). La fréquence de l'affection est similaire dans les deux sexes et l'hypercortisolisme est souvent diagnostiqué au cours de la cinquième ou sixième décennie (24). Il s'agit le plus souvent de syndrome de Cushing modéré qui contrastent avec l'importance de l'hypertrophie surrénalienne.

L'hyperplasie micronodulaire bilatérale pigmentée des surrénales est encore plus rare. Les surrénales ont alors un aspect particulier avec des lésions infracentimétriques pigmentées. Elle s'intègre le plus souvent dans un complexe de Carney dont nous avons brièvement détaillé les principales caractéristiques dans le paragraphe précédent. Ces hyperplasies micronodulaires peuvent également être isolées dans certains cas. Cela reste cependant exceptionnel.

### 4.1.3 Les lésions malignes de la corticosurrénale

Le corticosurréalome est une tumeur maligne développée aux dépens du cortex surrénalien (figure 7). Il s'agit d'une tumeur rare, représentant moins de 0.1% de l'ensemble des cancers, dont l'incidence est estimée à 1 par million d'habitants. Un pic d'incidence est observé chez l'enfant et surtout chez l'adulte autour de la 4<sup>ème</sup>-5<sup>ème</sup> décennie. Il est plus fréquent chez la femme avec un sex ratio de 1.5. Il est classiquement suspecté devant une présentation clinique rapidement évolutive, la présence de sécrétions hormonales telles que l'oestradiol chez l'homme, ou l'élévation couplée du cortisol et des androgènes. De plus le scanner surrénalien est considéré suspect lorsqu'elle montre une tumeur de plus de 5 cm, de densité supérieure à 10 UH avant injection sans évacuation du produit de contraste de plus de 50% (figure 6). Bien évidemment une extension ganglionnaire au niveau de la veine cave inférieure ou la présence de métastases à distance signent la malignité. Le pronostic de ces lésions dépend essentiellement du stade et de la résécabilité de la tumeur. En cas de tumeur résécable lors du diagnostic, la survie à 5 ans est estimée entre 11 et 55% alors que l'histoire naturelle montre une survie de moins de 1 an lorsque la tumeur n'est pas jugée résécable lors du diagnostic initial. En plus de la chirurgie, des traitements médicamenteux peuvent également avoir un intérêt avec essentiellement le mitotane (26).

## 5 Les phosphodiésterases

Les niveaux d'AMPc et de GMPc sont déterminés par la balance entre leur synthèse par les adénylyl ou des guanylyl cyclases et leur dégradation par les phosphodiésterases (PDEs). Certes, l'AMPc et le GMPc peuvent être transportés hors de la cellule de façon directe mais les PDEs sont le seul mécanisme permettant de diminuer de façon rapide la concentration intracellulaire des nucléotides cycliques (figure 9). Ainsi, les PDEs catalysent l'hydrolyse du phosphate cyclique lié à l'AMPc et au GMPc afin de générer les catabolites inactifs, 5'-AMP et 5'-GMP. Les PDEs sont présentes dans toutes les cellules et sont soit statiques, soit mobiles (27). Des

## Synthèse bibliographique : Les phosphodiesterases

microcompartiments intracellulaires avec un niveau finement régulé d'AMPc ou GMPc sont ainsi créés grâce à ces PDEs.

A ce jour, onze familles de PDEs ont été décrites chez les mammifères (vezzosi d et al, annexe 1 (28)). Ces onze familles proviennent de 21 gènes et ont été classées ainsi en raison de similarités dans les séquences d'acides aminés, dans le type de régulation et dans les caractéristiques catalytiques. La diversité des PDEs est fondée non seulement sur la présence de multiples promoteurs pour chacun des gènes, avec une régulation différente pour chacun d'entre eux mais également sur la présence d'un épissage alternatif. Ainsi, plus de 50 PDEs sont responsables chez les mammifères de l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc (29, 30). La nomenclature utilisée pour nommer ces PDEs est la suivante. On utilise tout d'abord un chiffre ou nombre arabe pour désigner la famille de la PDE, puis une lettre pour désigner le sous type de gène et enfin, un chiffre arabe pour spécifier l'isoforme (31). Ainsi, PDE1A2 correspond à la famille 1 des PDEs, le sous type A et l'isoforme 2.

La plupart des cellules contient plus d'une famille de PDE, avec cependant des niveaux, des proportions et des localisations subcellulaires de ces PDEs différents en fonction du type cellulaire.

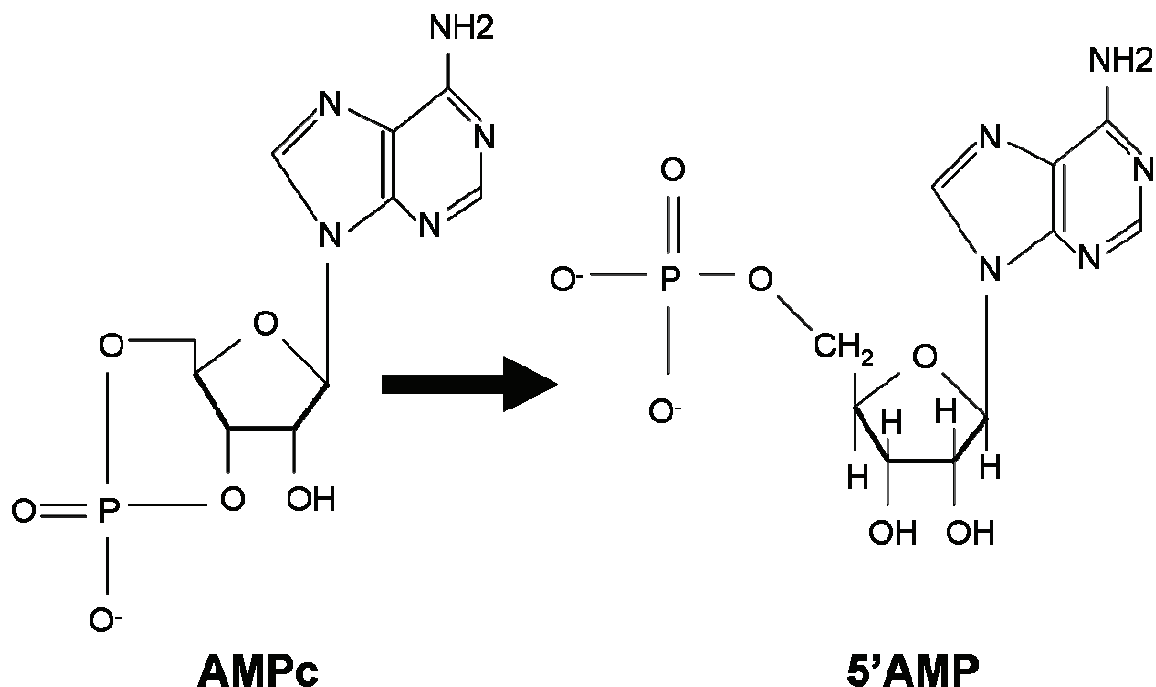
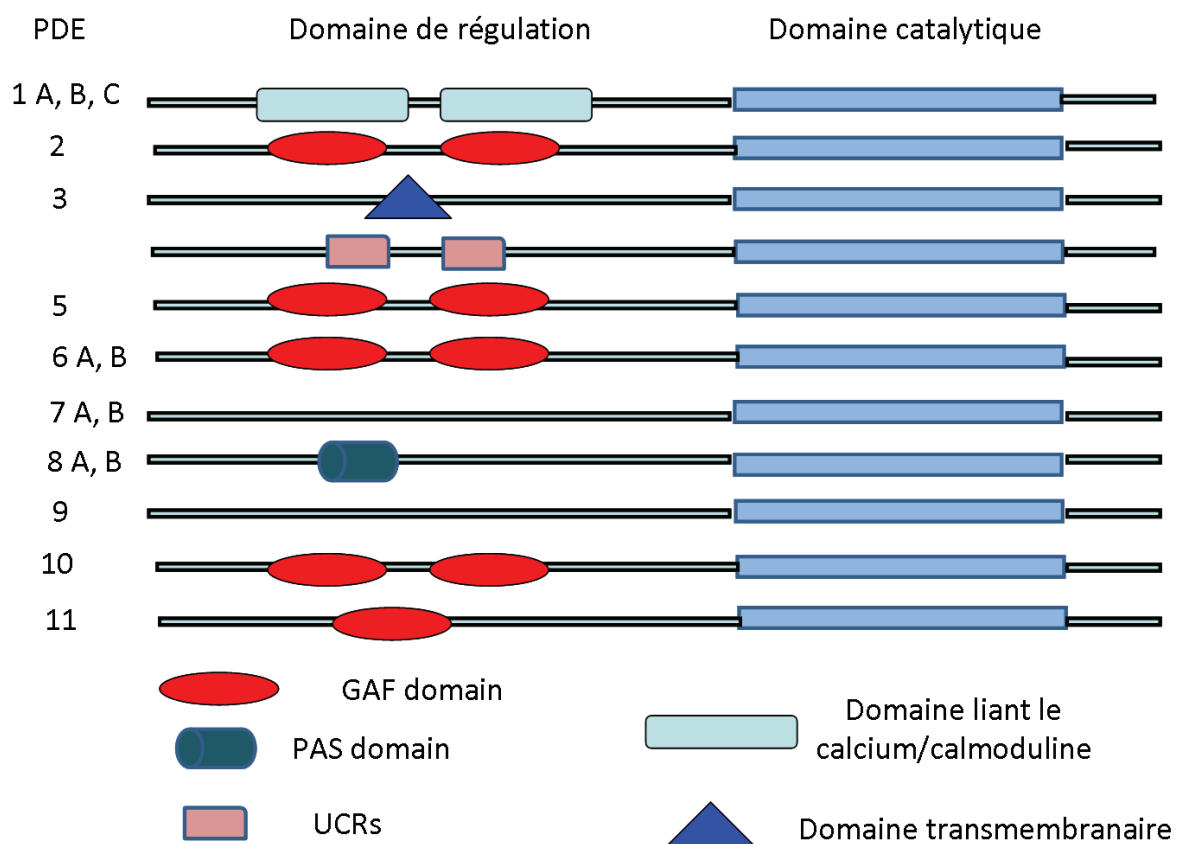


Figure 9: Transformation de l'AMPc en 5'AMP par les phosphodiesterases

## 5.1 Structure des PDEs

La structure cristallographique de 9 PDEs (PDEs 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9 et 10) a été déterminée.

Les PDEs sont composées d'un domaine catalytique très conservé d'environ 270 acides aminés et d'un domaine de régulation NH2-terminal dont la séquence d'acides aminés est très différente en fonction des PDEs (figure 10). Des exceptions existent cependant avec, par exemple la présence de domaines de régulation dans la partie C-terminale de PDE4.



**Figure 10: Structure schématique des 11 familles des PDEs**

Les PDEs sont composées d'un domaine catalytique très conservé et d'un domaine de régulation NH2-terminal dont la séquence d'acides aminés est très différente en fonction des PDEs.

## 5.1.1 Le domaine catalytique

### 5.1.1.1 Généralités

Le domaine catalytique des PDEs est composé de 15 à 17 hélices alpha proches du domaine C-terminal (figure 11). Il correspond à un domaine très conservé des PDEs ayant une homologie de séquence variant entre 25 et 52%. Cette homologie de séquence ne signifie cependant pas une similarité de fonction. Ainsi, PDE5, 6 et 11 ont des séquences proches. Leurs préférences et leurs affinités pour les différents substrats ainsi que leurs propriétés respectives sont cependant très différentes. Inversement la préférence pour le substrat n'est pas synonyme d'homologie de structure. Ainsi, la structure cristallographique de PDE9, une PDE spécifique du GMPc, est plus proche de PDE4, une PDE spécifique de l'AMPc que des autres PDEs spécifiques du GMPc (32).

Le domaine catalytique contient en particulier 17 acides aminés invariants localisés pour la plupart dans la poche catalytique (33).

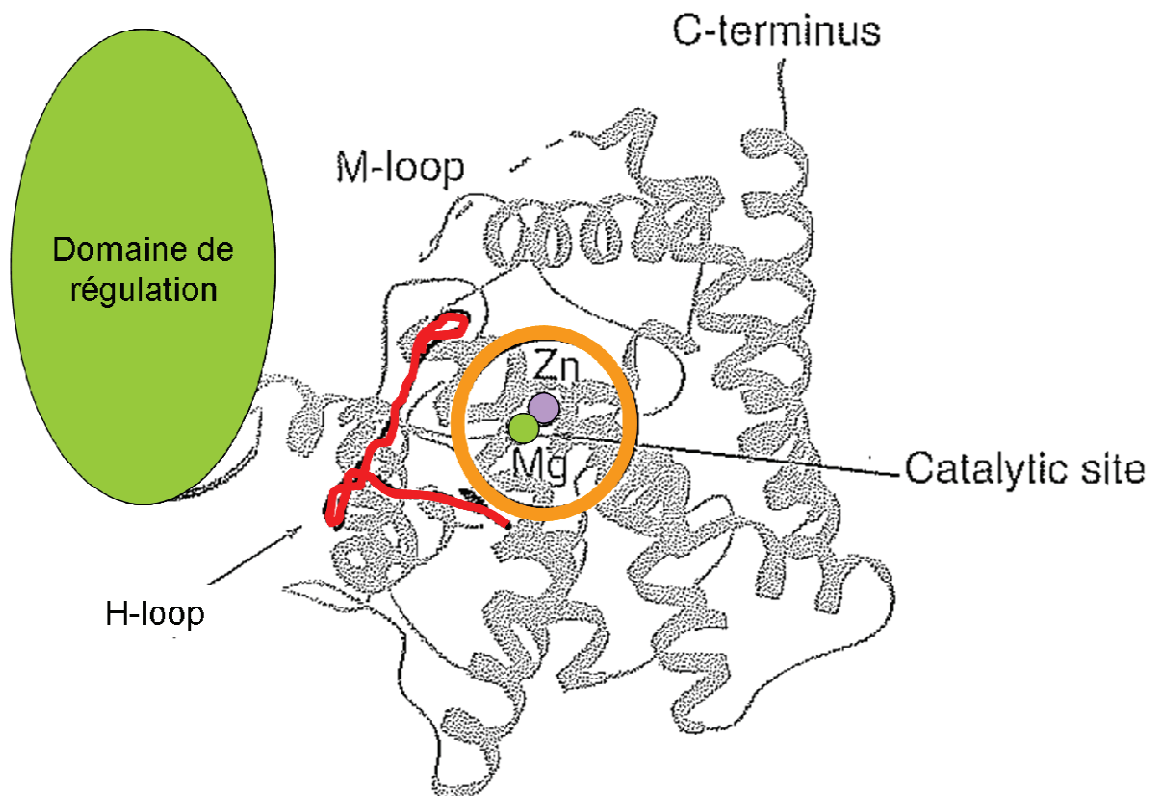


Figure 11: Structure du domaine catalytique des PDEs



## Synthèse bibliographique : Les phosphodiesterases

Le domaine catalytique des PDEs est composé de 15 à 17 hélices alpha proches du domaine C-terminal. La poche catalytique a un rôle clé dans la fonction catalytique des PDEs.

### 5.1.1.2 La poche catalytique

La poche catalytique est créée par la juxtaposition de 3 domaines protéiques (33). Elle a un rôle clé dans la fonction catalytique des PDEs. Elle contient en effet des éléments responsables de l'hydrolyse de l'AMPc et du GMPc ainsi que des domaines spécifiques à chaque PDEs déterminant l'affinité aux substrats de chaque PDE et leurs réponses aux inhibiteurs.

Deux régions de cette poche sont particulièrement impliquées dans la fonction catalytique : 1) une région interagissant avec la purine des nucléotides cycliques 2) une région riche en histidine siège non seulement de la formation du résidu hydroxyl mais également de la catalyse. Cette région est constituée d'un site liant les ions métaux. Nous détaillerons succinctement ces deux régions.

#### a Région liant la purine des nucléotides cycliques

Cette région responsable de la liaison avec les purines des nucléotides cycliques contient une glutamine et une poche hydrophobique.

La poche hydrophobique est constituée : 1) d'un résidu aromatique conservé (correspondant à une phénylalanine pour la plupart des PDEs). Ce résidu entre en contact avec la purine des nucléotides cycliques. 2) de résidus aliphatiques ou hydrophobes.

La poche hydrophobique est ainsi capable de réaliser une poche hydrophobe autour des substrats ou des inhibiteurs. L'importance de cette poche hydrophobe a été particulièrement bien mise en évidence pour PDE5. Ainsi une mutation au niveau d'un résidu important de cette poche entraîne une perte d'affinité de près de 60 fois pour le GMPc, et de 70 à 90 fois pour les différents inhibiteurs (34).

## b Site liant les ions métaux

La plupart des PDEs possèdent un site capable de lier deux ions métaux (figure 10).

Le zinc se fixe sur une partie de ce site, appelé Me-1. Cette fixation du zinc est retrouvée pour toutes les PDEs, à l'exception de PDE3. La présence d'un ion zinc est essentielle pour la fonction catalytique de la plupart des PDEs. L'affinité de ce site pour le zinc varie cependant en fonction des PDEs. La liaison du zinc sur le site Me-1 implique 2 histidines et 2 résidus d'acide aspartique. Les 2 histidines et un des acides aspartiques sont localisés dans le domaine riche en histidine du domaine catalytique alors que le second acide aspartique est situé dans le domaine C-terminal. Une substitution dans les deux histidines ou dans l'acide aspartique du domaine C-terminal est responsable d'une perte majeure de la fonction catalytique. Une modification des autres résidus entraîne une diminution plus modérée de la fonction catalytique.

L'identité du second ion métal n'a pas été déterminée pour toutes les PDEs. Le magnésium, capable de se lier sur la deuxième partie du site, nommé Me-2 pourrait avoir un rôle important dans la régulation de certaines PDEs (35). L'affinité du site pour le magnésium est variable en fonction de l'état conformationnel des PDEs, et donc en fonction de la compartimentation intra-cellulaire de la PDE (35, 36).

La liaison d'un ion métal sur le site Me-2 implique un des acides aspartiques du site Me-1 associé à 5 molécules d'eau (33). Dans la mesure où la liaison de l'ion métal dépend sur le site Me-2 d'un seul acide aspartique, la liaison à l'ion métal est plus faible sur le site Me-2 que sur le site Me-1.

### 5.1.1.3 Résidus invariants dans la fonction catalytique des PDEs

L'importance des acides aminés conservés dans le domaine catalytique des PDEs est bien établie (33). Certains de ces résidus invariants ont un rôle essentiel dans la liaison des ions métaux. Ainsi, une glutamine, une phénylalanine et une tyrosine ont un rôle clé en liant les substrats dans une certaine orientation facilitant ainsi leur hydrolyse. Ces résidus ont également un rôle important dans la liaison des

inhibiteurs des PDEs. Le rôle des autres acides aminés du domaine catalytique semble plus modeste (34, 37-39).

La boucle H qui adjoins le site liant le métal débute avec une glycine invariante. Elle a un rôle essentiel dans les interactions avec les substrats et les inhibiteurs (32, 33, 40-44). L'insertion de la boucle H dans le domaine catalytique semble être un élément déterminant dans les mécanismes d'autoinhibition (42).

L'hypothèse d'une poche S (« substrate specificity pocket ») a également été avancée (45). Cette poche S n'est pas identique pour toutes les PDEs.

#### 5.1.1.4 Autres sites spécifiques

Certaines PDEs ont des régions spécifiques permettant leur insertion dans les membranes. Ainsi le domaine C-terminal des sous unités catalytiques des PDE6 est modifié par des mécanismes d'isoprenylation, de protéolyse et de carboxyméthylation permettant ainsi l'introduction de composés hydrophobes liant ainsi PDE6 aux photorécepteurs.

### 5.1.2 Le domaine N-terminal

A la différence du domaine catalytique, le domaine N-terminal des PDEs varie beaucoup d'une PDE à l'autre (figure 9). Des domaines protéiques particuliers impliqués dans la régulation des PDEs sont retrouvés cette partie N-terminale. Ainsi des domaines liant calcium/calmodulin sont retrouvés dans les PDE1, des domaines GAF dans les PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 et PDE11, des domaines PAS (Per-ARNT-Sim) dans les PDE8, des domaines UCR (upstream conserved regulatory) dans les PDE4. Les domaines de régulation GAFs et UCR, deux domaines essentiels pour les PDEs sont spécifiques des PDEs et ne sont pas retrouvés dans d'autres protéines des mammifères.

Le domaine N-terminal a en particulier un rôle important dans un moyen de régulation important des PDEs, l'autoinhibition. L'autoinhibition est basée sur le fait que la plupart des PDEs ont une activité plus ou moins importante en fonction de la phosphorylation de la PDE ou de changement structurel. Il a ainsi été montré que si

le domaine N-terminal était supprimé, l'activité hydrolytique des PDEs était augmentée (31). L'autoinhibition des PDEs implique donc le plus souvent la portion N-terminale de la PDE même si le domaine C-terminal (46-48) ou le domaine catalytique peuvent avoir un rôle pour certaines PDEs (48-50).

### 5.1.2.1 Les domaines UCRs

Les domaines UCRs (Upstream Conserved Region) sont présents dans le domaine NH<sub>2</sub>-terminal des PDE4. Ils régulent les fonctions de PDE4 soit par un mécanisme direct, soit via la présence de protéines hétérologues (47, 48, 51-53). Ils peuvent également jouer un rôle dans l'oligomérisation de PDE4.

### 5.1.2.2 Les domaines GAFs

Des domaines GAFs sont présents dans les PDEs 2, 5, 6, 10 et 11. Les domaines GAFs ont été au départ identifiés dans la plupart des protéines bactériennes (54, 55). L'acronyme GAF vient des premières protéines dans lesquelles, ces domaines ont été identifiés : cGMP-phosphodiesterases, *Anabaena* adenylyl cyclases et *Escherichia coli* Fh1A. Ces domaines ont un rôle important dans la mesure où ils participent non seulement aux interactions hétérologues protéines-protéines permettant ainsi la liaison aux ligands, mais également aux interactions protéines-protéines au sein des PDEs (56, 57). Ils jouent ainsi un rôle clé dans la dimérisation des PDEs. Ils permettent également la liaison aux nucléotides cycliques (55, 58-60). La liaison des nucléotides cycliques sur le domaine GAF entraîne un important changement conformationnel des PDEs (61, 62). Dans la conformation non liée aux nucléotides cycliques, les domaines GAFs ont des conformations et des stabilités différentes ce qui leur donnent donc des propriétés fonctionnelles différentes (affinité pour le GMPc, sélectivité pour l'AMPc...) (62, 63). Dans la forme liée, la plupart des domaines GAFs liant les nucléotides cycliques peuvent également avoir plusieurs conformations.

Ces domaines GAFs ont enfin des fonctions de régulation. Ils peuvent ainsi lier la sous unité  $\gamma$  inhibitrice de la PDE6. Il est à noter que le domaine GAF impliqué dans

## Synthèse bibliographique : Les phosphodiésterases

l'activation des PDEs diffère en fonction des PDEs, même pour les PDEs très proches sur le plan structural. Ainsi, alors que le domaine GAF-A liant le GMPc a un rôle dans l'activation des PDEs 5 et 6 (57, 61, 62, 64), c'est le domaine GAF-B qui lie le GMPc et qui active la PDE2 (56, 65).

Certains domaines GAFs ont également des rôles d'autoinhibition comme pour le domaine GAF-B de PDE5 (57).

### 5.1.2.3 Les domaines liant la calmoduline

La famille des PDE1 est la seule PDEs des mammifères présentant un complexe calcium/calmoduline et donc régulée par le calcium. Chaque monomère de PDE1 contient ainsi deux sites, proches du domaine N-terminal liant le calcium et la calmoduline. L'activité catalytique de la PDE1 est ainsi en grande partie déterminée par le niveau de calcium intra-cellulaire (66). Il s'agit d'une régulation allostérique réalisée par l'intermédiaire du complexe calcium/calmoduline. Ce complexe calcium/calmoduline permet ainsi un cross-talk entre les voies de signalisation du calcium et celles des nucléotides cycliques.

### 5.1.2.4 Les domaines PAS

Le domaine PAS a été nommé ainsi car il a été identifié pour la première fois dans la protéine PER de la drosophile, dans le facteur de transcription ARNT (aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator) et dans la protéine SIM (single-minded protein) des insectes. Le domaine PAS est présent dans PDE8 et est impliqué dans la régulation allostérique ainsi que dans les interactions protéines/protéines et en particulier dans la liaison au ligand (67, 68).

### 5.1.2.5 Autres domaines

La famille PDE3 présente deux régions nommées NHR1 et NHR2 (NH2-terminal hydrophobic regions) importantes dans la liaison aux structures membranaires (69,

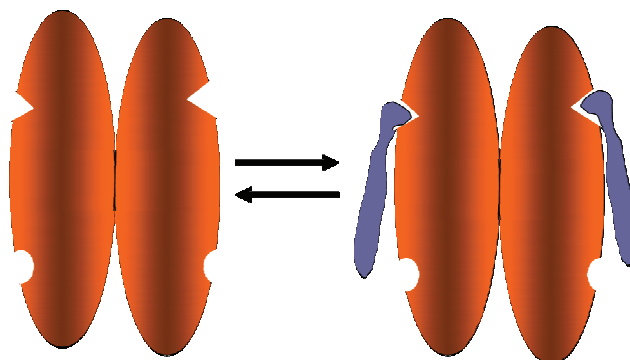
70). Enfin, PDE4A1 contient un domaine N-terminal qui interagit avec l'acide phosphatidique nécessaire à l'insertion membranaire (71).

### 5.1.3 Le domaine C-terminal

La fonctionnalité de l'extrémité C-terminale des PDEs est beaucoup moins connue. Ce domaine pourrait également avoir des fonctions de régulation. Il peut ainsi être phosphorylé par les MAP-kinases (mitogen-activated protein kinase) et contenir des séquences consensus de prénylation utiles dans la liaison des PDEs à la membrane.

## 5.2 Dimérisation des PDEs

La plupart des PDEs sont à l'état d'homodimères à l'exception des PDE1 et des PDE6 qui sont des hétérotétramères (72). Ainsi PDE1 est constitué de 2 sous unités de calmoduline qui interagissent avec 2 sous unités catalytiques (73). PDE6 est constitué de 2 sous unités catalytiques formant un dimère et de 2 sous unités inhibitrices (figure 12) (74, 75).



**Figure 12: Dimérisation de PDE6**

PDE6 est constitué de 2 sous unités catalytiques  $\alpha$  et  $\beta$  formant un dimère (en orange) et de 2 sous unités  $\gamma$  inhibitrices (en gris).

La dimérisation des PDEs implique la région N-terminale pour les PDEs 2, 4, 5, 6 et 10, et/ou des domaines de la région C-terminale pour les PDEs 2, 3, 4, 8 et 11. La dimérisation entraîne pour certaines PDEs (PDE2 ou 4, par exemple) des

mécanismes de régulation tels qu'une phosphorylation, une liaison de ligand ou une auto-inhibition. (42, 47, 52, 76).

Lorsqu'une PDE contient un domaine GAF (PDEs 2, 5, 6 et 10), la dimérisation implique dans la plupart des cas le domaine GAF (56). Le domaine GAF impliqué dans la dimérisation peut aussi bien être le GAF-A que le GAF-B (56, 61, 77). Les PDEs ne possédant pas de domaines GAFs peuvent se dimériser par leurs sous unités catalytiques pour la PDE1 (73) ou par les domaines UCRs pour la PDE4 (36).

## **5.3 Localisation tissulaire des PDEs**

La distribution cellulaire des PDEs est résumée dans le tableau 1.

Les PDEs 1, 2, 3 et 4 ont une distribution tissulaire très large. Les PDEs 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11 ne sont pas aussi largement exprimées. Cela ne veut cependant dire que leur importance est moindre. Une PDE en faible abondance peut avoir un rôle central. Parallèlement ces PDEs peuvent atteindre des concentrations élevées dans certains types cellulaires.

### **5.3.1 PDE1**

Tous les isoformes de PDE1 sont présents dans le système cardio-vasculaire. Leur prévalence est cependant variable en fonction des tissus et des types cellulaires. Le cerveau est également riche en PDE1. Là aussi, l'expression de chacune des isoformes de PDE1 est hautement spécifique non seulement en fonction des régions et des types cellulaires mais également à l'échelle de neurones individuels au sein d'un même tissu (78). PDE1 est également retrouvé dans les cellules du système immunitaire (leucocytes, lymphocytes...) (79-81). Elle est également exprimée dans les testicules en particulier pour les isoformes PDE1A et PDE1C (82) et dans le muscle vésical (83).

Sur le plan endocrine, la PDE1 est présente dans le pancréas, la thyroïde et le follicule ovarien (84).

### **5.3.2 PDE2**

La famille PDE2 est exprimée dans de nombreux tissus. Elle est très exprimée dans le cerveau et en particulier dans les neurones du système limbique, dans l'hypothalamus, le cervelet, le cortex cérébral ainsi que le thalamus (85). Dans le système immunitaire, PDE2 est retrouvée dans les thymocytes et les macrophages (86). Elle est également largement exprimée dans les muscles vasculaires lisses des artères coronaires ainsi que dans l'aorte et dans l'artère mésentérique (87).

### **5.3.3 PDE3**

PDE3A et PDE3B sont coexprimées dans la plupart des cellules mais ont cependant des distributions tissulaires différentes (69, 70, 88-92). Ainsi, PDE3A est exprimée de façon plus importante que PDE3B dans les cellules du système cardiovasculaire (cardiomyocytes, cellules musculaires lisses des vaisseaux...) mais également dans les plaquettes et les ovocytes (92-94) alors que PDE3B est exprimée plus spécifiquement dans les cellules responsables du métabolisme glucidique et lipidique (adipocytes, hépatocytes, cellules beta de Langerhans...).

### **5.3.4 PDE4**

PDE4 est abondante dans le cerveau et en particulier le cervelet (95), dans le testicule (96, 97), dans le follicule ovarien (84).

Toutes les isoformes de PDE4 diffèrent par leur distribution tissulaire (98-103) mais la plupart ont une large distribution tissulaire (98, 104-106).



### **5.3.5 PDE5**

La distribution tissulaire de PDE5 est large. Elle est ainsi exprimée de façon importante dans toutes les cellules musculaires lisses de l'organisme et en particulier dans celles des vaisseaux (107). On la retrouve également dans le poumon, les plaquettes, le rein, les cellules endothéliales des artères pulmonaires, les cellules épithéliales gastro-intestinales, les cellules cérébrales de Purkinje et à des niveaux plus faibles dans les tubules proximaux des reins, les glandes périurétrales de Skene, l'épithélium vaginal, les testicules ainsi que dans les cellules épithéliales des canaux pancréatiques (108-115). On la retrouve enfin dans la prostate (83) et dans le follicule ovarien (116).

### **5.3.6 PDE6**

La PDE6 est la PDE dont l'expression est la plus restreinte. Elle est ainsi presque exclusivement retrouvée au niveau des cônes et des bâtonnets de la rétine à une concentration très élevée (près de 20  $\mu\text{M}$ ) (117). PDE6 est également retrouvée de façon plus anecdotique dans la glande pinéale (118-121).

### **5.3.7 PDE7**

Les membres de la famille de PDE7 sont peu abondants dans la plupart des tissus mais atteignent des concentrations élevées dans la plupart des cellules du système immunitaire (122).

PDE7A1 et A3 ont été retrouvés dans le cerveau, les testicules, la rate, le thymus, le poumon, le rein, le placenta, les lymphocytes et de nombreuses cellules responsables de l'inflammation (123-127). PDE7A2 est principalement retrouvée dans les muscles squelettiques et cardiaques (128).

PDE7B1 est largement retrouvé dans le cœur, le cerveau, la rate, le poumon, les muscles squelettiques et le rein (129) alors que PDE7B2 est particulièrement abondant dans le testicule. Enfin, PDE7B3 est présent dans les muscles squelettiques et cardiaques.

Sur le plan endocrine, les différentes isoformes de PDE7 sont exprimées dans le testicule, l'hypophyse, la thyroïde et à un niveau plus faible dans la surrénale et l'ovaire (130).

### **5.3.8 PDE8**

PDE8A est exprimé de façon intense dans les cellules de Leydig, les ovaires, l'intestin grêle, le colon, le cœur, le foie, la rate, le placenta, le rein, la thyroïde et les cellules bêta-pancréatiques ... (131-135). Elle est également exprimée à un niveau plus faible dans les cardiomyocytes (136), dans les lymphocytes T (124, 137, 138).

L'expression de PDE8B est beaucoup moins ubiquitaire. PDE8B est abondant dans les cellules de la corticosurrénale de la souris (139). Elle est également présente dans les îlots pancréatiques (134). On la retrouve exprimée de façon intense dans la thyroïde et à un moindre degré dans le cerveau, les cellules endométriales et le placenta (135). On la retrouve enfin dans la prostate, le cœur, le rein et les ovaires (135).

### **5.3.9 PDE9**

La distribution tissulaire de PDE9 est relativement large même si l'expression de certains variants est tissu-spécifique. On retrouve ainsi la plupart des variants dans la rate, l'intestin grêle, le cerveau, le colon, la prostate, le rein et le placenta et de façon plus modérée dans le cœur, le pancréas, le poumon, le testicule... (140-142). En revanche, les variants PDE9A11, PDE9A12, PDE9A14 et PDE9A15 sont exprimés de façon spécifique dans les leucocytes, la prostate, les ovaires et le thymus respectivement.

### **5.3.10 PDE10**

La famille des PDE10 est presque exclusivement exprimée au niveau du système nerveux central et plus particulièrement dans une des populations neuronales du striatum (noyau caudé, tubercule olfactif...) (143-146). On la retrouve également,

mais de façon beaucoup plus anecdotique, dans le testicule, l'hypophyse, la surrénale et l'ovaire (143-145, 147).

### 5.3.11 PDE11

PDE11 est abondante dans peu de tissus. On le retrouve essentiellement dans l'hippocampe ventral (148). Elle est également retrouvée de façon importante dans la prostate et dans le muscle squelettique (83). Elle est également présente mais à des taux plus modérés dans les testicules, les glandes salivaires, l'hypophyse, le rein et le foie. Elle est enfin présente dans les surrénales, la glande mammaire, la thyroïde, le pancréas, la trachée... (149).

	Nombre de gènes	Spécificité	Substrats	Localisation subcellulaire	Distribution tissulaire
<b>PDE1</b>	3	Stimulée par Calcium/calmoduline	AMPc, GMPc	Cytoplasme	Cœur, cerveau, poumon, muscle lisse, adipocyte, pancréas
<b>PDE2</b>	1	Stimulée par GMPc	AMPc, GMPc	Membrane et cytoplasme	Surrénale, cœur, poumon, foie, plaquettes, cellules endothéliales, adipocyte
<b>PDE3</b>	2	Sélectif de l'AMPc, inhibée par le GMPc	AMPc>GMPc	Membrane et cytoplasme	Cœur, muscle lisse, poumon, foie, plaquettes, adipocytes, pancréas, immunocytes

## Synthèse bibliographique : Les phosphodiesterases

	Nombre de gènes	Spécificité	Substrats	Localisation subcellulaire	Distribution tissulaire
<b>PDE4</b>	4		AMPc	Membrane	Cerveau, cellules de Sertoli, rein, foie, cœur, muscle lisse, poumon, adipocytes, cellules endothéliales, immunocytes, pancréas
<b>PDE5</b>	1	Activée par le GMPc	GMPc	Cytoplasme	Poumon, plaquette, muscle lisse, cœur, cellules endothéliales, cerveau, testicule
<b>PDE6</b>	3	activée par la transducine	GMPc	Membrane et cytoplasme	Photorécepteurs, glande pinéale
<b>PDE7</b>	2	insensible au rolipram	AMPc	Cytoplasme	Muscle squelettique, cœur, rein, cerveau, pancréas, lymphocytes T
<b>PDE8</b>	2	insensible à l'IBMX et au rolipram	AMPc	Cytoplasme	Testicules, yeux, foie, muscle squelettique, cœur, rein, ovaire, cerveau, lymphocytes T, thyroïde, pancréas, surrénale
<b>PDE9</b>	1	insensible à l'IBMX	GMPc	Cytoplasme et noyau	Rein, foie, poumon, cerveau
<b>PDE10</b>	1		AMPc, GMPc	Cytoplasme	Testicule, cerveau, thyroïde, pancréas

	Nombre de gènes	Spécificité	Substrats	Localisation subcellulaire	Distribution tissulaire
PDE11	1	Double spécificité	AMPc, GMPc	Cytoplasme	Muscle squelettique, prostate, hypophyse, foie, cœur, surrénale, testicule

**Tableau 1: Spécificité et distribution tissulaire et subcellulaire de chacune des PDEs**

## 5.4 Localisation intracellulaire des PDEs

Les concentrations intra-cellulaires des nucléotides cycliques sont finement régulées. De nombreux travaux ont montré que l'AMPc n'est pas uniformément distribué à l'intérieur des cellules. Cette compartimentation aussi bien temporelle que spatiale est nécessaire pour la définition des signaux AMPc générés par des récepteurs distincts au niveau de la membrane plasmique. Cette compartimentation permet de garder une transmission du signal cohérente même si la voie de l'AMPc est activée par plusieurs stimuli simultanés. Ainsi une première observation avait mis en évidence que l'activation des récepteurs bêta-adrénergiques par les catécholamines ainsi que des récepteurs aux prostaglandines par la prostaglandine E1 augmente de façon similaire l'AMPc mais conduit à des effets différents sur des cœurs isolés perfusés (150, 151).

Ce contrôle spatio-temporel de la transduction du signal par les nucléotides cycliques est tout d'abord possible car les différents acteurs de la voie de l'AMPc sont organisés en complexes multiprotéiques, augmentant ainsi l'efficacité et la spécificité de la cascade de transduction. Les A Kinase Anchoring Proteins (AKAPs) jouent un rôle essentiel dans ces arrangements. Elles forment une large famille de protéines de plus de 50 membres dont la principale fonction est de localiser la PKA à proximité de ses substrats, assurant ainsi la phosphorylation préférentielle d'un nombre limité de protéines cibles (152). Ces AKAPs servent également de protéines d'échafaudage pour les autres composants de la signalisation AMPc (phosphatases

1 et 2, facteur d'échange Epac...). Ces complexes régulent donc la concentration des nucléotides cycliques dans chaque compartiment intra-cellulaire.

Cette organisation fine des composants de la voie de l'AMPC apparaît nécessaire mais n'est pas suffisante pour expliquer la spécificité des hormones qui activent cette voie. En effet, étant donné son faible poids moléculaire, l'AMPC généré par la stimulation d'un récepteur donné devrait diffuser très rapidement dans la cellule, et activer l'ensemble de ses cibles. S'il n'en est pas ainsi, c'est que la diffusion de l'AMPC est limitée. L'existence de barrières physiques créées par des structures membranaires spécialisées a été proposée pour expliquer les différences de concentration d'AMPC sous la membrane plasmique et dans le cytoplasme de cellules HEK 293 stimulées par la prostaglandine E1 même si une preuve expérimentale reste à apporter (153). Cependant, d'autres mécanismes permettent de restreindre la diffusion du second messager. Ainsi, le pouvoir tampon des sous unités-régulatrices de la PKA (154, 155) et, surtout l'hydrolyse des nucléotides cycliques par les PDEs jouent un rôle crucial dans la formation de microdomaines dynamiques d'AMPC (152, 156) (figure 13).

Une des premières évidences de la contribution des PDEs à la compartimentation intra-cellulaire de l'AMPC a été apportée par une étude réalisée sur les cœurs perfusés de cobaye. Les effets de l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine), un inhibiteur non sélectif des PDEs et de la milrinone, un inhibiteur de la PDE3, ont été comparés. Alors que ces deux traitements augmentent l'AMPC intracellulaire et produisent des effets inotropes et lusitropes positifs, des différences dans le profil de phosphorylation par la PKA de certaines protéines clés ont été observées (157). Ces résultats ont été attribués à une compartimentation subcellulaire de l'AMPC et des substrats de la PKA, due à une différence d'expression des PDEs à la membrane et dans le cytosol (158). Des études plus récentes ont confirmé ces premières hypothèses (159-161). Ainsi, il a été, en particulier, montré que PDE3 et PDE4 se lient à des récepteurs couplés aux protéines G dans les cardiomyocytes et chacune de ces PDEs inhibent spécifiquement l'augmentation de l'AMPC à différents stimulus (159). Des gradients multiples d'AMPC sont ainsi générés simultanément indépendamment de la distance de l'adénylyl cyclase qui génère la production d'AMPC mais dépendant par contre de la proximité avec les PDEs.

Des anomalies de cette compartimentation intra-cellulaire peuvent générer des pathologies. Ainsi, des mutations ou des polymorphismes génétiques responsables d'anomalies au niveau de ces complexes macromoléculaires peuvent engendrer des pathologies aussi diverses que le syndrome de QT long (162), une prédisposition à l'insuffisance cardiaque (163), des cancers du sein familiaux (164), ou une schizophrénie. Des anomalies plus subtiles de la compartimentation intracellulaire telles que des modifications de la phosphorylation (165), des modifications post-traductionnelles ou altérant la stabilité de la protéine (166) pourraient également être délétères. Ainsi, une diminution de la liaison de la PKA aux AKAPs (167), une délocalisation intra-cellulaire des récepteurs bêta-adrénergiques (155), ou une réorganisation intra-cellulaire des complexes macromoléculaires impliqués dans la signalisation de l'AMPc (168) sont observés dans des myocytes cardiaques provenant de cœurs en insuffisance cardiaque.

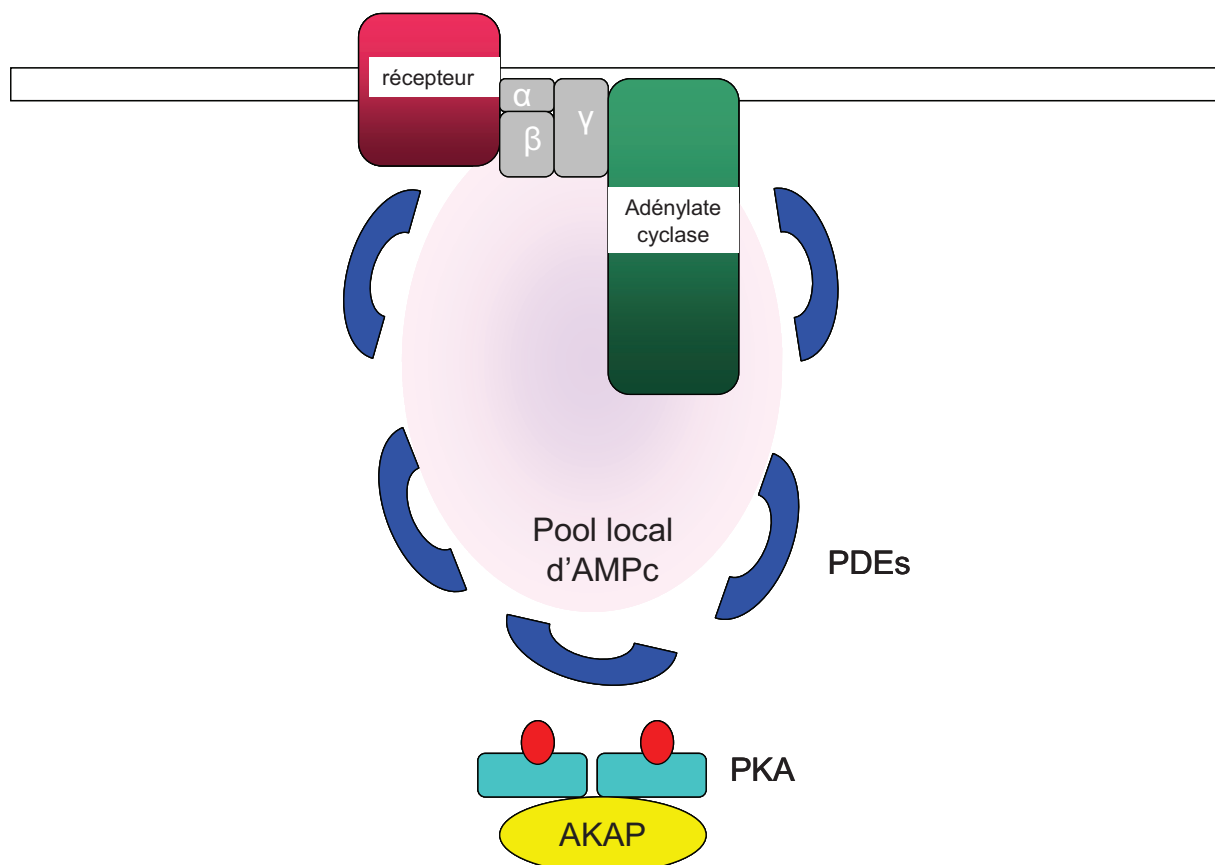


Figure 13: Exemple de compartimentation de l'AMPc grâce aux PDEs

Les PDEs en hydrolysant les nucléotides cycliques jouent un rôle crucial dans la formation de microdomaines dynamiques d'AMPc.

Des thérapeutiques agissant sur cette compartimentation pourraient être intéressantes. Une voie d'avenir pourrait par exemple consister dans le blocage de certaines PDEs ce qui permettrait d'inhiber la formation des complexes macromoléculaires en bloquant l'incorporation des PDEs. Ainsi, un peptide bloquant la liaison de PDE4A5 à la protéine Hsp20 augmente la concentration locale d'AMPc entraînant ainsi une phosphorylation de Hsp20 ce qui permet de diminuer l'hypertrophie de cardiomyocytes isolés (169). Dans une autre étude, le déplacement de PDE4A5 du complexe macromoléculaire formé par PDE4D5/RAK1/FAK par un peptide qui altère spécifiquement la liaison de PDE4D5 à RAK1 diminue le potentiel invasif des cellules dans un modèle de cellules cancéreuses (170). Enfin, l'altération de la liaison PDE4D5 avec la bêta-arrestine dans le complexe macromoléculaire PDE4A5/beta-arrestine/RAK1 entraîne une augmentation de la phosphorylation du récepteur bêta-2-adrénergique (171).

## 5.5 Spécificités et fonctions de chacune des PDEs

Même si de nombreuses avancées ont été réalisées ces dernières années, le rôle exact de chaque PDEs est encore mal défini. En effet, les PDEs intra-cellulaires sont le plus souvent multiples et différent en fonction des espèces, compliquant la compréhension de leur fonction. Les spécificités de chacune des PDEs sont résumées dans le tableau 1.

Les PDEs ont pour rôle principal de diminuer le niveau intracellulaire d'AMPc et/ou de GMPc. Certaines PDEs sont spécifiques de l'AMPc (PDEs 4, 7 et 8), d'autres sont spécifiques du GMPc (PDEs 5, 6 et 9), d'autres enfin, sont capables d'hydrolyser non seulement l'AMPc mais également le GMPc.

Plusieurs mécanismes peuvent être utilisés par les cellules pour diminuer l'AMPc ou le GMPc intracellulaires. L'hydrolyse des nucléotides cycliques en leurs composés inactifs par les PDEs reste cependant le mécanisme le plus souvent employé. Certaines PDEs présentent par ailleurs un domaine GAF (cGMP-binding PDEs, Anabaena adenylyl cyclase, and Escherichia coli Fh1A) capable de séquestrer les nucléotides cycliques les rendant ainsi inactifs (172). Des mécanismes encore



différents sont utilisés dans certaines cellules. Ainsi, le GMPc est capable de sortir des cellules somatiques du follicule ovarien pour aller dans les ovocytes.

### 5.5.1 PDE 1

La famille des PDE1s est activée par la liaison d'un complexe calcium et calmoduline. Les PDE1 hydrolysent non seulement l'AMPc mais également le GMPc. A ce jour 3 isoformes de PDE1 ont été mises en évidence, PDE1A, PDE1B et PDE1C, générées par 3 gènes différents (173). Chacun de ces gènes a des promoteurs alternatifs et subissent un épissage alternatif générant ainsi une multitude d'ARNs et de protéines. Les 3 isoformes de PDE1 ont des propriétés enzymatiques différentes dans la mesure où non seulement leur affinité pour le calcium/calmoduline mais également pour le GMPc et l'AMPc diffèrent. Ainsi, PDE1A est surtout active sur le GMPc et faiblement sur l'AMPc. La PDE1B a une action modérée sur l'AMPc alors que la PDE1C est active sur les 2 nucléotides cycliques.

La famille des PDE1s est activée par la liaison d'un complexe calcium et calmoduline. C'est la seule PDE qui permet la liaison entre la voie du calcium et celle des nucléotides cycliques.

Chaque isoforme est constitué d'un domaine catalytique C-terminal, de 2 domaines N-terminaux liant la calmoduline et d'un domaine inhibiteur situé entre les 2 sites liant la calmoduline. Le domaine inhibiteur est conservé pour toutes les PDE1 et interagit avec un site situé à côté du domaine catalytique permettant ainsi de maintenir l'enzyme dans une conformation inactive. Lorsque le complexe calcium-calmoduline se lie à PDE1, on observe un changement conformationnel permettant une levée de l'inhibition autorisant ainsi une activité enzymatique. Chaque isoforme de PDE1 a une sensibilité différente à l'action du complexe calcium/calmoduline. Une variation dans la séquence des acides aminés dans le domaine N-terminal des isoformes entraîne un changement de séquence dans le premier site liant le calcium/calmoduline modifiant ainsi l'affinité de l'isoforme pour le calcium/calmoduline.

La famille des PDE1 est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et patho-physiologiques. Elle a ainsi un rôle dans la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux (174, 175). Présente en quantité importante dans les cardiomyocytes, elle est également impliquée dans l'hypertrophie cardiaque (66) et l'insuffisance cardiaque (176). PDE1C est également surexprimée dans les artères pulmonaires des patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (177, 178). On retrouve également PDE1B dans les cellules lymphocytaires leucémiques humaines (179). Elle a également un rôle dans la différenciation des monocytes en réponse aux cytokines (180), dans les maladies neurodégénératives (181) et dans certains problèmes comportementaux (182, 183).

### 5.5.2 PDE 2

L'AMPc comme le GMPc peuvent être hydrolysés par la PDE2 avec cependant une affinité 30 fois plus forte pour le GMPc (65). Elle est nommée « la PDE stimulée par le GMPc » dans la mesure où l'hydrolyse de l'AMPc par cette PDE est stimulée de façon importante par la liaison du GMPc sur le domaine de régulation GAF-B (56, 184).

A ce jour, un seul gène PDE2A composé de 31 exons a été identifié. C'est un homodimère de deux monomères composé chacun de deux domaines GAFs suivi d'un domaine catalytique (56).

PDE2 est impliquée dans la production d'aldostérone (185) dans la surrénale. L'effet inhibiteur de l'ANP sur la synthèse de l'aldostérone est ainsi médiée par PDE2. Elle a également un rôle dans le contrôle du niveau de GMPc dans certains neurones (186), l'apprentissage ainsi que l'amélioration de la plasticité neuronale (187-189), le contrôle du GMPc dans les cardiomyocytes (190), la diminution de l'anxiété (191), l'agrégation plaquettaire (192) ainsi que dans le contrôle de la sécrétion hypophysaire de prolactine (193). Elle a également un rôle dans la perméabilité endothéliale, la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF ainsi que dans la prolifération endothéliale (194-199).

### 5.5.3 PDE 3

Les PDE3 ont une affinité très forte pour l'AMPc et le GMPc. Elles sont appelées PDE de l'AMPc inhibée par le GMPc dans la mesure où le GMPc joue le rôle d'inhibiteur compétitif. Le GMPc peut ainsi inhiber l'action de l'AMPc sur le site catalytique et réguler PDE3.

La famille PDE3 est composée de PDE3A et PDE3B codés chacun par deux gènes différents quoique proche sur le plan structural (93).

L'organisation structurelle des protéines PDE3A et PDE3B est identique à celle des autres PDEs avec cependant une spécificité dans la partie conservée du domaine catalytique, un insert de 44 acides aminés qui distingue la famille des PDE3 des autres familles de PDEs. Cet insert est probablement impliqué dans l'interaction des PDE3 avec les substrats et les inhibiteurs.

PDE3A a un rôle dans la maturation ovocytaire. Elle joue également un rôle important dans l'apoptose des cardiomyocytes et dans l'insuffisance cardiaque (200).

PDE3B est la PDE la plus impliquée dans la régulation de la libération de l'insuline.

Elle a également un rôle clé dans la lipolyse et dans la lipogénèse (201) ainsi que dans la consommation de glucose induites par l'insuline (93, 202). La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne une cascade de signalisation permettant la phosphorylation de PDE3B augmentant ainsi son activité. La lipolyse est alors induite par la réduction de l'AMPc et par celle de l'activité PKA. Les souris surexprimant PDE3B développent rapidement une insulino-résistance, une dysfonction des îlots de Langerhans et une intolérance au glucose après une suralimentation (203). L'inhibition de PDE3 ne peut cependant pas être utilisée en thérapeutique pour améliorer l'insulinorésistance. En effet, l'expression de PDE3B est réduite dans le tissu adipeux des souris obèses insulinorésistantes probablement en rapport avec l'induction par le TNF $\alpha$  (204-206).

PDE3B semble également important sur les effets antiglycogénolytiques de l'insuline et de l'IGF1 dans les hépatocytes (207) ainsi que sur les effets stimulateurs du GLP1 et du glucose sur la sécrétion insulinaire des cellules beta (208, 209). L'activation de PDE3B des cellules  $\beta$  de Langerhans a parallèlement un rôle sur les effets inhibiteurs de l'IGF1 (208) et de la leptine (209) sur la sécrétion insulinaire.

PDE3B a également un rôle dans le fonctionnement des cellules endothéliales et en particulier dans l'adhésion, la migration des cellules endothéliales de l'aorte.

Elle est enfin une des principales PDEs impliquée dans l'agrégation plaquettaire et dans la contractilité cardiaque (93, 210).

#### **5.5.4 PDE 4**

La famille des PDE4 hydrolyse de façon spécifique l'AMPc. Quatre gènes de PDE4 ont été identifiées, A, B, C, D chez la plupart des mammifères et codent pour 16 isoformes différentes (211, 212).

PDE4 présente deux régions dans leur partie N-terminale qui n'existent dans aucune autre PDE, les régions upstream conserved sequences (UCRs) 1 et 2. Ces régions sont hautement conservées non seulement chez les vertébrés mais également chez d'autres organismes (la drosophile par exemple) (213). Les sites catalytiques de PDE4 sont régulés par un mécanisme impliquant non seulement l'interaction directe avec une hélice de l'UCR2 mais également avec une hélice du domaine C-terminal.

PDE4 existe sous 3 conformations différentes : 1. une conformation ouverte où les 2 sites catalytiques du dimère sont actifs ; 2. une conformation où les sites catalytiques sont inhibés par une hélice du domaine C-terminal du même monomère ; 3. une conformation dans laquelle une hélice  $\alpha$  de l'UCR2 se lie au domaine catalytique entraînant ainsi un dimère partiellement inactif. Dans cette dernière conformation, le monomère lié à l'UCR2 est inactif alors que l'activité de l'autre monomère est diminuée de plus de 50%.

Plus de 20 isoformes de PDE4 ont été décrits codés par 4 gènes chez l'homme (PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D). Les isoformes codés par chacun de ces gènes peuvent être séparés en formes longues contenant UCR1 et UCR2, en formes courtes contenant seulement UCR2 ou en formes très courtes contenant seulement une partie d'UCR2.

PDE4 a un rôle important dans le contrôle de l'AMPc des myocytes cardiaques. Ainsi, les isoformes de PDE4 contrôlent en particulier la régulation des récepteurs beta-adrénergiques et des différents canaux calciques (76, 214-220). PDE4D est également impliquée dans la perméabilité des cellules endothéliales vasculaires,

dans la mémoire à long terme (221), dans la contraction du muscle lisse de la vessie (83) ainsi que dans le fonctionnement ovarien (83). Ainsi, les souris femelles invalidées en PDE4D ont une infertilité en rapport avec une altération de l'ovulation.

En pathologie, la famille PDE4 a un rôle dans les symptômes associés à la schizophrénie et à la dépression (222).

### 5.5.5 PDE 5

La famille PDE5 contient un seul gène PDE5A qui code pour 3 isoformes, PDE5A1, PDE5A2 et PDE5A3 (114, 223, 224). PDE5A est une PDE spécifique du GMPc. Les protéines PDE5s ont une grande homologie quelle que soit l'espèce. Ainsi, PDE5A1 humaine et bovine ont une homologie de plus de 90% (114).

La régulation de PDE5 dépend au moins en partie de deux domaines d'autoinhibition situés sur PDE5. Son activité est multipliée par 10 et l'affinité pour les ligands ou les inhibiteurs sont augmentés en cas de phosphorylation ou de liaison du GMPc sur son domaine GAF A (107, 225-230). Le domaine GAF-B de PDE5 a également un rôle d'autoinhibition (57).

PDE5 est impliquée dans la contractilité cardiaque (231, 232), dans les fonctions plaquettaires (110), dans les fonctions vasculaires pulmonaires (111, 233), dans le contrôle de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes par l'intestin (109), dans les fonctions neuronales (234), dans la physiologie des fibres de Purkinje (108, 235, 236).

PDE5 a également un rôle important dans le tonus des muscles lisses des corps caverneux (237, 238) ainsi que dans la production de testostérone par les cellules de Leydig (239-242).

### 5.5.6 PDE 6

La famille des PDE6 est essentiellement impliquée dans la perception de la lumière.

Dans les bâtonnets, la PDE6 est composée d'un hétérodimère catalytique ( $\alpha$  et  $\beta$ ) codés par deux gènes distincts, *PDE6A* et *PDE6B*. L'hétérodimérisation des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  se fait par l'intermédiaire de leur domaine GAF-A. En revanche, dans

les cônes, la PDE6 est composée d'un homodimère catalytique  $\alpha'$ , codé par le gène *PDE6C* (243). Les sous unités catalytiques  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\alpha'$  sont composées d'une région N-terminale, de 2 domaines de régulation GAFs, d'un domaine catalytique et d'un domaine C-terminal sujet à l'isoprénnylation (244, 245).

Les PDE6 sont particulières par leur régulation puisque ce sont des sous unités inhibitrices  $\gamma$  qui contrôle l'activité catalytique (246, 247). Ces sous unités  $\gamma$  sont codées par *PDE6G*, pour la sous unité des bâtonnets et par *PDE6H* pour la sous unité des cônes. La sous unité  $\gamma$  inhibitrice est composée de plusieurs domaines : une région riche en proline et une région polycationique qui interagissent avec le site liant le GMPc de PDE6, une région  $\alpha$ -hélicoïdale et enfin des résidus C-terminaux qui se lient au site actif de PDE6.

### 5.5.7 PDE 7

La famille des PDE7 hydrolyse de façon spécifique et avec une affinité élevée l'AMPc. Elle est composée de 2 gènes, *PDE7A* et *PDE7B*. Les domaines catalytiques de PDE7 ont 70% d'acides aminés en commun. Ils diffèrent cependant des domaines catalytiques des autres PDEs dans la mesure où seuls 25 à 40% des acides aminés sont communs avec les autres PDEs.

Trois protéines générées par *PDE7A* ont été décrites : *PDE7A1*, *PDE7A2* et *PDE7A3*. *PDE7A1* est capable d'inhiber la voie de l'AMPc non seulement en dégradant l'AMPc mais également par inhibition directe de la PKA (248). Elle semble avoir un rôle majeur dans la prolifération des cellules T.

*PDE7A3* est le plus souvent exprimée dans les mêmes cellules que *PDE7A1* et semble restreindre la capacité de *PDE7A1* à se lier à la sous unité catalytique de la PKA.

Les transcripts de *PDE7B* semblent en particulier avoir un rôle dans la régulation négative de la transmission dopaminergique dans les neurones du striatum du rat (249).

### **5.5.8 PDE 8**

La famille PDE8 est composée de 2 gènes distincts, PDE8A et PDE8B. PDE8A et PDE8B ont une affinité très forte pour l'AMPc (40 fois plus forte que la PDE4 par exemple). Aucune des PDE8 n'hydrolyse le GMPc ou n'est régulée par le GMPc. Comme la plupart des autres PDEs, l'activité de PDE8A et PDE8B dépend de la liaison de PDE8 avec des cations divalents tels que le Mg<sup>2+</sup> (131, 250).

PDE8A a un rôle dans la maturation des spermatozoïdes (251, 252) et dans la stéroïdogénèse des cellules de Leydig (133, 250). Elle joue en particulier un rôle majeur dans le contrôle de la synthèse de testostérone par la LH (133). Même si PDE8A est faiblement exprimé dans les cardiomyocytes, elle a un rôle primordial dans ces cellules puisqu'elle contrôle le pool d'AMPc impliqué dans le déplacement du calcium intracellulaire et donc le couple excitation-contraction (136).

PDE8B a un rôle central dans la stéroïdogénèse des cellules surrénaliennes de la fasciculée en réponse à l'ACTH (139, 253, 254). Elle a également un rôle dans la préparation de l'endomètre à la nidification (255). Elle est enfin impliquée dans la régulation du niveau de TSH et dans la réponse insulinique des îlots pancréatiques (134).

### **5.5.9 PDE 9**

Il s'agit de la PDE ayant la plus forte affinité pour le GMPc (140). PDE9 est codé par un seul gène, PDE9A et comporte plus de 20 isoformes. PDE9A semble avoir un rôle important dans la régulation des circuits monoaminergiques impliqués dans la mémoire (256).

### **5.5.10 PDE 10**

PDE10 est capable d'hydrolyser aussi bien l'AMPc que le GMPc avec cependant un Km pour l'AMPc d'environ 0.05 µM alors qu'il est de 3 µM pour le GMPc (143-145, 147). La famille PDE10 est composée de deux isoformes. L'hydrolyse du GMPc par PDE10A est inhibée par l'AMPc (143, 144, 147). Le domaine GAF liant le GMPc de

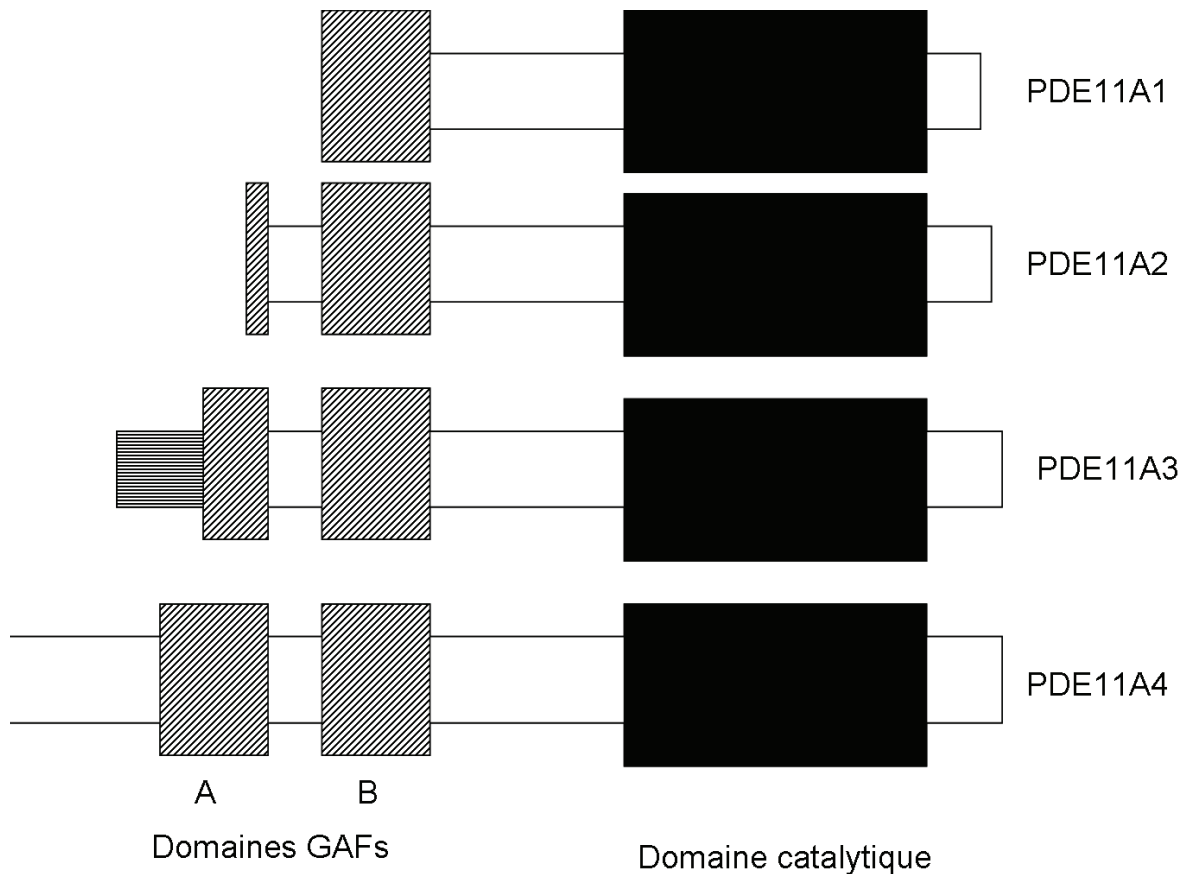
PDE10A a par ailleurs une particularité comparé aux domaines GAFs des autres PDEs. Il s'agit en effet du seul domaine GAF liant l'AMPc plutôt que le GMPc ce qui explique l'hydrolyse préférentielle de l'AMPc (257).

Elle aurait un rôle clé dans l'activation de l'excitabilité d'une population neuronale du striatum ainsi que dans la plasticité neuronale. En pathologie, PDE10 a un rôle dans la schizophrénie et les pathologies apparentés (258) ainsi que dans la neuroprotection dans la maladie de Huntington (259).

### **5.5.11 PDE 11**

La famille PDE11 est composée de 4 isoformes de PDE11A1 à PDE11A4 (figure 14). PDE11A est capable d'hydrolyser non seulement l'AMPc mais également le GMPc. Le domaine catalytique et le domaine C-terminal sont identiques pour toutes ses isoformes. En revanche, le domaine N-terminal varie ainsi que les domaines GAFs. PDE11A1 est l'isoforme la plus courte avec une protéine d'environ 490 acides aminés incluant la moitié d'un domaine GAF B (149). PDE11A2 est une protéine de 576 acides aminés contenant un domaine GAF B entier ainsi qu'une partie de la séquence d'un domaine GAF A (260). PDE11A3 est une protéine de 684 acides aminés comportant un domaine GAF B complet ainsi qu'une partie un peu plus longue d'un domaine GAF A (260, 261). PDE11A4 est la forme la plus longue des isoformes de PDE11. Il s'agit d'une protéine de 934 acides aminés comportant deux domaines GAFs complets (GAF A et GAF B) associés à une extension N-terminale présentant deux domaines de phosphorylation pour la protéine kinase A et la protéine kinase G.





**Figure 14: Représentation schématique des 4 isoformes de PDE11**

La famille PDE11 est composée de 4 isoformes de PDE11A1 à PDE11A4. PDE11A1 est l'isoforme la plus courte incluant la moitié d'un domaine GAF B. PDE11A2 contient un domaine GAF B entier ainsi qu'une partie de la séquence d'un domaine GAF A. PDE11A3 comporte un domaine GAF B complet ainsi qu'une partie un peu plus longue d'un domaine GAF A. PDE11A4 est la forme la plus longue des isoformes de PDE11. Elle comporte deux domaines GAFs complets (GAF A et GAF B) associés à une extension N-terminale.

PDE11 a un rôle dans la spermatogénèse (262). Ainsi, il a été montré que les souris invalidées pour PDE11 présentaient une diminution de la mobilité, de la concentration des spermatozoïdes ainsi qu'une diminution du nombre de spermatozoïdes vivants (260).

## **5.6 Phosphodiesterases et pathologie humaine**

Des anomalies des phosphodiesterases ont été mises en évidence chez l'homme dans des pathologies aussi diverses que l'asthme, la dysfonction érectile, la bronchopneumopathie chronique obstructive, certaines maladies auto-immunes, l'hypertension artérielle, la claudication intermittente, l'insuffisance cardiaque, la schizophrénie, l'infarctus du myocarde ou la dépression.

### **5.6.1 PDEs et pathologie humaine non endocrine**

#### **5.6.1.1 L'asthme**

Une analyse par pan-génomique avait permis de mettre en évidence que les patients asthmatiques présentaient des polymorphismes au niveau du chromosome 5q12, siège de la PDE4D (263). Des études précliniques dans des modèles animaux avec un asthme allergique ont permis de mettre en évidence que les inhibiteurs de PDE4 diminuaient non seulement le recrutement des éosinophiles dans les bronches mais également l'hyperréactivité bronchique. Plusieurs des isoformes de PDE4 semblent impliqués dans ce phénomène (264, 265).

#### **5.6.1.2 La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO)**

La plupart des types cellulaires impliqués dans la BPCO exprime la PDE4 (lymphocytes T, macrophages, neutrophiles...). Chez la souris déficiente en PDE4B et PDE4D, le recrutement bronchique des neutrophiles est diminué d'environ 50% (266). Une inhibition encore plus importante a été décrite lorsque le rolipram, un

inhibiteur de toutes les isoformes de PDE4 est utilisé, témoignant de la complémentarité des isoformes de PDE4 dans cette fonction (266). D'autres PDEs pourraient également être impliquées dans ce phénomène, en particulier PDE3 et PDE7 (267).

Chez l'homme, l'expression de PDE4A4 est augmentée dans les macrophages des patients porteurs d'une BPCO par rapport à ceux des sujets contrôles (268). Par ailleurs, des études génotypiques ont mis en évidence la présence de polymorphismes dans le gène du PDE4D chez les patients japonais porteurs d'une BPCO comparés à une population contrôle de fumeurs sans BPCO (269).

Des études cliniques de phase III ont également été réalisées chez des patients porteurs de BPCO traités par des inhibiteurs de PDE4 (270-272). Ces trois études rapportent une amélioration modeste mais significative de la spirométrie, des scores de qualité de vie et une réduction du nombre des poussées aiguës chez les patients BPCO. Des études plus récentes avec le Roflumilast chez des patients ayant une BPCO modérée ou sévère rapportent des résultats encore plus encourageants (273).

### 5.6.1.3 L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

L'hypertension artérielle pulmonaire est caractérisée par une élévation progressive des pressions artérielles pulmonaires responsable, à terme, d'une insuffisance cardiaque droite et de décès prématurés. Un substrat génétique avec présence, en particulier de polymorphismes dans le gène codant pour le transporteur de la sérotonine ou dans le récepteur de la protéine osseuse morphogénétique de type 2 a été démontré chez certains de ces patients (274). Certaines HTAP peuvent également être secondaires à une pathologie primitive cardiorespiratoire. Certaines de ces HTAP restent cependant d'étiologie inconnue. La présence de facteurs modificateurs de gènes est évoquée chez certains de ces patients (275). PDE5 pourrait être un de ces modificateurs de gènes. PDE5 est l'enzyme principale régulant l'hydrolyse du GMPc dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires humaines. Il a par ailleurs été montré que le sildenafil, un inhibiteur de PDE5, était capable de diminuer la pression pulmonaire et l'hypoxie induite par l'HTAP chez le rat (276). Les effets bénéfiques du sildenafil sur l'HTAP ont été confirmés chez l'homme (277).

#### 5.6.1.4 Le cancer de la prostate

Des variants de PDE11A ont été retrouvés à une fréquence significativement plus élevée (30%) chez des patients avec un cancer prostatique par rapport à une population de sujets contrôles (10%) (278) suggérant l'implication de ces variants dans la physiopathologie des cancers de la prostate.

#### 5.6.1.5 La migraine

La physiopathologie de la migraine présente encore de nombreuses zones d'ombre. L'oxide nitrique (NO) semble jouer un rôle clé (279). Le NO stimule la guanylate cyclase soluble des cellules musculaires lisses des vaisseaux ce qui entraîne une augmentation des niveaux de GMPc, responsable d'une vasodilatation et donc d'une stimulation mécanique des fibres nerveuses périvasculaires impliquées dans la genèse de la douleur (280).

Les PDEs ont un rôle important dans la régulation de ces niveaux de GMPc et pourraient donc avoir un rôle dans la physiopathologie de la migraine.

#### 5.6.1.6 Dépression et troubles cognitifs

La PDE4 est hautement exprimée dans le système nerveux central en particulier dans la plupart des régions impliquées dans la régulation du comportement affectif, de l'humeur et de la mémoire (281, 282). Il a été montré que PDE4 était impliquée dans la signalisation de l'AMPc médiée par les récepteurs adrénergiques et sérotoninergiques. PDE4 serait en particulier responsable de l'hydrolyse de l'AMPc formé par la stimulation des récepteurs adrénergiques dans le cortex cérébral (283). Or ces récepteurs ont un rôle dans les modifications du comportement (283). Parallèlement, PDE4 est impliquée dans la voie de signalisation médiée par le récepteur N-méthyl D-aspartate (NMDA) qui a un rôle dans les aspects cognitifs de la dépression (284).

Il a enfin été montré que PDE4 avait un rôle important dans la mémoire et dans l'apprentissage (285, 286). Ainsi des mutations dans la PDE4 entraînent des déficits sévères dans l'apprentissage et dans la mémoire chez la drosophile (286). Les expériences ayant utilisé des inhibiteurs de la PDE4 chez la souris confirment ces premiers résultats (287-289).

### 5.6.1.7 La schizophrénie

Plusieurs études ont montré que la PDE4 pouvait avoir un rôle dans la physiopathologie de la schizophrénie. Ainsi, il a tout d'abord été rapporté une translocation du gène *PDE4B* chez deux patients schizophrènes (290). Par ailleurs des polymorphismes de *PDE4B* sont associés à une augmentation du risque de développer une schizophrénie (291). PDE4B se lie en effet à DISC 1 (disrupted in schizophrenia 1), un facteur de susceptibilité génétique de la schizophrénie (290). Les souris porteuses d'une mutation de DISC1 réduisant la liaison à PDE4B développe des symptômes évocateurs d'une schizophrénie ou d'un syndrome dépressif (292). Les inhibiteurs de PDE4 utilisés dans des modèles de souris avec une schizophrénie permettent de diminuer en particulier l'hyperactivité et l'hyperlocomotion (293, 294). Contrairement à ce qui est observé avec les inhibiteurs de PDE4, les souris invalidées pour *PDE4B* développent des symptômes évocateurs de schizophrénie (293). Ces différences paradoxales observées entre les inhibiteurs de PDE4 et les souris invalidées peuvent être expliquées de plusieurs façons. Tout d'abord, le rolipram n'est pas sélectif de PDE4B et l'activité des autres sous types de PDE4 peut donc avoir un rôle dans le phénotype observé. Par ailleurs, l'inactivation de PDE4D correspond à une perte chronique de l'enzyme à la différence de l'effet observé avec les inhibiteurs de PDE4. Enfin, dans les modèles de souris invalidées, des mécanismes de compensation impliquant des gènes n'ayant rien à voir avec PDE4D peuvent également contribuer au phénotype.

A ce jour, aucune étude clinique n'a cependant réellement utilisé le rolipram chez des patients schizophrènes.

### 5.6.1.8 L'acrodysostose

L'acrodysostose (MIM 101800) est une pathologie rare, héréditaire à transmission autosomique dominante caractérisée par une dysostose faciale, une brachydactylie sévère ainsi qu'une petite taille. Un retard mental modéré et une résistance multihormonale (en particulier à la parathormone et à la TSH) peuvent également être présents (295, 296).

Des mutations du gène *PRKAR1A* peuvent être retrouvées chez certains de ces patients (297).

Des mutations hétérozygotes faux sens du gène de *PDE4D* ont également été mises en évidence chez certains de ces patients (298, 299). Aucune étude fonctionnelle n'a cependant été publiée à ce jour. Ces patients mutés sur *PDE4D* ont des caractéristiques cliniques similaires à ceux mutés sur le gène *PRKAR1A* avec par exemple une hypoplasie nasale et une déficience mentale modérée. En revanche, alors que chez les patients mutés sur le gène de la *PRKAR1A*, les résistances hormonales sont constantes, elles sont beaucoup plus anecdotiques chez les patients porteurs d'une mutation sur *PDE4D*.

## 5.6.2 Phosphodiésterases et glandes endocrines

Des altérations à plusieurs niveaux de la voie de l'AMPc peuvent être responsables de la tumorigénèse endocrine.

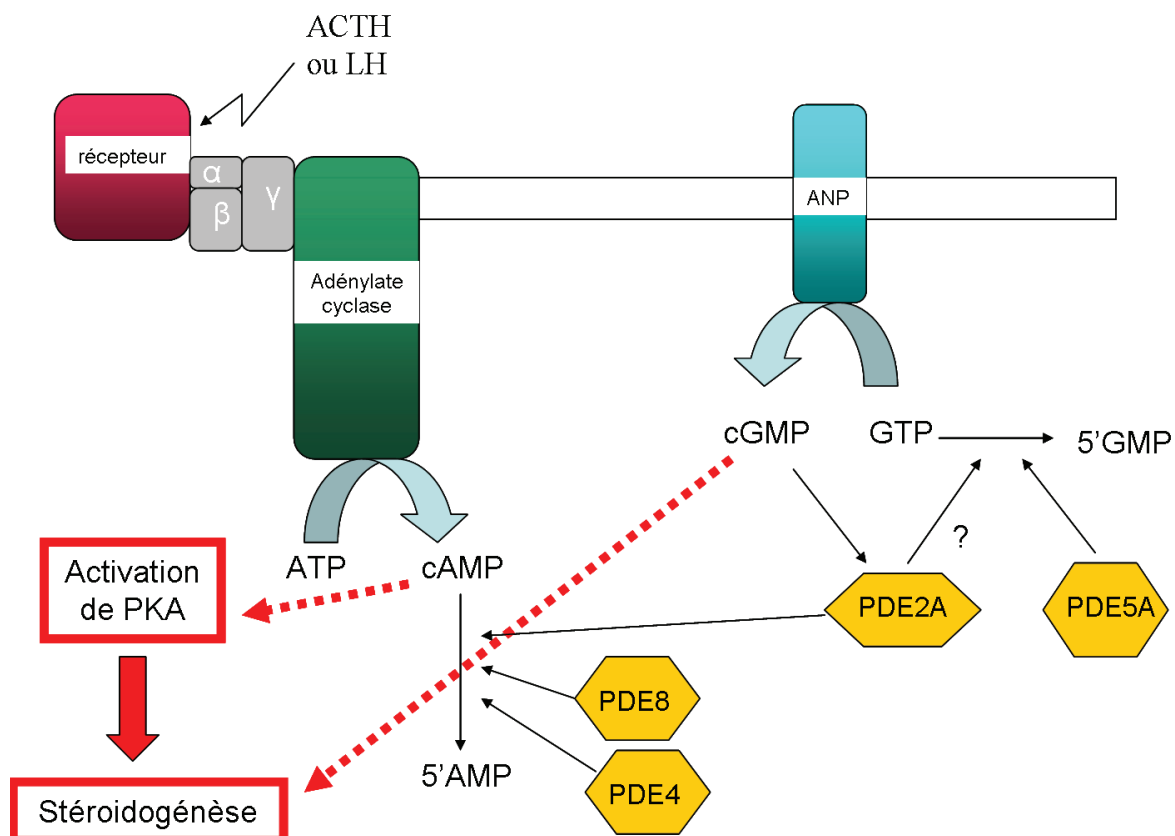
Ainsi des mutations activatrices de l'adénylyl cyclase responsables d'une élévation de l'AMPc sont retrouvées dans le syndrome de McCuneAlbright associant une dysplasie fibreuse osseuse multiple, des taches café-au-lait et une puberté précoce (300). Des mutations germinales inactivatrices de la sous unité régulatrice R1A de la protéine kinase A (*PRKAR1A*) sont responsables du complexe de Carney associant en particulier des myxomes cardiaques et cutanées, une dysplasie micronodulaire pigmentée bilatérale des surrénales, des tumeurs thyroïdiennes, hypophysaires... (301).

Les PDEs semblent également avoir un rôle clé dans la physiologie et la physiopathologie des glandes endocrines. Nous les détaillerons dans le paragraphe ci-dessous.

### 5.6.2.1 PDEs et surrénale

PDE2A, PDE8A, PDE8B et PDE11A sont les PDE les plus exprimées dans la surrénale (254, 302, 303).

L'implication de ces PDEs dans la stéroïdogénèse est résumée dans la figure 15. Un élément important à retenir est que l'activation de plusieurs PDEs est nécessaire pour atteindre un niveau maximal de stéroïdogénèse.



**Figure 15: Rôle des PDEs dans la stéroïdogénèse**

Dans les cellules de la corticosurrénale, PDE8 semble moduler la stéroïdogénèse en situation basale ou lors de faibles stimulations. Les autres PDEs et en particulier PDE4 et PDE2A semble réguler la stéroïdogénèse lorsque la voie de l'AMPc est stimulée de façon importante. La voie du GMPc pourrait également être impliquée dans la stéroïdogénèse des cellules de Leydig en particulier. PDE5 est en particulier un élément clé permettant de réguler le pool du GMPc dans les cellules de Leydig.

### a PDE 2A

PDE2A est la PDE majoritaire dans le cortex surrénalien. Elle semble impliquée dans la physiologie surrénalienne (139, 254, 304). Elle a en particulier un rôle dans la régulation intra-cellulaire de l'AMPc induite par l'ACTH. Chez le rat et dans des modèles cellulaires humains, trois phases séquentielles d'activation de la voie de l'AMPc sont décrites après liaison de l'ACTH à son récepteur. On observe tout d'abord une stimulation rapide et importante de l'adénylcyclase suivie d'une réponse biphasique sur la PDE2, qui consiste, dans un premier temps à une inhibition rapide de la PDE2A suivie d'une activation retardée de la PDE2A (305).

Par ailleurs, dans les cellules de la glomérulée, PDE2A a également un rôle dans la régulation de la production d'aldostérone. L'aldostérone sert principalement à réabsorber l'eau et le sodium dans le rein. Le peptide atrial natriurétique, l'ANP, diminue la production d'aldostérone via PDE2A. En effet, la liaison de l'ANP à son récepteur, la guanylyl cyclase-A est responsable de la conversion de GTP en GMPc (306). Cette augmentation de GMPc stimule PDE2A qui diminue alors l'AMPc et entraîne alors une diminution de la production d'aldostérone (185, 305).

Aucune pathologie surrénalienne impliquant PDE2A n'a à ce jour été décrite.

### b PDE 8 B

PDE8B a un rôle clé dans la régulation de la stéroïdogénèse (139). Il a ainsi été montré que les souris invalidées pour le gène de PDE8B ont des niveaux de corticostérone plus élevés que les souris saines en raison de leur hypersensibilité à l'ACTH. Un traitement par un inhibiteur spécifique de PDE8B induit les mêmes effets sur les niveaux de corticostérone dans des modèles de culture cellulaire en augmentant la sécrétion basale de stéroïdes alors qu'un traitement par un inhibiteur non sélectif des PDEs, l'IBMX n'a qu'un effet modéré sur la stéroïdogénèse surrénalienne basale (139).

PDE8B peut donc être considéré comme un régulateur négatif de la stéroïdogénèse surrénalienne.



PDE8B semble également impliquée dans certaines pathologies surrénaliennes. Ainsi, lors de l'analyse par genome wide scan des patients porteurs de PPNAD, un locus localisé au niveau 5q13, siège du gène PDE8B, a été identifié (253). Le gène PDE8B a ensuite été séquencé chez 22 patients avec une PPNAD isolée permettant la mise en évidence d'une mutation de ce gène chez 1 patient. Les études in vitro ont alors démontré que la mutation de PDE8B était responsable d'une élévation de l'AMPc dans les cellules transfectées avec le mutant par rapport aux cellules contrôles (253, 307). A ce jour, il n'est cependant pas possible de conclure de façon définitive sur la causalité directe de ces mutations sur la PPNAD. Ainsi, les souris invalidées pour PDE8B ne développent pas de pathologie surrénalienne suggérant donc que des mutations additionnelles sont susceptibles de rentrer en ligne de compte.

### c PDE 11A

Le rôle de PDE11A dans la physiologie surrénalienne est encore mal connu. L'invalidation du gène PDE11A n'a pas de conséquence évidente surrénalienne, mais une étude spécifique de cette glande n'a semble-t-il pas été réalisée (262). Les traitements inhibant partiellement PDE11A, par exemple le tadalafil, ne semble pas non plus avoir d'impact sur la fonction surrénalienne chez la souris.

La fonction corticotrope d'un groupe de sujets sains traités par tadalafil a été étudiée versus placebo lors d'une activité physique intense tout d'abord sur une durée courte de quelques heures (308) puis sur une durée plus longue de 48 h (309). Il a ainsi pu être mis en évidence que, sur une durée courte, l'administration de tadalafil était capable d'augmenter la sécrétion de cortisol salivaire. En revanche, sur une durée plus longue, le tadalafil semble diminuer la réponse physiologique de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien lors d'un exercice physique maximal chez des sujets sains sans modification des paramètres cardiorespiratoires et de performance physique. Le tadalafil est un inhibiteur de PDE5 et de PDE11. Ces résultats ont donc permis de conclure que PDE5 et/ou PDE11 ont probablement un rôle dans l'axe corticotrope. Le tadalafil au long cours pourrait inhiber les PDEs présentes dans le système nerveux central augmentant ainsi les effets du NO sur le GMPc de l'axe

hypothalamo-hypophysaire. Cela entraînerait ainsi une diminution de la sécrétion d'ACTH. Une action directe du tadalafil sur le cortex surrénalien ne peut cependant pas être exclue. Un effet inhibiteur du NO sur la production de corticostérone induite par l'ACTH avait ainsi antérieurement été démontré (310).

PDE11A semble en revanche impliquée dans certaines pathologies surrénaliennes. Ainsi, une analyse pangénomique de patients porteurs de PPNAD a mis en évidence une zone d'intérêt en 2q31-2q35, zone contenant le gène de PDE11A. Le séquençage du gène PDE11A chez 16 patients avec une PPNAD sans mutation du gène PRKAR1A a alors permis de mettre en évidence 5 mutations germinales du gène PDE11A dont 3 mutations responsables d'une protéine tronquée et 2 mutations faux sens (302). En dehors du cadre très spécifique des PPNAD, il a été montré que des variants faux sens de PDE11A, très rares dans la population générale, étaient retrouvées chez des patients porteurs de tumeurs surrénaliennes que ce soit des hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales, des adénomes cortisoliques ou des corticosurrénales. Certes, des mutations faux sens de PDE11A peuvent également être retrouvées dans la population générale mais à une fréquence significativement plus faible que dans le groupe de patients avec une tumeur surrénalienne (311).

#### 5.6.2.2 PDEs et thyroïde

PDE1A, PDE7A et PDE8B sont les PDEs les plus exprimées dans la thyroïde (254, 303).

##### a PDE 8B

Des variants génétiques de PDE8B semblent impliqués dans la régulation de la TSH et pourraient être responsables de l'élévation de la TSH retrouvée chez certains patients sans autoimmunité thyroïdienne (312). Ainsi cette étude réalisée sur un genome-wide scan a mis en évidence que, sur plus de 350 000 polymorphismes, le polymorphisme rs4704397 du gène PDE8B était corrélée avec le niveau de TSH. Chaque copie de l'allèle A était ainsi associée à une augmentation du niveau de TSH

de 0.13 mUI/l. Une méta-analyse récente confirme également que ce polymorphisme est associé à une TSH plus élevée chez des sujets sains et que la présence de ce polymorphisme est également corrélée à une diminution de la T4I, même si le degré de significativité pour cette dernière association est plus modeste (313). L'association entre polymorphisme de PDE8B et TSH a également été retrouvée dans une population d'enfants obèses (314).

PDE8B pourrait également avoir un rôle dans la régulation de la fonction thyroïdienne lors de la grossesse (315). Dans cette étude, la TSH contrôlée dans une population de femmes enceintes de 28 semaines variait en fonction de la présence ou non d'un polymorphisme de PDE8B. La présence de ce polymorphisme de PDE8B pourrait même être associée avec une hypothyroïdie infraclinique pendant la grossesse.

Une des hypothèses serait que les polymorphismes de PDE8B réduiraient l'AMPc thyroïdien entraînant ainsi une diminution de la sécrétion des hormones thyroïdiennes périphériques après stimulation par la TSH. Par rétrocontrôle négatif, une élévation de la TSH serait alors observée. A noter cependant que les conséquences in vitro de ces variants génétiques de PDE8B n'ont jamais été démontrées jusqu'à présent.

## b PDE4

Dans les nodules toxiques thyroïdiens, des mutations somatiques du récepteur de la TSH ou plus rarement de la protéine G $\alpha$  peuvent être retrouvées. Des anomalies de certaines PDEs peuvent également avoir un rôle dans la pathogénèse de ces nodules toxiques. Ainsi une étude a démontré une élévation de PDE4 dans une série de nodule toxique sans mutation du récepteur de la TSH ou de la protéine G $\alpha$  (316). Dans cette étude, l'élévation de PDE4 serait donc un mécanisme contre-régulant l'élévation chronique d'AMPc.

## c PDE10A

Une étude par analyse de liaison réalisée sur une population de plus de 1200 individus a mis en évidence une association entre le niveau de TSH et le

chromosome 6q26-27 (317). PDE10A serait un candidat potentiel sur ce locus même si des études de confirmation sont nécessaires.

### 5.6.2.3 PDEs et hypophyse

Les phosphodiésterases 1, 2, 4, 11A sont les PDEs les plus exprimées dans l'hypophyse (318-320). Le rôle physiologique de ces PDEs dans l'hypophyse humaine reste encore peu connu. Plusieurs études, conduites chez le rongeur, ont cependant démontré que ces PDEs pouvaient avoir un rôle dans la sécrétion de prolactine et d'ACTH. Ainsi il a été montré qu'un traitement par l'IBMX, un inhibiteur non sélectif des PDEs, était responsable d'une augmentation des nucléotides cycliques dans des cultures primaires d'hypophyse de rats (321). Par ailleurs, l'IBMX entraîne dans ces cultures cellulaires une augmentation de la production de prolactine. Ces premiers résultats ont été confirmés dans des cellules hypophysaires humaines (320).

#### a PDE4

Il a été montré que l'IBMX inhibait complètement l'activité des PDEs des hypophyses normales et que PDE4 et PDE1 semblait être les PDEs les plus impliquées dans ce processus (320, 322). PDE4 aurait un rôle particulièrement important dans la physiologie des cellules corticotropes. Il a, par exemple, été montré que les inhibiteurs de PDE4 activaient l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (323, 324).

En pathologie, PDE4 semble avoir un rôle dans la pathogénèse des adénomes somatotropes. Les cellules somatotropes sont un type cellulaire où l'activation de la voie de l'AMPc entraîne une augmentation de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Il avait été préalablement montré que l'activité PDE était augmentée dans les adénomes hypophysaires somatotropes avec mutation activatrice de Gs $\alpha$  en comparaison avec leurs homologues non mutés sur Gs $\alpha$  ou avec l'hypophyse saine (320). Cette augmentation de l'activité PDE était en rapport avec l'activation de PDE4. Ainsi un inhibiteur sélectif de PDE4, le rolipram est aussi efficace que l'IBMX, un inhibiteur non sélectif des PDEs pour induire l'accumulation d'AMPc et bloquer

l'activité enzymatique. L'élévation de PDE4 pourrait donc être un mécanisme protecteur permettant de lutter contre l'activation de la voie AMPc par la mutation Gs $\alpha$  (325).

Par ailleurs, des mutations germinales du gène codant pour le récepteur aryl hydrocarbure (AIP) sont des facteurs de prédisposition aux adénomes hypophysaires (326). Or des interactions ont été décrites entre AIP et PDE4A5 (327). Les mutations de l'AIP altèrent l'interaction entre ces deux protéines suggérant à nouveau un rôle de PDE4 dans la pathogénèse des adénomes hypophysaires (328, 329).

#### b PDE8B

L'activation des PDEs par les mutations Gs $\alpha$  n'est pas limitée à la PDE4 mais semble également impliquer PDE8B. Ainsi il a été montré que l'expression de PDE8B était nulle dans l'hypophyse saine mais présente dans tous les adénomes hypophysaires à GH avec un taux particulièrement élevé dans les adénomes avec une mutation activatrice de Gs $\alpha$  (320).

#### c PDE11A

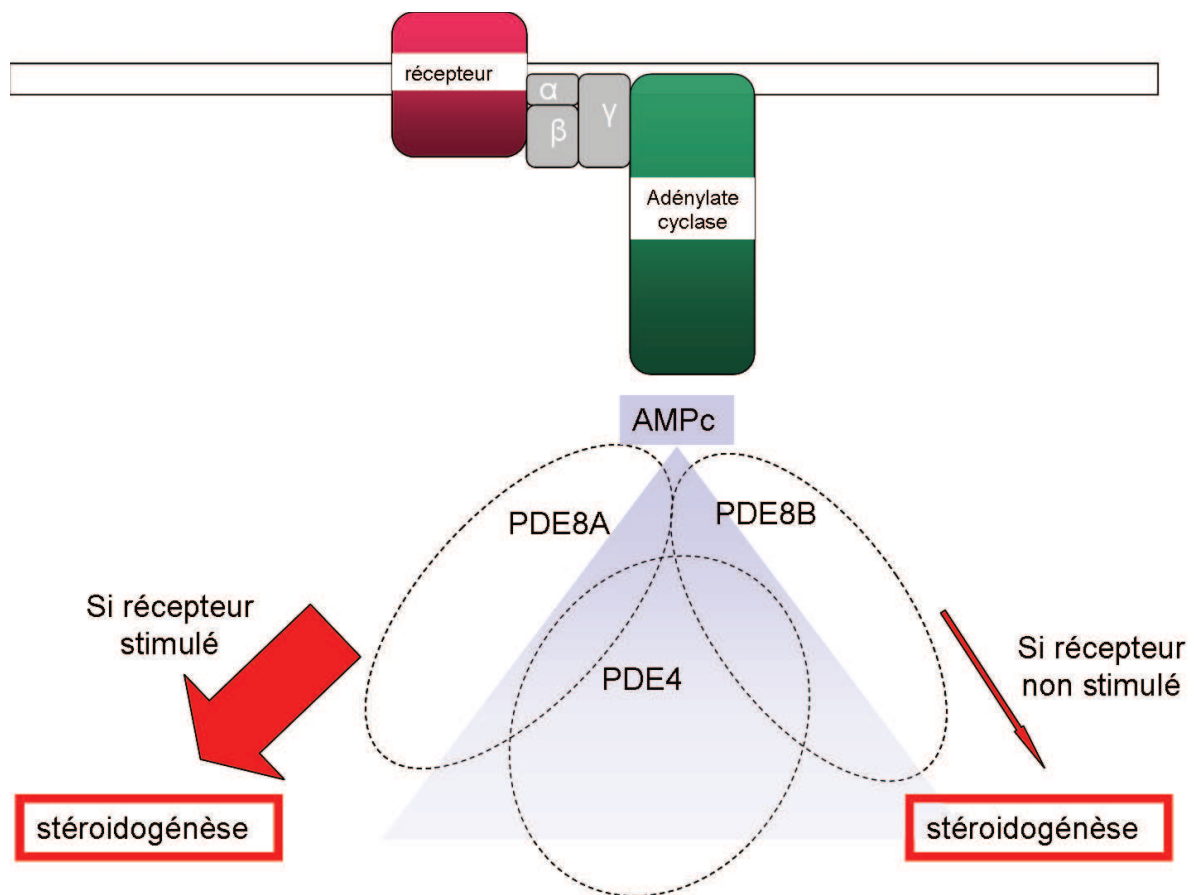
Une étude a évalué la présence de variants du gène PDE11A chez 78 patients acromégales en comparaison à 110 sujets contrôles (330). La fréquence de variants faux sens de PDE11A n'était pas significativement augmentée chez les patients en comparaison aux contrôles. Par ailleurs, l'enzyme était exprimée de façon normale dans la plupart des tissus tumoraux suggérant que ces variants ne contribuent que de façon anecdotique au développement des adénomes hypophysaires somatotropes.

### 5.6.2.4 PDEs et gonades

#### a Testicule

Les PDEs 1A, 1C, 3B, 5A, 8A, 8A, 10A, 11A sont celles qui sont le plus intensément exprimées dans le testicule (303).

L'implication des PDEs dans la stéroïdogénèse leydigienne est résumée dans la figure 16.



**Figure 16: Modèle de compartimentation de l'AMPc contrôlé par PDE8 et PDE4 dans la stéroïdogénèse des cellules de Leydig.**

PDE8 régule la stéroïdogénèse en situation basale ou lors de faibles stimulations. Les autres PDEs et en particulier PDE4 régule la stéroïdogénèse lorsque la voie de l'AMPc est stimulée de façon importante.

- *PDE11A*

Les données démontrant l'implication de PDE11A dans la spermatogénèse sont contradictoires. Ainsi, les souris invalidées pour le gène de la PDE11A présentent des altérations de la spermatogénèse avec une réduction de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes (262). Cependant, en dépit de ces altérations, la fertilité des souris invalidées n'est pas altérée et leur descendance ne présente pas d'anomalies particulières.

Le tadalafil, un inhibiteur de PDE5 et PDE11 a été utilisé chez des hommes et leur spermatogénèse a été évaluée. Chez ces patients aucune anomalie de la spermatogénèse ou de la fonction gonadotrope n'a été retrouvée (331). En revanche, l'utilisation du tadalafil de façon chronique chez des souris est responsable d'une diminution du poids des testicules, d'une dégénérescence et d'une atrophie de l'épithélium des tubes séminifères ainsi que d'une diminution de la production de spermatozoïdes.

A ce jour, il est donc difficile de conclure de façon certaine sur le rôle de PDE11 dans le testicule. Le développement d'un inhibiteur spécifique de PDE11A pourrait permettre d'évaluer l'implication réelle de PDE11A.

En pathologie, le gène codant la PDE11A a été séquencé chez 95 patients porteurs d'un cancer testiculaire comparé à 64 sujets contrôles (332). Des variants faux sens de PDE11A ont été mis en évidence de façon plus fréquente chez les patients présentant un cancer testiculaire familial et bilatéral que chez les sujets contrôles. Les études fonctionnelles ont ensuite démontré que ces mutations diminuaient l'activité PDE et augmentaient l'AMPc. Les variants faux sens de PDE11A pourraient donc avoir un rôle dans la susceptibilité génétique aux cancers testiculaires.

- *PDE8A et B*

Les cellules de Leydig sont localisées dans les cellules interstitielles des tubes séminifères et produisent la testostérone sous le contrôle de la LH. L'AMPc est le messager intra-cellulaire clé pour l'action de la LH sur la stéroïdogénèse (333). PDE8A a un rôle dans la production de testostérone par les cellules de Leydig (133). Ainsi, chez des souris invalidées pour le gène PDE8A, la sécrétion de testostérone

induite par la LH est environ quatre fois plus élevée que chez des souris contrôles (133). Ces souris sont également plus sensibles à la stimulation de la LH.

Parallèlement, il a été montré que les souris invalidées pour PDE8B avaient une production de testostérone plus élevée que les contrôles orientant également vers l'implication de PDE8B (139).

Enfin, une invalidation double de PDE8A et B potentialise la production de testostérone par rapport à une souris invalidée pour PDE8A et B suggérant un effet double, synergique des deux isoformes de PDE8 (334).

L'inhibition de PDE8 est par ailleurs responsable d'une augmentation de la production basale de testostérone lorsque la stimulation par la LH est modérée alors que pour des stimulations plus fortes la production de testostérone n'augmente pas. Cela suggère donc que l'activité de PDE8 peut être submergée par une activité très forte de l'adénylyl cyclase.

PDE8 peut donc être considéré comme un régulateur négatif de la stéroïdogénèse surrénalienne agissant surtout lorsque les niveaux d'AMPc sont bas.

- *PDE 4*

PDE4 aurait un rôle au côté de PDE8 dans la stéroïdogénèse des cellules de Leydig. En effet, l'IBMX, un inhibiteur non sélectif des PDEs n'inhibant pas PDE8, et le rolipram, un inhibiteur sélectif de PDE4 augmente la production de testostérone par les cellules de Leydig de façon similaire (334). La PDE4 entrerait en action lorsque la stimulation par la LH est importante alors que PDE8 régule le pool d'AMPc lorsque la stimulation par la LH est faible (figure 15).

- *PDE 5*

PDE5 est la PDE principale qui régule le niveau de GMPc dans les cellules de Leydig. Elle est ainsi capable de réguler la production d'androgènes par les cellules de Leydig (239). Il a en effet été montré que la stimulation de la voie du GMPc entraîne une accumulation du GMPc suivie d'une augmentation de la production d'androgènes (239). Un inhibiteur sélectif de PDE5 augmente le niveau de GMPc et potentialise la production d'androgènes (239). Parallèlement, un traitement chronique



pendant 1 mois par un inhibiteur de PDE5 entraîne une production de testostérone chez la souris (239, 241).

## b Ovaire

PDE3A et PDE4D sont les PDEs les plus intensément exprimées dans l'ovaire humain (303, 335, 336).

- *PDE3A*

PDE3A est la PDE la plus exprimée dans les ovocytes humains (336). L'inhibition de PDE3A bloque la maturation ovocytaire *in vitro et in vivo* (337). Parallèlement, les souris invalidées pour le gène PDE3A sont viables et ovulent un nombre normal d'ovocytes mais sont infertiles en raison du niveau élevé d'AMPc qui empêche la maturation ovocytaire spontanée (338).

- *PDE4D*

PDE4D semble également jouer un rôle majeur dans le follicule ovarien. Ainsi, un traitement par inhibiteur de PDE4 entraîne une maturation ovocytaire indépendamment de la stimulation par les gonadotrophines dans des cultures cellulaires (339). Par ailleurs, l'injection sous cutanée d'un inhibiteur de PDE4 seul ou en association avec des petites doses d'HCG (Human Chorionic Gonadotropin) peut induire l'ovulation chez le rat (340). En revanche, les souris invalidées pour PDE4D ont une diminution des ovulations associée à une diminution de la fertilité (341). Cette diminution de la fertilité est principalement due à une diminution de la viabilité des ovocytes. Elle est également secondaire dans une moindre mesure à une diminution de la sensibilité des cellules de la granulosa aux gonadotrophines entraînant donc une diminution de la sécrétion oestrogénique. Cette différence entre les résultats obtenus chez les souris invalidées et celles traitées par un inhibiteur de PDE4 sont possiblement en rapport avec un facteur durée d'inhibition.

- *PDE8A*

Dans la mesure où il avait été montré que PDE8A avait un rôle clé dans la stimulation de la LH et la production de testostérone par les cellules de Leydig chez l'homme, une étude a évalué le gène PDE8A dans une population de patientes avec un syndrome des ovaires polykystiques (342). L'hypothèse de ce travail était qu'une diminution de l'expression ou de l'activité de PDE8 pouvait contribuer à une production ovarienne excessive d'androgènes. Plusieurs polymorphismes de PDE8A (R136Q, L55V et N401S) ont été identifiés chez les patients avec un syndrome des ovaires polykystiques. Ces variants ne semblent cependant affectés ni l'activité enzymatique de PDE8A ni la localisation de la protéine lorsque le variant de PDE8A est surexprimé dans des cellules COS-1. Le mécanisme expliquant l'implication de PDE8A dans le syndrome des ovaires polykystiques n'est donc pas déterminé à ce jour.

### 5.6.3 Inhibition des PDEs en thérapeutique

En thérapeutique, des inhibiteurs des phosphodiésterases sont utilisés en pratique clinique courante dans certaines de ces pathologies. Les inhibiteurs efficaces sur chacune des PDEs sont détaillés dans le tableau 2.

	Inhibiteurs
<b>PDE1</b>	Vinpocetine, ICC224, SCH51866, 8-Meom-IBMX, Zaprinast, Sildenafil
<b>PDE2</b>	EHNA, BAY60-7550, PDP, IC933
<b>PDE3</b>	Milrinone, Tolafentrine, Cilostazol, Cilostamide, Trequinsin, OPC-33540, Dihydropyridazinone, Lixazinone, Zardaverine
<b>PDE4</b>	Cilomilast, Rolipram, R020-1724, Roflumilast, AWD12281, V11294A, SCH35159, Denbutylline, Arofylline
<b>PDE5</b>	Sildenafil, Tadalafil, DA8159, E402, Vardenafil, Zaprinast, DMPPO, Dipyridamole
<b>PDE6</b>	Zaprinast, Dipyridamole, Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil

	Inhibiteurs
<b>PDE7</b>	BRL 50481, IC242, Dipyridamole, BMS-586353, Thiadiazoles
<b>PDE8</b>	Dipyridamole
<b>PDE9</b>	BAY 73-669, SCH51866, Zaprinast
<b>PDE10</b>	Papaverine, Zaprinast, Dipyridamole, PQ-10
<b>PDE11</b>	Dipyridamole, Zaprinast

**Tableau 2: Inhibiteurs des phosphodiésterases**

### 5.6.3.1 Inhibition de PDE1A

L'inhibiteur de PDE1, la vinpocétine, a été utilisé dans la prévention des maladies cardiovasculaires et la dégradation cognitive. Aucun effet secondaire n'a été identifié à ce jour.

A ce jour, les inhibiteurs de PDEs n'ont pas été utilisés en cancérologie clinique. Cependant il a été montré *in vitro* que l'inhibition de PDE1 pouvait avoir un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules tumorales. Ainsi, l'inhibition de PDE1B stimule l'apoptose dans des lymphocytes humains présentant une leucémie (343). Parallèlement, PDE1C est surexprimée dans des cellules humaines de mélanome et leur prolifération est inhibée par la vinpocétine (344-346).

### 5.6.3.2 Inhibition de PDE2

Plusieurs inhibiteurs de PDE2 ont été testés expérimentalement mais à ce jour aucun n'a encore été utilisé chez l'homme. Dans des études portant sur l'animal, l'inhibition de PDE2 a essentiellement été utilisée pour son efficacité sur la perméabilité endothéliale et pour améliorer les troubles de la mémoire et de l'apprentissage (347, 348). Un de ces inhibiteurs, l'EHNA, a en particulier été utilisé pour augmenter le niveau d'AMPc dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et inhiber l'angiogénèse (196).

### 5.6.3.3 Inhibition de PDE3

Les inhibiteurs de PDE3 (cilostazol, Pletal®) trouvent leur place dans le traitement de la claudication intermittente en raison de leurs propriétés anti-agrégantes et vasodilatatrices (345).

Ces inhibiteurs ont également été utilisés dans le traitement du cancer métastatique du sein chez la souris (349). En effet, il a été montré que l'interaction entre les cellules tumorales et les différents composants du sang (en particulier les plaquettes) étaient un élément clé dans le processus métastatique. Le cilostazol permettrait ainsi de diminuer les métastases en diminuant l'agrégabilité des plaquettes.

Le cilostazol permettrait également de diminuer la mobilité des cellules tumorales coliques humaines et pourrait également être intéressant dans cette indication (350).

Enfin, les inhibiteurs de PDE3 seraient également efficaces dans l'insuffisance cardiaque aigüe mais leur administration chronique dans cette indication n'est pas possible dans la mesure où plusieurs études cliniques ont montré que leur utilisation au long cours chez l'insuffisant cardiaque était responsable d'une augmentation de la mortalité.

### 5.6.3.4 Inhibition de PDE4

La première génération d'inhibiteur de PDE4 est représentée par le Rolipram. Il a été largement utilisé en tant qu'antidépresseur dans de nombreux pays (351, 352). Il présente cependant de nombreux effets secondaires (somnolence, nausées, vomissements...) ce qui limite son intérêt en pratique clinique courante.

Par ailleurs le rolipram pourrait être intéressant en cancérologie. En effet, il augmente la survie des souris porteuses d'une xéno greffe de glioblastomes et améliorent l'efficacité de la chimiothérapie ainsi que de la radiothérapie chez ces souris (353, 354). Le rolipram pourrait également être utile dans les cancers du poumon en inhibant la transition épithélium-mésenchyme, étape clé de la tumorigénèse puisqu'elle favorise la mobilité cellulaire favorisant ainsi la diffusion métastatique (355).

## Synthèse bibliographique : Les phosphodiésterases

La seconde génération d'inhibiteurs de PDE4 est constituée par le roflumilast, et le cilomilast. Le roflumilast a été utilisé avec succès dans des modèles animaux de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et dans l'asthme (265, 356). Des études cliniques utilisant le roflumilast ou le cilomilast ont également été réalisées chez des patients asthmatiques ou BPCO. L'inhibition de PDE4 permettait dans ces études de diminuer la réaction allergique bronchique, d'améliorer la capacité respiratoire, et diminuerait ainsi la fréquence des décompensations aiguës (270, 357, 358).

Le développement d'inhibiteurs mixtes PDE3 et PDE4 pourraient permettre d'améliorer encore cette activité anti-inflammatoire et bronchodilatatrice (359).

In vitro, les inhibiteurs de PDE4 pourraient également être intéressants dans le traitement de l'obésité en diminuant l'inflammation induite par l'obésité dans le tissu adipeux blanc (360).

Plus récemment, il a été rapporté, dans une étude multicentrique, randomisé, contre placebo que l'apremilast, un inhibiteur de PDE4 permettait grâce à ses effets anti-inflammatoires de traiter efficacement les patients souffrant de psoriasis modéré ou sévère (361).

Enfin, l'exisulind est un inhibiteur mixte permettant d'inhiber non seulement PDE4 mais également PDE5. Il semble avoir des propriétés proapoptotiques. Ainsi dans des cellules cancéreuses de colon et de vessie de rat, l'exisulind diminue l'incidence des événements tumorigéniques (362, 363).

L'utilisation des inhibiteurs de PDE4 est cependant limitée en pratique clinique courante par leurs effets secondaires : céphalées, nausées, vomissements, douleurs abdominales et diarrhée d'intensité plus ou moins sévère en fonction des individus (271, 364). Ces effets secondaires disparaissent le plus souvent avec le temps mais sont une cause d'arrêt spontané dans les 4 premières semaines du traitement. Ils sont moins fréquents avec les inhibiteurs de PDE4 de seconde génération. En effet ces effets secondaires apparaissent lorsque l'inhibiteur de PDE4 se lie à PDE4 alors qu'il est dans une certaine conformation et cette conformation est moins fréquente lorsque la liaison se fait avec les inhibiteurs de seconde génération par rapport à ceux de première génération (365).

En revanche, le roflumilast aurait deux effets secondaires supplémentaires par rapport aux autres inhibiteurs de PDE4. Il induirait tout d'abord, chez certains patients, des troubles psychiatriques avec insomnie, dépression et idées suicidaires (270, 366, 367). Il serait également responsable d'une perte de poids de 5 à 10% du poids initial chez 20% des patients traités. Cette perte de poids serait indépendante des troubles digestifs (273).

### 5.6.3.5 Inhibition de PDE5

Le Zaprinast a été le premier inhibiteur de PDE5 utilisé chez l'homme. Ses propriétés de stabilisation des mastocytes lui ont permis d'être efficace en tant qu'anti-allergique.

D'autres inhibiteurs de PDE5, tels que le sildenafil, le vardenafil et le tadalafil ont ensuite été utilisés dans le traitement des dysfonctions érectiles (368). Ils ont également un intérêt dans l'hypertension pulmonaire. Certains inhibiteurs de PDE5 ont également été utilisés comme régulateur de la croissance cellulaire, de la division et de la mort cellulaire. Le vardenafil et le sildenafil pourraient ainsi induire l'apoptose des lymphocytes de leucémie chronique (369). Le vardenafil a également été utilisé pour contrôler la prolifération des cellules stromales des hypertrophies bénignes de la prostate. Le vardenafil inhibe de façon significative la prolifération des cellules stromales humaines (370). Une des hypothèses pourrait être que l'inhibition de PDE5 bloque la dégradation du GMPc, augmentant ainsi l'activité de l'oxide nitrique, qui inhibe l'oxidase NADPH (NOX) et contribue ainsi à la réduction du superoxide ( $O_2^-$ ), un radical libre impliqué dans la genèse de l'hyperplasie bénigne de la prostate. Une étude contradictoire a cependant montré que l'inhibition de PDE5 pouvait également induire une prolifération cellulaire, augmenter l'angiogénèse et la migration cellulaire par l'intermédiaire de l'activation de la voie des MAP kinases (371). Enfin, le vardenafil améliore la fonction cardiaque dans une population de rats diabétiques de type 2 (372).

Le sildenafil pourrait augmenter l'immunité anti-tumorale dans plusieurs modèles de souris (373). Il pourrait également avoir une utilité dans des pathologies pour lesquelles aucune thérapeutique n'a été validée à ce jour. Ainsi, dans un modèle

murin de dystrophie musculaire de Duchenne, le sildenafil permettrait d'améliorer la fonction cardiaque (374).

Un autre inhibiteur de PDE5, le sulindac, pourrait inhiber la croissance et induire l'apoptose de cellules humaines de cancer du sein par augmentation du GMPc et activation de la PKG (375). Le sulindac pourrait également induire l'apoptose in vitro des cellules de cancer du poumon à petites cellules (376). In vitro, l'inhibition de PDE5 pourrait également permettre de diminuer l'invasion des cellules de mélanome (377). En effet, dans cette étude l'inhibition de PDE5 dans des cellules de mélanome entraînerait une élévation du niveau de GMPc permettant une diminution modérée de la prolifération cellulaire mais surtout une augmentation de la contractilité cellulaire. Dans ces cellules, l'inhibition de PDE5 entraîne par conséquent une augmentation de l'invasion de cellules de mélanome.

Tous les inhibiteurs de PDE5 inhibent également en partie PDE6, une PDE exprimée dans les cônes et les bâtonnets. L'utilisation des inhibiteurs de PDE5 peut donc entraîner des troubles visuels modérés et transitoires (378). Le tadalafil, un inhibiteur de PDE5 inhibe également PDE11A mais, à ce jour, aucun effet secondaire en rapport avec cette inhibition de PDE11A n'a été rapporté.

#### 5.6.3.6 Inhibition de PDE7

Il a été montré que l'inhibition de PDE7, comme celle de PDE4, était responsable in vitro, de l'apoptose des lymphocytes de leucémie chronique (379).

#### 5.6.3.7 Inhibition de PDE8

L'inhibition sélective de PDE8 est responsable d'une inhibition de l'adhésion des lymphocytes T ainsi qu'une inhibition de leur prolifération (138). L'inhibition de PDE8 potentialise également la stéroïdogénèse des cellules corticosurréaliennes (139).

#### 5.6.3.8 Inhibition de PDE9

In vitro, il a été montré que l'inhibition de PDE9 était responsable d'une apoptose des cellules cancéreuses du sein (380).

Il pourrait également améliorer l'apprentissage et la mémoire dans des modèles murins (381). Ces résultats in vitro ont été confirmés dans des études cliniques chez des patients présentant une maladie d'Alzheimer.

#### 5.6.3.9 Inhibition de PDE10

L'inhibition de PDE10A par la papaverine pourrait permettre de diminuer la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (382). Une diminution significative de l'hypertrophie cardiaque droite est parallèlement observée. Cet effet antiprolifératif est secondaire à l'augmentation des niveaux d'AMPc qui stimule l'activité PKA (383).

L'inhibition de PDE10 a également été utilisée avec succès dans le traitement de la schizophrénie dans des modèles murins (222, 384). L'inhibition de PDE10 entraîne une élévation des niveaux d'AMPc et de GMPc qui antagonise les récepteurs de type D2 de la dopamine. Cet effet antagoniste augmente l'activité des neurones du striatum, activité qui est nettement diminuée dans la schizophrénie (384).

#### 5.6.3.10 Inhibition non spécifiques des PDEs

Des inhibiteurs non spécifiques des PDEs ont également trouvés leur place en pratique courante. Ainsi, la théophylline a été utilisée dans le traitement de l'asthme ou des bronchopneumopathies obstructives du fait de ses propriétés bronchodilatatrices, immunomodulatrices et anti-inflammatoires (385, 386). Elle n'est actuellement plus utilisée en routine dans ces pathologies pulmonaires en raison du risque d'arythmies ventriculaires.

Le dipyridamole permet de prévenir l'hypercoagulabilité après un infarctus du myocarde ou un remplacement valvulaire.



# Objectifs du travail

La tumorigénèse des tumeurs corticosurréaliennes est encore mal connue à ce jour. Il s'agit cependant de tumeurs fréquentes puisqu'elles sont retrouvées chez 1 à 7% de la population générale. La progression dans la connaissance de la tumorigénèse de ces lésions a été plus lente que dans d'autres tumeurs, peut être en raison du nombre limité de tumeurs surréaliennes traitées chirurgicalement. Cependant des avancées considérables ont été réalisées ces quinze dernières années. Même si d'autres voies sont impliquées telles que la voie du TGF $\beta$  ou la voie mTOR, deux voies de signalisation semblent particulièrement importantes dans la tumorigénèse de la corticosurrénale : la voie Wnt/ $\beta$ -caténine d'une part et la voie de l'AMPC d'autre part. La voie de signalisation Wnt est un système hautement conservé dans l'évolution. Elle régule de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose cellulaire. Elle est également normalement activée lors du développement embryonnaire. La  $\beta$ -caténine est un élément clé de cette voie. Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle qui est, soit associée aux E-cadhérines à la membrane plasmique, soit localisée au niveau du cytoplasme ou du noyau. Lorsque la  $\beta$ -caténine est associée aux cadhérines, elle est impliquée dans les processus d'adhésion cellulaire. En revanche, si cette interaction est rompue on peut observer une progression tumorale. Il avait tout d'abord été montré qu'un inhibiteur des interactions  $\beta$ -caténine/TCF (T cell factor) était capable de diminuer significativement la prolifération de cellules de type H295R (387). Il a ensuite été mis en évidence dans plusieurs travaux que les gènes cibles de la voie Wnt étaient activés dans des tumeurs corticosurréaliennes (388-390). Ces résultats ont été confirmés par des études immunohistochimiques. En effet, la localisation de la protéine  $\beta$ -caténine est un marqueur de son activation. Ainsi, après activation par un ligand extra-cellulaire ou par une altération génétique, la  $\beta$ -caténine est retrouvée dans le cytoplasme ou dans le noyau alors qu'à l'état inactif elle est retrouvée dans la membrane cellulaire. Or dans la plupart des tumeurs de la corticosurrénale, la  $\beta$ -caténine est retrouvée dans le cytoplasme ou dans le noyau témoignant donc de son activation dans ces tumeurs (391-393). Cette activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans les tumeurs de la corticosurrénale pourrait être secondaire à la présence de

## Objectifs du travail

mutations activatrices somatiques dans ces tumeurs. Ces mutations impliquant essentiellement l'exon 3 du gène de la  $\beta$ -caténine sont responsables d'altération au niveau des résidus sérine et thréonine et au niveau des acides aminés adjacents essentiels dans la dégradation de la  $\beta$ -caténine.

Des liens semblent exister entre la voie Wnt/ $\beta$ -caténine et la deuxième voie de signalisation particulièrement impliquée dans la tumorigénèse de la corticosurrénale, la voie de l'AMPc. Ainsi, on observe fréquemment une accumulation de  $\beta$ -caténine dans les dysplasies micronodulaires bilatérales pigmentées des surrénales sans mutation de la  $\beta$ -caténine suggérant donc un lien entre les voies Wnt/ $\beta$ -caténine et AMPc. De la même façon, il a été montré une accumulation de la  $\beta$ -caténine dans les adénomes surrénaux avec mutation somatique de *PRKAR1A*. Il a enfin été montré que la protéine kinase A était capable, *in vitro*, de contrôler la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (394).

Comme détaillé plus haut, la voie de l'AMPc est impliquée dans la physiopathologie de nombreuses tumeurs surrénales. L'activation de la voie de l'AMPc à tout niveau est responsable de l'apparition de tumeurs surrénales. Ainsi, il a été montré que des souris transplantées avec des xénogreffes de cellules corticales bovines exprimant un récepteur couplé aux protéines G ectopique développaient des tumeurs surrénales (395, 396). Une expression ectopique d'un simple récepteur couplé aux protéines G est donc suffisante pour entraîner la transformation tumorale. Parallèlement une perte de la protéine R1 $\alpha$  par une stratégie anti-sense est responsable d'une hyperplasie surrénale chez 50% des souris transgéniques (397). L'inactivation de *PRKAR1A* dans des modèles murins favorise également la survenue de tumeurs (398).

Tous ces éléments ne permettent pas d'expliquer la genèse des tumeurs surrénales chez tous les patients et nous avons choisi de nous intéresser dans ce travail à une enzyme clé de la voie de l'AMPc, les phosphodiésterases. Les phosphodiésterases sont indispensables à la voie de l'AMPc dans la mesure où elles permettent de réguler finement les niveaux intra-cellulaires d'AMPc en hydrolysant l'AMPc en son catabolite inactif, le 5'AMP. Il avait été préalablement démontré que certaines phosphodiésterases étaient impliquées dans la tumorigénèse de la corticosurrénale. Cela avait d'abord été montré pour PDE11A puis pour PDE8B dans des dysplasies micronodulaires pigmentées des surrénales (253, 302, 307). Cela

## Objectifs du travail

avait ensuite été confirmé dans des tumeurs unilatérales de la corticosurrénale bénignes ou malignes (311).

Nous avons tout d'abord voulu tester l'hypothèse de l'implication de variants génétiques de *PDE11A* dans les tumeurs bilatérales de la corticosurrénale. La première partie de ce travail porte sur les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales. Nous avons tout d'abord évalué la présence de variants génétiques de *PDE11A* dans une large population de patients porteurs d'une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales. Nous avons ensuite étudié les conséquences fonctionnelles de deux des variants génétiques de *PDE11A* sur la voie de l'AMPc. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'implication de *PDE11A* dans un autre groupe de patients porteurs de tumeurs surrénaliennes bilatérales, les patients porteurs d'un complexe de Carney. Ces patients présentent le plus souvent une mutation germinale du gène *PRKAR1A* mais la présence de variants génétiques de *PDE11A* pourrait avoir un rôle dans la variabilité phénotypique et la susceptibilité à développer une atteinte surrénale.

Le deuxième objectif de ce travail était d'évaluer quelles étaient les altérations moléculaires impliquées dans la sécrétion de cortisol dans les adénomes corticosurrénaux. Nous avons donc étudié le transcriptome d'adénomes cortisoliques et l'avons comparé à celui d'adénomes non sécrétants. Nous avons ainsi pu montrer que *PDE8B* était un des gènes les mieux corrélés avec la sécrétion cortisolique. Les niveaux d'AMPc et l'activité PKA ont ensuite été évalués dans ces adénomes.

## Résultats expérimentaux

### 1 Conséquences de la présence de variants génétiques de PDE11A chez des patients avec une tumeur de la surrénale

#### 1.1 Article 1

**Phosphodiesterase 11A (*PDE11A*) gene defects in patients with ACTH-independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH): functional variants may contribute to genetic susceptibility of bilateral adrenal tumors**

Delphine Vezzosi, Rossella Libé, Camille Baudry, Marthe Rizk-Rabin, Anelia Horvath, Isaac Levy, Fernande René-Corail, Bruno Ragazzon, Constantine Stratakis, Grégoire Vandecasteele, Jérôme Bertherat. J Clin Endocrinol Metab 2012 sous presse

Une approche génétique pangénomique avait identifié des mutations inactivatrices (codon stops) du gène *PDE11A* chez des patients présentant une dysplasie micronodulaire isolée des surrénales (302). Par la suite des variants germinaux faux sens de *PDE11A* rares dans la population générale ont ainsi été mises en évidence chez des patients présentant une tumeur corticosurrénalienne (311, 399). Même si ces variants peuvent être retrouvés avec une fréquence faible dans la population générale, ils sont significativement plus fréquents chez les patients avec une tumeur corticosurrénalienne (311).

L'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales (AIMAH) est une cause rare de syndrome de Cushing puisqu'elle n'est retrouvée que chez 1% de ces patients. Il s'agit le plus souvent de formes sporadiques mais de plus en plus d'AIMAH familiales sont rapportées. L'objectif de l'étude était double : nous avons tout d'abord souhaité

Résultats expérimentaux : Conséquences de la présence des variants de PDE11A chez des patients avec une tumeur de la surrénale

évaluer la fréquence de ces variants génétiques de PDE11A dans une large population de patients présentant une AIMAH en comparaison à une population contrôle. Nous avons ensuite étudié les conséquences fonctionnelles *in vitro* de deux de ces variants génétiques sur la voie de l'AMPc.

## Phosphodiesterase 11A (*PDE11A*) Gene Defects in Patients with ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia (AIMAH): Functional Variants May Contribute to Genetic Susceptibility of Bilateral Adrenal Tumors

Delphine Vezzosi, Rossella Libé, Camille Baudry, Marthe Rizk-Rabin, Anelia Horvath, Isaac Levy, Fernande René-Corail, Bruno Ragazzon, Constantine Stratakis, Grégoire Vandecasteele, and Jérôme Bertherat

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 1016 (D.V., R.L., C.B., M.R.-R., F.R.-C., B.R., J.B.), Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche (UMR) 8104, Institut Cochin, 75014 Paris, France; Faculté de Médecine Paris 5 (D.V., R.L., C.B., M.R.-R., B.R., J.B.), Université Paris Descartes, 75005 Paris, France; Department of Endocrinology (D.V.), Hôpital Larrey, 31480 Toulouse, France; Department of Endocrinology (R.L., C.B., J.B.), Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, 75014 Paris, France; Section on Endocrinology and Genetics (A.H., I.L., C.S.), Program on Developmental Endocrinology Genetics and the Pediatric Endocrinology Inter-Institute Training Program (C.A.S.), Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health & Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892; INSERM UMR-S 769 (G.V.), Labex Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics, 92296 Châtenay-Malabry, France; and University Paris-Sud (G.V.), IFR141, 92296 Châtenay-Malabry, France

**Context:** Phosphodiesterases (PDEs) are key regulatory enzymes of intracellular cAMP levels. *PDE11A* function has been linked to predisposition to adrenocortical tumors.

**Objective:** The aim of the study was to study the *PDE11A* gene in a large cohort of patients with ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) and in control subjects.

**Design:** The *PDE11A* entire coding region was sequenced in 46 patients with AIMAH and 192 controls. Two variants found in AIMAH patients were transiently expressed in HEK 293 and adrenocortical H295R cells for further functional studies.

**Results:** The frequency of all *PDE11A* variants was significantly higher among patients with AIMAH (28%) compared to controls (7.2%) ( $P = 5 \times 10^{-5}$ ). Transfection of the two *PDE11A* variants found in AIMAH patients only (D609N or M878V) showed that cAMP levels were higher, after forskolin stimulation, in cells transfected with the *PDE11A* mutants, compared to cells transfected with the wild-type *PDE11A* in HEK 293 cells ( $P < 0.05$ ). Moreover, transfection with mutants *PDE11A* increased transcriptional activity of a cAMP-response element reporter construct compared to wild-type *PDE11A* in HEK 293 cells ( $P < 0.0004$  for D609N and  $P < 0.003$  for M878V) and in the adrenocortical H295R cells ( $P < 0.05$  for D609N and M878V). In addition, analysis of cAMP levels in intact living culture cells by fluorescence resonance energy transfer probes showed increased cAMP in forskolin-treated cells transfected with *PDE11A* variants compared with wild-type *PDE11A* ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** We conclude that *PDE11A* genetic variants may increase predisposition to AIMAH. (*J Clin Endocrinol Metab* 97: 0000–0000, 2012)

**T**he cAMP pathway plays an important role in endocrine tissues (1). Various alterations of the cAMP signaling have been observed in endocrine tumors. Tumors of the adrenal cortex and various forms of adrenal hyperplasia causing steroid excess illustrate alterations of the cAMP/protein kinase A (PKA) signaling pathway (2–6). For instance, aberrant expression of G protein-coupled receptors is observed in the majority of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) (7, 8), somatic activating mutations of the stimulatory  $\alpha$ -subunit of the G protein (*GNAS*) in McCune-Albright syndrome (9), germline-inactivating mutations of the PKA regulatory subunit type 1 (*PRKAR1A*) in primary pigmented nodular adrenocortical diseases (PPNADs), and Carney complex (10–13).

The intracellular levels of cAMP are tightly regulated. Phosphodiesterases (PDEs) are key regulatory enzymes of intracellular cAMP levels because they hydrolyze cAMP into 5'-AMP (14). Two PDEs, PDE8B and PDE11A, have been shown recently to regulate cortisol secretion (15, 16). Furthermore, a whole-genome association study led to the discovery that these two PDEs are involved in predisposition to adrenal hyperplasia (17–19). Germline *PDE11A* non-sense mutations were identified initially in micronodular adrenal hyperplasia causing adrenal Cushing syndrome (17). Later, it was shown that various *PDE11A* missense substitutions could be involved in the development of various forms of adrenal tumors (20, 21). These missense substitutions of *PDE11A* that are rare in the general population were found with increased frequency among patients with AIMAH, adrenocortical adenomas, and adrenal cancer (21). Moreover, consistent with the hypothesis that *PDE11A* may play a role as a tumor suppressor gene, it has been reported that adrenal tumors expressing *PDE11A* variants present a loss of the wild-type allele, thus resulting in a significant reduction of enzyme levels in the affected tissue (21). This association of *PDE11A* variants and adrenocortical tumors suggests a role in the genetic susceptibility to develop these tumors.

AIMAH is a rare cause of Cushing syndrome, accounting for less than 1% of all cases. AIMAHs are bilateral tumors that are often apparently sporadic. However, familial forms have been reported (5), and the bilateral nature of these benign tumors suggests genetic factors. The genetics of AIMAH is largely unknown. Association of *PDE11A* variants with AIMAH has been reported to date in a limited series of 20 patients with this rare disease (21). The aim of the present work is to study in a large cohort of patients with AIMAH (and in control subjects) the *PDE11A* gene. Because demonstration of the alterations of enzymatic activity by these variants is important, functional studies were performed for

two missense substitution variants found in the AIMAH patients investigated (M878V and D609N). This showed alterations of PKA-dependent transcription by these mutants. Alterations of the control of cAMP levels by these variants was also for the first time shown in living cells using an *in vivo* fluorescence resonance energy transfer (FRET)-reporter probe.

## Patients and Methods

### Patients and controls

Leukocyte samples from 46 patients with AIMAH and from 192 control subjects were collected. These patients and controls had never been analyzed previously.

All patients and controls signed an informed consent for the analysis of leukocyte DNA and for access to their clinical data. The study was approved by an institutional review board (Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale, Hôpital Cochin, Paris).

Briefly, controls were collected as part of a program dedicated to the genetic predisposition to endocrine tumors (21). All volunteers were examined by a senior endocrinologist to exclude personal or family history or clinical signs suggestive of functional adrenal tumor.

Patients with AIMAH were identified as such by computed tomographic appearance of their adrenal glands and the biochemical evidence of ACTH-independent cortisol dysregulation (22, 23).

### DNA extraction and *PDE11A* sequencing

Leukocyte DNA was extracted from total blood as previously reported (21). The 20 coding exons (exons 3–23) and the flanking intronic sequences of the *PDE11A* gene (Ensembl protein coding gene: ENSG00000128655) were amplified by PCR using specific primers as described previously (21). All amplified samples were examined by agarose gel electrophoresis to confirm successful amplification of each exon. Direct sequencing of the purified fragments was then done using the Genetic Sequencer ABI3100 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Reagents

DMEM, fetal bovine serum, L-glutamine, penicillin, streptomycin, opti-MEM, trypsin, and PBS were obtained from Invitrogen (Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France). Forskolin was obtained from Sigma (St. Louis, MO).

### Transfection experiments

The human embryonic kidney (HEK) 293 and H295R (derived from adrenocortical carcinoma) cell lines were cultured as previously reported (24). Transient transfections were done in HEK 293 with Lipofectamine 2000 reagent (Lipo2000; Invitrogen Life Technologies) and in H295R with Effectene Transfection Reagent (QIAGEN, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Experiments were performed 24 or 48 h after transfection.

The *PDE11A* open reading frame was cloned into pCR3.1, and the missense mutations (D609N and M878V) were introduced by overlapping PCR, as previously described (17).

AQ: 6

AQ: 7

AQ: 8

AQ: 9

AQ: 10

## Western blot

For Western blots, cells were seeded on six-well plates at a density of  $500 \times 10^3$  cells per well and transfected with  $1 \mu\text{g}$  of plasmid DNA expressing either the wild-type or the variant form of PDE11A. Cells were lysed in buffer containing (in millimoles) Tris HCl 50 (pH 7.4), NaCl 150, EDTA 5, EGTA 1, Triton X-100 1%, protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics, Meylan, France) and centrifuged 5 min at  $800 \times g$ . Proteins in the supernatant were quantified using a BCA assay (Sigma). Similar amounts of proteins were separated on a 10% SDS-PAGE, then electrotransferred to polyvinylidene difluoride membrane, and analyzed by immunoblotting. The polyclonal antibody specific for PDE11A was used as directed by the manufacturer (ab14624; Abcam Inc., Cambridge, MA) at a dilution of 1:500.

## Luciferase reporter assays

A cAMP/PKA pathway reporter construct driving the expression of luciferase gene was used for expression studies: 4x(CRE)-Luc (Stratagene, La Jolla, CA) with a basic promoter element (TATA box) joined to four cAMP-responsive element (CRE) repeats.

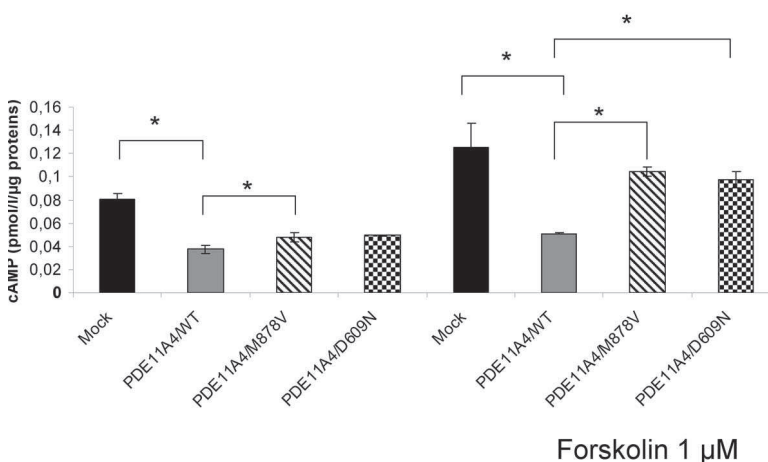
A cytochrome P450 side chain cleavage reporter driving the expression of luciferase gene was used to evaluate the steroidogenesis in H295 cells (gift from Dr. Antoine Martinez, Clermont Ferrand, France).

The Rous sarcoma virus (RSV)-Renilla construct, containing the RSV promoter-enhancer inserted upstream of the coding sequence of the Renilla luciferase (Promega Corp., Charbonnière, France), was used as a control for transfection efficiency.

Cells were cotransfected with  $1 \mu\text{g}$  of plasmid DNA expressing either the wild-type or the mutated form of PDE11A, 10 ng of the RSV-Renilla, and 250 ng of the luciferase reporter construct and lysed. Both firefly and Renilla luciferase activities were sequentially measured with the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp.).

Results are expressed as firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity of the same sample.

HEK293



**FIG. 1.** cAMP levels in HEK 293 cells transfected with wild-type (WT) or PDE11A4 variants expression vectors. The figure shows the levels of cAMP assayed as described in *Patients and Methods* in cells transfected with the wild-type PDE11A expression vector or the PDE11A4/M878V and PDE11A4/D609N variants. On the right, the cells were treated for 3 min with  $1 \mu\text{M}$  forskolin. \*,  $P < 0.05$ .

## cAMP assay

Basal and forskolin-induced (3 min with  $1 \mu\text{M}$  forskolin) levels of cAMP concentration were determined in cell lysates from cell culture or from tissue samples using commercially available assay (Direct cAMP EIA kit; Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI) following the manufacturer's instructions. The assay is based on competitive binding, in which endogenous cAMP levels compete with a fixed amount of alkaline phosphate-labeled cyclic nucleotides. The assay is colorimetric, and absorbance is read at 405 nm.

## FRET experiments

A total of 200,000 cells were plated on 2-cm diameter glass coverslips. For FRET experiments, cells were cotransfected with  $0.4 \mu\text{g}$  of FRET sensor DNA and 24 pmol of plasmid DNA expressing either the wild-type or the variant forms of PDE11A. All experiments were performed 48 h after transfection at least in duplicate.

The cAMP sensor (Epac1-camps) was described previously (25). This sensor uses variants of cyan fluorescent protein (CFP) and yellow fluorescent protein (YFP) as FRET donor and acceptor, respectively. cAMP elevation is reported by an increase of the CFP/YFP emission ratio of Epac1-camps.

Cells were maintained in a control Ringer solution containing (in millimoles) NaCl 121.6, KCl 5.4,  $\text{MgCl}_2$  1.8,  $\text{CaCl}_2$  1.8,  $\text{NaHCO}_3$  4,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.8, D-glucose 5, sodium pyruvate 5, and HEPES 10, adjusted to pH 7.4. Control or drug-containing solutions were applied by placing the cell at the opening of a  $250\text{-}\mu\text{m}$  (inner diameter) capillary tube. Images were captured every 5 sec using the  $40\times$  objective of a Nikon TE 300 inverted microscope connected to a software-controlled (Metafluor; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) cooled charge coupled camera (Sensicam PE; PCO, Kelheim, Germany). CFP was excited during 300 msec by a Xenon lamp (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research, Faversham, UK) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 and 535/30, respectively. All experiments were performed at room temperature ( $21\text{--}25 \text{ C}$ ).

Average fluorescence intensity of the entire cell was measured. Background was subtracted, and YFP intensity was corrected for CFP spillover before calculating the ratio. The data were normalized to the ratio measured before the stimulus and expressed as ratio variations, in percentage.

## Statistical analysis

All functional studies were done in triplicate, and an average was calculated for each value; each experiment was repeated at least twice. Quantitative data are expressed as means  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test for expression studies and for FRET measurement and using the nonparametric Mann-Whitney test for cAMP studies. The maximal increase of CFP/YFP ratio was calculated compared with baseline. Then, the comparisons in time courses were performed compared with the wild-type using ANOVA.



A difference was considered significant when  $P$  was  $<0.05$ .

## Results

### PDE11A missense variants in AIMAH and controls

By sequencing the entire *PDE11A* coding sequence in the germline DNA of 46 AIMAH patients, a total of 13 heterozygous missense variants (28%) were found in 13 different patients. Missense variants in AIMAH patients were: R52T ( $n = 1$ ), Y658C ( $n = 1$ ), Y727C ( $n = 6$ ), R804H ( $n = 3$ ), R867G ( $n = 1$ ), and M878V ( $n = 1$ ).

By analyzing the entire *PDE11A* coding sequence in the germline DNA of 192 controls, a total of 14 heterozygous missense variants (7.2%) were found. Missense variants in control subjects were: A349T ( $n = 2$ ), Y727C ( $n = 2$ ), R804H ( $n = 6$ ), and R867G ( $n = 4$ ).

In total, we found a significantly higher number of sequence alterations in the 46 patients with AIMAH compared with those in the 192 controls (28 vs. 7.2%;  $P = 5 \times 10^{-5}$ ; odds ratio, 5.01; 95% confidence interval, 1.96–12.58).

### Functional studies

Functional studies were performed with two variants (D609N and M878V) that were identified in patients with AIMAH in this study for M878V and in a previous study for D609N (21).

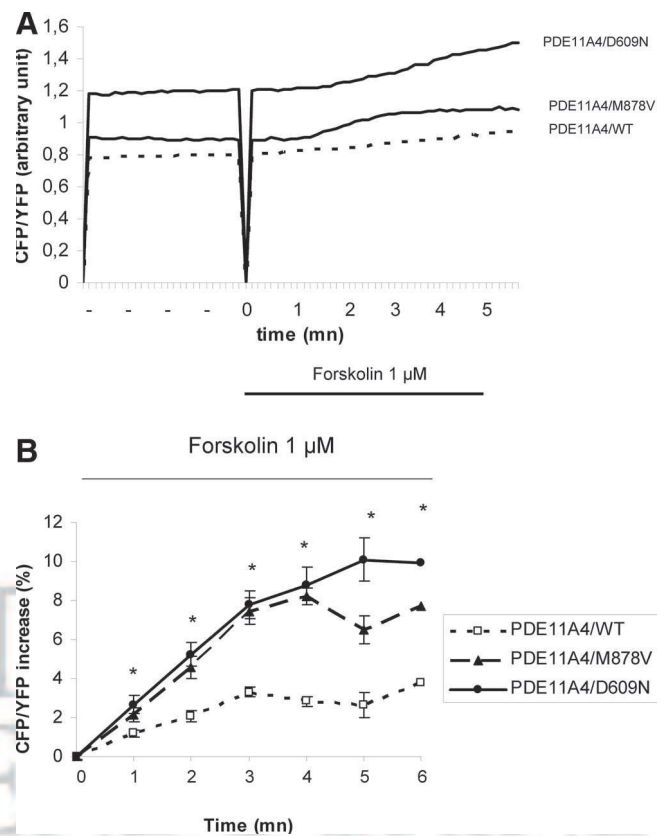
### cAMP levels

Wild-type and variant *PDE11A* (isoform 4, or *PDE11A4*) expression vectors were transfected in both H295R and HEK 293 cells. The expression of the two *PDE11A* variants (D609N and M878V) was similar to the wild-type form as shown by Western blot analysis (Supplemental Data, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). The results of the cAMP-level assay on whole cell extracts are summarized in Fig. 1.

In basal conditions, cAMP levels were statistically different in cells transfected with the M878V-*PDE11A4* expression vectors ( $P < 0.02$ ) and tended to be statistically different in cells transfected with the D609N-*PDE11A4* ( $P = 0.08$ ) compared with the wild-type. Moreover, the wild-type *PDE11A4* blocked the increase of cAMP levels after 3 min of stimulation by forskolin ( $P < 0.05$ ), whereas cAMP levels increased with the two disease-associated *PDE11A* variants, indicating a possible lower catalytic function for both of these variants ( $P < 0.05$ ).

### cAMP dynamics in intact cells

The analysis of cAMP levels in intact living cells by the ratiometric FRET probe Epac1-camps (25) are summarized in Fig. 2. The response to  $1 \mu\text{M}$  forskolin was higher in cells



**FIG. 2.** Effects of *PDE11A4* variants expression on the dynamics of intracellular cAMP analyzed in living cells with FRET measurement. A, Representative traces of CFP/YFP ratio upon forskolin ( $1 \mu\text{M}$ ) in HEK 293 cells transfected with the wild-type *PDE11A* (WT), and with the *PDE11A* variants (*PDE11A4/M878V* and *PDE11A4/D609N*). Forskolin application started at time zero and lasted 5 min. B, Average time course of the normalized CFP/YFP ratio upon forskolin ( $1 \mu\text{M}$ ) stimulation in H293 transfected with the wild-type *PDE11A* cells (WT,  $n = 88$ ), and in cells transfected with the *PDE11A* variants (*PDE11A4/M878V*,  $n = 73$ ; and *PDE11A4/D609N*,  $n = 81$ ). Forskolin application started at time zero and lasted 5 min. \*,  $P < 0.0001$ .

transfected with the two *PDE11A4* variants compared with cells transfected with the wild-type *PDE11A* (M878V =  $7.75 \pm 0.75$ , D609N =  $9.93 \pm 1.11$ , WT =  $3.77 \pm 0.62$  after 5 mn,  $P < 0.0001$ ). Furthermore, the maximal increase of CFP/YFP ratio was earlier in the cells transfected with the variants compared with the wild-type *PDE11A4* (M878V =  $4.3 \pm 0.6$  mn; D609N =  $4.7 \pm 1$  mn; wild-type =  $5.7 \pm 0.7$  mn;  $P < 0.0001$ ).

### cAMP-regulated transcription

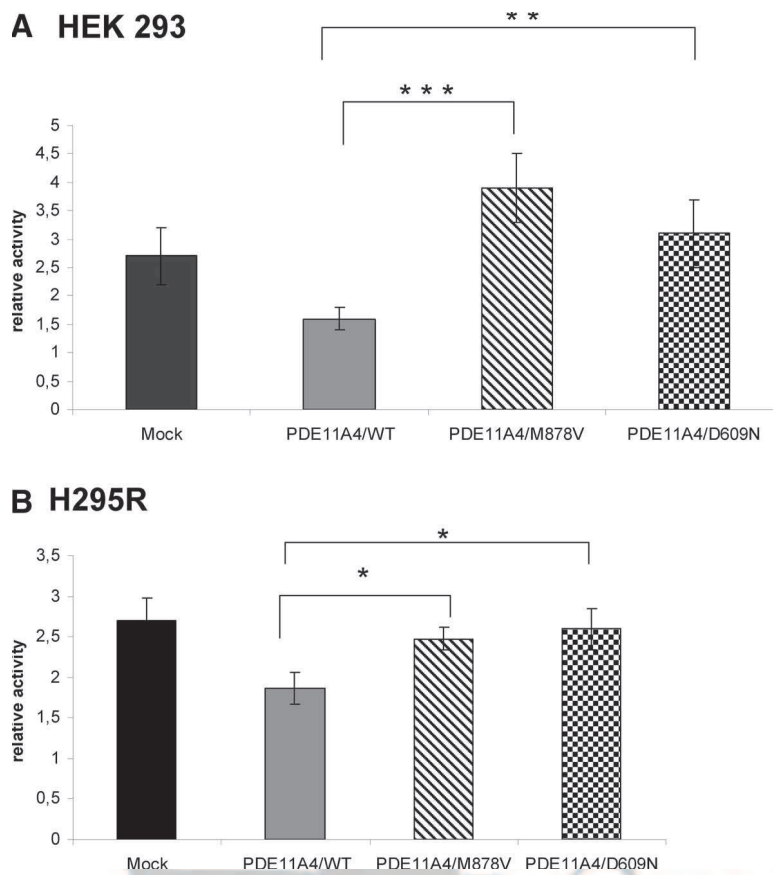
As expected, wild-type *PDE11A4* decreased transcriptional activity of the cAMP reporter construct, whereas D609N and M878V failed to do so in HEK 293 cells ( $P < 0.0004$  for M878V and  $P < 0.003$  for D609N) (Fig. 3A), as well as in H295R cells ( $P < 0.05$  for D609N or M878V compared with wild-type) (Fig. 3B).

In addition, when the P450 side chain cleavage Luc promoter was transfected, relative P450 activity decreased in wild-type compared with mock ( $P < 0.003$  at basal,  $P <$

AQ: 24

F3

F2



**FIG. 3.** Effects of the PDE11A variants on cAMP-dependent transcription. The figure shows the activity of the CRE reporter construct 4x(CRE)-Luc in cells transfected with the PDE11A wild-type (WT) and the PDE11A4/M878V and PDE11A4/D609N expression vectors. A, Results obtained in HEK 293 cells; B, results obtained in H295R cells. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.003$ ; \*\*\*,  $P < 0.0004$ .

0.001 after forskolin), whereas it increased in M878V compared with wild-type ( $P = 0.006$  at basal,  $P < 0.006$  after forskolin). Relative P450 activity tended to increase without achieving significance in D609N after forskolin stimulation (Supplemental Data).

## Discussion

It has been demonstrated by various association studies that genetic factors play a role in the susceptibility to develop cancer. The rarity of endocrine tumors limits the possibility to perform pangenomic studies. However, such approaches have been used for thyroid tumors that are the more frequent endocrine tumors (26). For adrenal lesions, limited studies have been performed. It is tempting to speculate that bilateral adrenocortical tumors are more likely to be favored by genetic factors. Among the rare studies performed, variants of the glucocorticoid receptor have been reported to be more frequent in patients with bilateral adrenal incidentalomas than in those with unilateral masses (27). In a previous study, we have reported that

*PDE11A* variants are more frequent in patients with various types of unilateral and bilateral adrenocortical tumors (21). In that study, the frequency seemed especially higher in patients with bilateral tumors classified as AIMAH, but it only included 20 patients. The present study clearly demonstrates a higher frequency of *PDE11A* variants in a new cohort of patients by comparison with a new cohort of control subjects negative for endocrine tumors. The frequency of *PDE11A* variants in the present control group (7.2%) is similar to the previous control cohort (5.7%). In AIMAH, the present larger cohort of new patients presents a similar percentage of *PDE11A* variants (28%) than in our initial study (24%). This replication of the results in a series of patients and control subjects different from the first analysis strongly supports the value of the association of *PDE11A* variants with the genetic susceptibility to development of AIMAH.

Other PDEs have been implicated in various disorders. Single-nucleotide polymorphisms had been identified in PDE family members and suggested that defects in these genes may contribute to clinical disorders such as schizophrenia (*PDE4B*) (28), stroke (*PDE4D*) (29), retinitis pigmentosa (*PDE6A* and *PDE6B*) (30), chronic lymphocytic leukemia (*PDE7B*) (31), major depression (*PDE1A* and *PDE11A*) (32, 33), chronic obstructive pulmonary disease (*PDE4D*) (34), asthma (*PDE11A*) (35), carotid atherosclerosis (*PDE4D*) (33), testicular germ cell tumors (*PDE11A*) (36), or prostate cancer (*PDE11A*) (37). Variants of *PDE11A* have also been found to be more frequent in patients with Carney complex due to *PRKAR1A* mutations that develop testicular tumors and adrenal Cushing syndrome due to PPNAD (38). It was also shown that two PDEs, *PDE8B* and *PDE11A*, were involved in inherited predisposition to adrenocortical hyperplasia, known as isolated micronodular adrenocortical disease, a nonpigmented variant of PPNAD first described by Stratakis and colleagues (17, 20, 39).

The *PDE11A* variants found in this study have been previously demonstrated to be responsible for reduced enzymatic activity (20). However, the cellular consequences in terms of transcriptional regulation and cAMP dynamics in living cells have not been investigated so far. The human PDE11 family is composed of four splice variants or iso-

forms, namely *PDE11A1*, *PDE11A2*, *PDE11A3*, and *PDE11A4*. *PDE11A4*, which is the longest form among *PDE11A* variants, is predicted to encode a protein of 934 amino acids with two complete GAF domain sequences (GAF A and GAF B) and an N-terminal flanking sequence that contains two consensus sequences for PKA and protein kinase G phosphorylation (40). All *PDE11A* functional variants in AIMAH patients were found in the catalytic domain, except for one variant that was localized in the exon that contains the start codon. The two variants investigated in the present study (D609N and M878V) are located in exons 14 and 22, respectively, of *PDE11A*. They are both in the catalytic domains of *PDE11A4*, located on both far sides of this domain. When expressed transiently in HEK 293 and H295R cells, they both induced similar alterations by comparison with the wild-type *PDE11A*.

The present study shows that expression of the two missense *PDE11A* variants led to increased cAMP-dependent transcription. Transfection with variants of the *PDE11A4* enzyme increased transcriptional activity of the reporter construct compared with transfection with wild-type *PDE11A* in HEK 293 and in adrenocortical H295R cell lines.

Thus, the presence of these variants leads to increased cAMP levels, which in turn activate cAMP signaling. Indeed, cAMP levels were higher in the extracts prepared from cells transfected with the *PDE11A4* variants compared with those with the wild-type *PDE11A4* sequence. In addition, FRET-reporter studies demonstrated that cAMP dynamics are modified in cells transfected with *PDE11A4* variants. Indeed, with both variants, the cAMP increase in response to forskolin was both faster and higher. This alteration of cAMP dynamics is likely to modulate the tone of the cAMP pathway in adrenocortical cells leading to increased activity, especially in response to extracellular stimuli.

In conclusion, this study supports the role of *PDE11A4* variants that stimulate the cAMP pathway as a genetic predisposing factor in AIMAH development. These findings are important to unravel the genetic basis of adrenal tumor development and the design of targeted therapies for the treatment of adrenal Cushing's syndrome.

## Acknowledgments

We thank Franck Letourneur from the Genomic Platform of Institut Cochin for his technical support and Viacheslav Nikolaev for providing us the cAMP sensor (Epac1-camps).

Address all correspondence and requests for reprints to: Jérôme Bertherat, Service d'Endocrinologie, Hôpital Cochin 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: jerome.bertherat@cch.aphp.fr.

This work was supported by the Intramural Program (to A.H., I.L., C.S.) of the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health; and by the Agence Nationale de la Recherche (ANR08-GENOPAT-002; and ANR-10-Blan-1136). D.V. is the recipient of a fellowship from the Institut National du Cancer.

Disclosure Summary: The authors have nothing to declare.

## References

1. Roger PP, Dumont JE 1995 Thyrotropin-dependent insulin-like growth factor I mRNA expression in thyroid cells. *Eur J Endocrinol* 132:601–602
2. Rosenberg D, Groussin L, Bertagna X, Bertherat J 2002 cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors. *Endocr Res* 28:765–775
3. Groussin L, Massias JF, Bertagna X, Bertherat J 2000 Loss of expression of the ubiquitous transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) and compensatory overexpression of the activator CREMtau in the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J Clin Endocrinol Metab* 85:345–354
4. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P 2001 Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev* 22:75–110
5. Vezzosi D, Cartier D, Régnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H, Caron P 2007 Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. *Eur J Endocrinol* 156:21–31
6. Groussin L, Perlempine K, Contesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot P, Schlienger JL, Luton JP, Bertagna X, Bertherat J 2002 The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1980–1985
7. Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn JM, Vaudry H, Lefebvre H 2005 *In vivo* and *in vitro* screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1302–1310
8. Cartier D, Lihmann I, Parmentier F, Bastard C, Bertherat J, Caron P, Kuhn JM, Lacroix A, Tabarin A, Young J, Vaudry H, Lefebvre H 2003 Overexpression of serotonin 4 receptors in cisapride-responsive adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88:248–254
9. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM 1991 Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 325:1688–1695
10. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA 2000 Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- $\alpha$  regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 26:89–92
11. Groussin L, Perlempine K, Contesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot P, Schlienger JL, Luton JP, Bertagna X, Bertherat J 2002 The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1980–1985
12. Groussin L, Horvath A, Jullian E, Boikos S, Rene-Corail F, Lefebvre H, Cephise-Velayoudom FL, Vantghem MC, Chanson P, Conte-Devolx B, Lucas M, Gentil A, Malchoff CD, Tissier F, Carney JA, Bertagna X, Stratakis CA, Bertherat J 2006 A PRKAR1A mutation

- associated with primary pigmented nodular adrenocortical disease in 12 kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1943–1949
13. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, René-Coraïl F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA 2009 Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotypic analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2085–2091
  14. Vezzosi D, Bertherat J 2011 Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur J Endocrinol* 165:177–188
  15. Tsai LC, Shimizu-Albergine M, Beavo JA 2011 The high-affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland. *Mol Pharmacol* 79:639–648
  16. Ceyhan O, Birsoy K, Hoffman CS 2012 Identification of biologically active PDE11-selective inhibitors using a yeast-based high-throughput screen. *Chem Biol* 19:155–163
  17. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libe R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA 2006 A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 38:794–800
  18. Horvath A, Giatzakis C, Tsang K, Greene E, Osorio P, Boikos S, Libe R, Patronas Y, Robinson-White A, Remmers E, Bertherat J, Nesterova M, Stratakis CA 2008 A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Eur J Hum Genet* 16:1245–1253
  19. Horvath A, Mericq V, Stratakis CA 2008 Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 358:750–752
  20. Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, Stein E, Kamvissi V, Soni P, Bossis I, de Herder W, Carney JA, Bertherat J, Gregersen PK, Remmers EF, Stratakis CA 2006 Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 66:11571–11575
  21. Libe R, Fratticci A, Coste J, Tissier F, Horvath A, Ragazzon B, René-Coraïl F, Groussin L, Bertagna X, Raffin-Sanson ML, Stratakis CA, Bertherat J 2008 Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res* 14:4016–4024
  22. Hsiao HP, Kirschner LS, Bourdeau I, Keil MF, Boikos SA, Verma S, Robinson-White AJ, Nesterova M, Lacroix A, Stratakis CA 2009 Clinical and genetic heterogeneity, overlap with other tumor syndromes, and atypical glucocorticoid hormone secretion in adrenocorticotropic-independent macronodular adrenal hyperplasia compared with other adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2930–2937
  23. Libe R, Coste J, Guignat L, Tissier F, Lefebvre H, Barrande G, Ajzenberg C, Tauveron I, Clauser E, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J, Groussin L 2010 Aberrant cortisol regulations in bilateral macronodular adrenal hyperplasia: a frequent finding in a prospective study of 32 patients with overt or subclinical Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 163:129–138
  24. Ragazzon B, Cazabat L, Rizk-Rabin M, Assie G, Groussin L, Fierard H, Perlemonoine K, Martinez A, Bertherat J 2009 Inactivation of the Carney complex gene 1 (protein kinase A regulatory subunit 1A) inhibits SMAD3 expression and TGF  $\beta$ -stimulated apoptosis in adrenocortical cells. *Cancer Res* 69:7278–7284
  25. Nikolaev VO, Bünemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ 2004 Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279:37215–37218
  26. Landa I, Robledo M 2011 Association studies in thyroid cancer susceptibility: are we on the right track? *J Mol Endocrinol* 47:R43–R58
  27. Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, Mondok A, Borgulya G, Panczel P, Prohaszka Z, Racz K 2006 Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2796–2799
  28. Fatemi SH, King DP, Reutiman TJ, Folsom TD, Laurence JA, Lee S, Fan YT, Paciga SA, Conti M, Menniti FS 2008 PDE4B polymorphisms and decreased PDE4B expression are associated with schizophrenia. *Schizophr Res* 101:36–49
  29. Nakayama T, Asai S, Sato N, Soma M 2007 PDE4D gene in the STRK1 region on 5q12: susceptibility gene for ischemic stroke. *Curr Med Chem* 14:3171–3178
  30. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP 2006 Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368:1795–1809
  31. Peiró AM, Tang CM, Murray F, Zhang L, Brown LM, Chou D, Rassenti L, Kipps TA, Insel PA 2011 Genetic variation in phosphodiesterase (PDE) 7B in chronic lymphocytic leukemia: overview of genetic variants of cyclic nucleotide PDEs in human disease. *J Hum Genet* 56:676–681
  32. Wong ML, Whelan F, Deloukas P, Whittaker P, Delgado M, Cantor RM, McCann SM, Licinio J 2006 Phosphodiesterase genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant treatment response. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15124–15129
  33. Liao YC, Lin HF, Guo YC, Yu ML, Liu CK, Juo SH 2010 Sex-differential genetic effect of phosphodiesterase 4D (PDE4D) on carotid atherosclerosis. *BMC Med Genet* 11:93
  34. Homma S, Sakamoto T, Hegab AE, Saitoh W, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Iizuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K 2006 Association of phosphodiesterase 4D gene polymorphisms with chronic obstructive pulmonary disease: relationship to interleukin 13 gene polymorphism. *Int J Mol Med* 18:933–939
  35. DeWan AT, Triche EW, Xu X, Hsu LI, Zhao C, Belanger K, Hellenbrand K, Willis-Owen SA, Moffatt M, Cookson WO, Himes BE, Weiss ST, Gauderman WJ, Baurley JW, Gilliland F, Wilk JB, O'Connor GT, Strachan DP, Hoh J, Bracken MB 2010 PDE11A associations with asthma: results of a genome-wide association scan. *J Allergy Clin Immunol* 126:871–873.e9
  36. Horvath A, Korde L, Greene MH, Libe R, Osorio P, Fauz FR, Raffin-Sanson ML, Tsang KM, Drori-Herishanu L, Patronas Y, Remmers EF, Nikita ME, Moran J, Greene J, Nesterova M, Merino M, Bertherat J, Stratakis CA 2009 Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 69:5301–5306
  37. Fauz FR, Horvath A, Rothenbuhler A, Almeida MQ, Libe R, Raffin-Sanson ML, Bertherat J, Carraro DM, Soares FA, Molina Gde C, Campos AH, Alexandre RB, Bendhack ML, Nesterova M, Stratakis CA 2011 Phosphodiesterase 11A (PDE11A) genetic variants may increase susceptibility to prostatic cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E135–E140
  38. Libe R, Horvath A, Vezzosi D, Fratticci A, Coste J, Perlemonoine K, Ragazzon B, Guillaud-Bataille M, Groussin L, Clauser E, Raffin-Sanson ML, Siegel J, Moran J, Drori-Herishanu L, Fauz FR, Lodish M, Nesterova M, Bertagna X, Bertherat J, Stratakis CA 2011 Frequent phosphodiesterase 11A gene (PDE11A) defects in patients with Carney complex (CNC) caused by PRKAR1A mutations: PDE11A may contribute to adrenal and testicular tumors in CNC as a modifier of the phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E208–E214
  39. Rothenbuhler A, Horvath A, Libe R, Fauz FR, Fratticci A, Raffin-Sanson ML, Vezzosi D, Azevedo M, Levy I, Almeida MQ, Lodish M, Nesterova M, Bertherat J, Stratakis CA 2012 Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (PDE8B), a cAMP specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in a cohort of patients with adrenal tumors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77:195–199
  40. Yuasa K, Omori K, Yanaka N 2000 Binding and phosphorylation of a novel male germ cell-specific cGMP-dependent protein kinase-anchoring protein by cGMP-dependent protein kinase Ia. *J Biol Chem* 275:4897–4905

## 1.2 Article 2

**Frequent phosphodiesterase 11A gene (*PDE11A*) defects in patients with Carney Complex (CNC) caused by *PRKAR1A* mutations: *PDE11A* may contribute to adrenal and testicular tumors in CNC as modifier of the phenotype.**

Rossella Libé, Anelia Horvath, Delphine Vezzosi, Amato Frattici, Joel Coste, Karine Perlemoine, Bruno Ragazzon, Marine Guillaud-Bataille, Lionel Groussin, Eric Clauser, Marie-Laure Raffin-Sanson, Jennifer Siegel, Jason Moran, Limor Drori-Herishanu, Fabio Rueda Faucz, Maya Lodish, Maria Nesterova, Xavier Bertagna, Jérôme Bertherat, Constantine Stratakis.

Le complexe de Carney est une forme rare de néoplasie endocrine multiple familiale décrite pour la première fois au milieu des années 80, responsable non seulement de tumeurs endocrines (corticosurrénale, hypophyse et thyroïde) mais également de multiples lésions non endocrines telles que des myxomes cardiaques, des tumeurs testiculaires, des schwannomes mélanocytiques, des myxomes mammaires et cutanés ainsi que des lésions cutanées pigmentées. Le gène responsable du complexe de Carney codant pour la sous unité régulatrice 1A de la protéine kinase A (*PRKAR1A*), situé sur le chromosome 17q22-24 a été identifié il y a 12 ans. Une mutation germinale inactivatrice du gène de la *PRKAR1A* est retrouvée chez près de 60% des patients. Chez ces patients porteurs d'une mutation du gène de la *PRKAR1A*, des corrélations entre le phénotype et le génotype ont été décrits (18). Cependant des questions demeurent. Ainsi, par exemple, la sévérité de l'atteinte surrénalienne, atteinte endocrine la plus fréquente, est variable même chez des patients porteurs de la même mutation (18). L'hypothèse de ce travail était que la présence de variants génétiques de *PDE11A* pouvait jouer le rôle de modificateur du phénotype dans cette population de patients avec un complexe de Carney. Deux atteintes du complexe de Carney ont été particulièrement étudiées dans ce travail, la dysplasie micronodulaire bilatérale pigmentée des surrénales d'une part, les tumeurs testiculaires calcifiées à grandes cellules de Sertoli d'autre part. Il avait en effet préalablement été montré que des variants de *PDE11A* étaient présents à une

Résultats expérimentaux : Conséquences de la présence des variants de PDE11A chez des patients avec une tumeur de la surrénale

fréquence élevée chez des patients sans complexe de Carney mais avec des tumeurs de la corticosurrénale ou des tumeurs germinales testiculaires (311, 332, 399).

## Frequent Phosphodiesterase 11A Gene (*PDE11A*) Defects in Patients with Carney Complex (CNC) Caused by *PRKAR1A* Mutations: *PDE11A* May Contribute to Adrenal and Testicular Tumors in CNC as a Modifier of the Phenotype

Rossella Libé,\* Anelia Horvath,\* Delphine Vezzosi, Amato Fratticci, Joel Coste, Karine Perlempine, Bruno Ragazzon, Marine Guillaud-Bataille, Lionel Groussin, Eric Clauser, Marie-Laure Raffin-Sanson, Jennifer Siegel, Jason Moran, Limor Drori-Herishanu, Fabio Rueda Faucz, Maya Lodish, Maria Nesterova, Xavier Bertagna, Jerome Bertherat,\* and Constantine A. Stratakis\*<sup>†</sup>

**Background:** Carney complex (CNC) is an autosomal dominant multiple neoplasia, caused mostly by inactivating mutations of the regulatory subunit 1A of the protein kinase A (*PRKAR1A*). Primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) is the most frequent endocrine manifestation of CNC with a great inter-individual variability. Germline, protein-truncating mutations of phosphodiesterase type 11A (*PDE11A*) have been described to predispose to a variety of endocrine tumors, including adrenal and testicular tumors.

**Objectives:** Our objective was to investigate the role of *PDE11A* as a possible gene modifier of the phenotype in a series of 150 patients with CNC.

**Results:** A higher frequency of *PDE11A* variants in patients with CNC compared with healthy controls was found (25.3 vs. 6.8%,  $P < 0.0001$ ). Among CNC patients, those with PPNAD were significantly more frequently carriers of *PDE11A* variants compared with patients without PPNAD (30.8 vs. 13%,  $P = 0.025$ ). Furthermore, men with PPNAD were significantly more frequently carriers of *PDE11A* sequence variants (40.7%) than women with PPNAD (27.3%) ( $P < 0.001$ ). A higher frequency of *PDE11A* sequence variants was also found in patients with large-cell calcifying Sertoli cell tumors (LCCSCT) compared with those without LCCSCT (50 vs. 10%,  $P = 0.0056$ ). *PDE11A* variants were significantly associated with the copresence of PPNAD and LCCSCT in men: 81 vs. 20%,  $P < 0.004$ ). The simultaneous inactivation of *PRKAR1A* and *PDE11A* by small inhibitory RNA led to an increase in cAMP-regulatory element-mediated transcriptional activity under basal conditions and after stimulation by forskolin.

**Conclusions:** We demonstrate, in a large cohort of CNC patients, a high frequency of *PDE11A* variants, suggesting that *PDE11A* is a genetic modifying factor for the development of testicular and adrenal tumors in patients with germline *PRKAR1A* mutation. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: E208–E214, 2011)

Carney complex (CNC) is an autosomal dominant multiple neoplasia characterized by myxomas, spotty skin pigmentation, and endocrine overactivity (1) that is caused mostly by inactivating mutations of the regulatory

subunit 1A of the protein kinase A (PKA) or cAMP-dependent protein kinase (*PRKAR1A*) (2, 3). Recently, a transatlantic consortium studied 353 patients with CNC; pathogenic *PRKAR1A* mutations were reported in 73%

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2011 by The Endocrine Society

doi: 10.1210/jc.2010-1704 Received July 23, 2010. Accepted September 27, 2010.

First Published Online November 3, 2010

\* R.L., A.H., J.B., and C.A.S. have contributed equally to the conception and execution of all experiments and the writing of the manuscript.

<sup>†</sup> Author affiliations are shown at the bottom of the next page.

Abbreviations: ADT, Adrenocortical tumors; CI, confidence interval; CNC, Carney complex; CRE, cAMP response element; LCCSCT, large-cell calcifying Sertoli cell tumors; OR, odds ratio; PDE, phosphodiesterase; PKA, protein kinase A; PPNAD, primary pigmented nodular adrenocortical disease; RSV, Rous sarcoma virus; siRNA, small inhibitory RNA; TGCT, testicular germ cell tumor.

of the patients, who carried a total of 80 different *PRKAR1A* mutations (4). Although some phenotype-genotype correlation emerged in this analysis, many questions remained unanswered. For example, the severity of primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD), the most frequent endocrine manifestation of CNC (1), varied considerably among patients with the same mutation, even between members of the same family (4).

As in other genetic disorders, we wondered what other genetic (and other) factors may influence the expression of CNC. Among the many possibilities, obvious candidates are the genes coding for phosphodiesterases (PDEs). Germline, protein-truncating mutations of PDE type 11A (*PDE11A*) have been described to predispose to a variety of adrenal hyperplasias, including PPNAD (5). *PDE11A* is highly polymorphic in the general population (6). We recently showed that inactivating *PDE11A* sequence variants appear to predispose to not only adrenocortical tumors (ADT) but also testicular germ cell tumors (TGCT) (6–8). The effect of *PDE11A* genetic variants appears to be limited to steroidogenic tissues, because in a recent study of sporadic GH-secreting tumors, the frequency of *PDE11A* missense variants was found only slightly increased compared with that in control patients (9). *In vitro* studies of *PDE11A* sequence variants that were predicted *in silico* to have an effect on function showed that indeed enzymatic activity was decreased, leading to higher levels of cAMP and/or cGMP in HeLa or HEK293 cells (5, 6, 8).

The above observations led us to investigate *PDE11A* as a possible gene modifier of the phenotype in patients with CNC, as has been suggested for other diseases caused by mutations in tumor suppressor genes (7, 8, 10). We used the same population of patients that were studied by the consortium (4) and examined in particular the possible modification by *PDE11A* genetic variants of the adrenal (PPNAD) and testicular [large-cell calcifying Sertoli cell tumors (LCCSCT)] phenotype of patients with germline *PRKAR1A* mutations. Small inhibitory RNA (siRNA) studies were then used to study a possible effect of partial *PDE11A* inactivation on *PRKAR1A* and PKA activities. The data appear to support the hypothesis that *PDE11A* may be a significant gene modifier of the phenotype in CNC by affecting PKA activity.

## Patients and Methods

### Patients and control subjects

The institutional review boards of the participating research centers have approved the genetic and clinical studies of patients with CNC. All patients and controls signed informed consent for genetic testing and for the analysis of the collected data. Of the 353 patients that were reported by the consortium (4), we selected for inclusion in this study those who met the diagnostic criteria for CNC (4, 11) and were found to have a pathogenic *PRKAR1A* mutation (11); there were 150 patients that met these criteria and for whom DNA was available. We also tested 26 CNC patients without *PRKAR1A* mutations.

Control subjects were recruited by Cochin Hospital, Paris, France, as part of a clinical protocol that studies the genetic predisposition to endocrine tumors. All 279 controls were examined by a senior endocrinologist to exclude personal or family history, and any clinical signs suggestive of a genetic syndrome or any endocrine neoplasia, including pituitary, thyroid or adrenal tumors. The control group was matched in the distribution of gender and age ( $\pm 5$  yr) with that of the CNC patients.

### DNA preparation and sequencing studies

DNA was extracted from blood samples as described previously (7). Sequencing of the *PRKAR1A* gene (Ensembl protein coding gene ENSG00000108946) in our patients has been described before (4). For all 150 *PRKAR1A* mutation carriers and the 279 controls, the 20 coding exons (exons 3–23) and flanking intronic sequences of the *PDE11A* gene (Ensembl protein coding gene ENSG00000128655) were amplified by PCR using specific primers, as previously described (7). All amplified samples were examined by agarose gel electrophoresis to confirm successful amplification of each exon. Direct sequencing of the purified fragments was then performed using the Genetic Sequencer ABI3100 Applied Biosystems (Foster City, CA) apparatus.

### siRNA studies

Human embryonic kidney HEK293 cells were cultured as previously described (4) in 12-well plates ( $3 \times 10^5$  cells per well) and were transfected with Lipofectamine 2000 reagent (Lipo2000; Invitrogen Life Technologies, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's instructions. A cAMP/PKA pathway reporter construct driving the expression of luciferase gene was used for all expression studies: 4x cAMP response element (CRE)-Luc (Stratagene, La Jolla, CA) with a basic promoter element (TATA box) joined to four CRE repeats. The Rous sarcoma virus (RSV)-Renilla construct, containing the RSV promoter-enhancer inserted upstream of the coding sequence of the Renilla luciferase (Promega Corp., Charbonnière, France), was used as a control for transfection efficiency. The sequence of the siRNA that was used for targeting *PRKAR1A* was UGAAUGGGCAACCAGU-GUUDtT (siR1A), for *PDE11A* was ACUAUCGGAUGGUUC-



UUAAdTdT (siPDE11A), and for the siRNA control was CAGUCGCGUUUGCGACUGGdTdT (siCtr) (MWG, Ebersberg, Germany). Cells were cotransfected with 20 pmol of siR1A and/or 60 pmol of siPDE11A and adjusted to 80 pmol final with the siCtr, 10 ng of the RSV-Renilla, and 250 ng of the luciferase reporter construct and lysed, and both firefly and Renilla luciferase activities were sequentially measured with the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega). Results are expressed as firefly luciferase activity normalized to Renilla luciferase activity of the same sample. The experiment was performed in triplicate.

### Statistical analysis

Quantitative variables were described using means and SD. Qualitative variables were described using percentages. Conditional polytomous logistic regression was used to estimate odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for carrying *PDE11A* mutations among the groups of CNC patients (with or without PPNAD/LCCST) relative to the gender/age-matched control group. The  $\chi^2$ , Pearson, or Fisher test (as appropriate) was used to compare *PDE11A* mutation rates between groups of patients. Two-tailed *P* values were used. *P* values <0.05 were considered to indicate significance.

For siRNA studies, data are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test, and significance was set at *P* < 0.05.

## Results

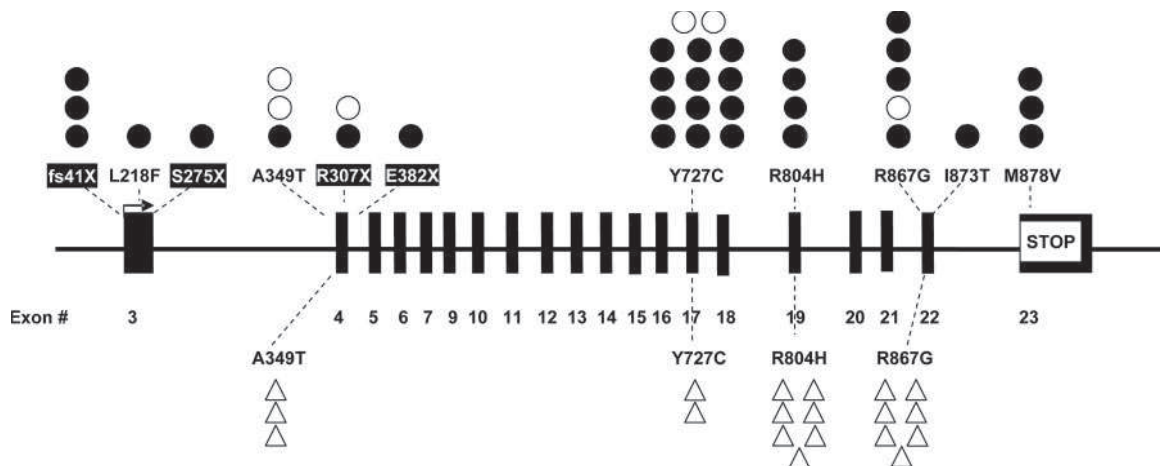
### Clinical description of patients with CNC caused by *PRKAR1A* mutations

A total of 150 CNC patients were studied. They all carried a germline inactivating mutation of the *PRKAR1A* gene (Table 1). Seventy-four patients (49.3%) were unrelated probands, and 76 (50.7%) were relatives of an index case. A total of 110 patients (74%) were female, and 40 were male (26%). Among the endocrine manifestations, PPNAD was the most common diagnosis; it was clinically proven in 104 patients (69.3%). In 15 patients (10%), PPNAD was the only manifestation of CNC. The mean  $\pm$  SD age at diagnosis of PPNAD was 26  $\pm$  13.3 yr (range 2–65). Forty-six patients (30.6%) presented with some

**TABLE 1.** Main clinical characteristics and *PDE11A* mutations in the 38 patients with CNC due to *PRKAR1A* mutations

Patient	Sex	PPNAD (Y/N)	Age at PPNAD diagnosis (yr)	LCCSCT (Y/N)	<i>PRKAR1A</i> mutation cDNA	<i>PDE11A</i> mutations cDNA	<i>PDE11A</i> mutations protein	Consequence of <i>PPDE11A</i> mutation
1	M	Y	46	Y	c.974-1G→A	c.2618T→C	I873T	Missense
2	M	Y	25	Y	c.502 + 1G→A	c.2599C→G	R867G	Missense
3	M	Y	41	Y	c.1083delA	c.2180A→G	Y727C	Missense
4	M	Y	35	Y	c.491-492delTG	c.171Tdel	T58PfsX41	Codon stop
5	M	Y	14	Y	c.891 + 3A→G	c.2599C→G	R867G	Missense
6	M	Y	27	Y	c.491-492delTG	c.171Tdel	T58PfsX41	Codon stop
7	M	Y	57	Y	c.891 + 3A→G	c.2599C→G	R867G	Missense
8	M	Y	9	Y	c.528-531delGATTins11	c.2632A→G	M878V	Missense
9	M	Y	16	Y	c.682C→T	c.2599C→G	R867G	Missense
10	M	Y	13	N	c.709(-7-2)del6	c.2180A→G	Y727C	Missense
11	M	Y	20	N	c.769 + 5G→C	c.1045G→A	A349T	Missense
12	F	Y	20	N	c.709(-7-2)del6	c.919C→T	R307X	Codon stop
13	F	Y	17	N	c.709(-7-2)del6	c.2411G→A	R804H	Missense
14	F	Y	27	N	c.709(-7-2)del6	c.2180A→G	Y727C	Missense
15	F	Y	8	N	c.891 + 3A→G	c.2632A→G	M878V	Missense
16	F	Y	15	N	c.763-764delAT	c.2180A→G	Y727C	Missense
17	F	Y	26	N	c.550(-9-2)del8	c.2411G→A	R804H	Missense
18	F	Y	11	N	c.845-846 ins A	c.2411G→A	R804H	Missense
19	F	Y	27	N	c.709(-5-107)del 103	c.2180A→G	Y727C	Missense
20	F	Y	21	N	c.709(-7-2)del6	c.1142G→T	E382X	Codon stop
21	F	Y	9	N	c.279-282delTAGG	c.2180A→G	Y727C	Missense
22	F	Y	16	N	c.440 + 1G→A	c.171Tdel	T58PfsX41	Codon stop
23	F	Y	30	N	c.865 G→T	c.2180A→G	Y727C	Missense
24	F	Y	2	N	c.491-492delTG	c.2411G→A	R804H	Missense
25	F	Y	42	N	c.738T→G	c.824C→A	S275X	Codon stop
26	F	Y	12	N	c.353-365del13	c.2180A→G	Y727C	Missense
27	F	Y	12	N	c.709(-7-2)del6	c.652C→T	L218F	Missense
28	F	Y	42	N	c.502 + 1G→A	c.2180A→G	Y727C	Missense
29	F	Y	19	N	c.43-58del16	c.2632A→G	M878V	Missense
30	F	Y	35	N	c.491-492delTG	c.2180A→G	Y727C	Missense
31	F	Y	22	N	c.491-492delTG	c.2180A→G	Y727C	Missense
32	F	Y	24	N	c.491-492delTG	c.2180A→G	Y727C	Missense
33	F	N		N	c.763-764delAT	c.2180A→G	Y727C	Missense
34	F	N		N	c.408-412delGCTGT	c.2180A→G	Y727C	Missense
35	F	N		N	c.709(-7-2)del6	c.2599C→G	R867G	Missense
36	F	N		N	c.709(-7-2)del6	c.1045G→A	A349T	Missense
37	F	N		N	c.709(-7-2)del6	c.1045G→A	A349T	Missense
38	F	N		N	c.709(-7-2)del6	c.919C→T	R307X	Codon stop

F, Female; M, male; N, no; Y, yes.



**FIG. 1.** Localization of codon stop mutations (black boxes) and missense variants (no boxes) on the 23 exons of the *PDE11A* gene (coding starts from exon 3 and ends with exon 23). ●, CNC patients with PPNAD; ○, CNC patients without PPNAD; △, controls.

other manifestation of CNC but not PPNAD. The most frequent was LCCSCT, a tumor that was present in 18 of 40 men (45%). Thyroid adenomas were present in 52 patients (34%), whereas thyroid cancer was diagnosed in seven (4%). Ovarian lesions were seen in 23 of 110 female patients (21%). GH-producing pituitary adenomas were diagnosed in 20 patients (13%). Pigmented lesions were the most frequent nonendocrine component of CNC that was seen in our patients; lentiginosis was observed in 101 patients (67%), and other pigmented lesions (as blue, Spitz, and compound nevi and café-au-lait spots) were seen in 70 (46%). Cardiac myxoma was diagnosed in 60 patients (40%), whereas skin and breast myxomatosis were seen in 38 (25%) and 28 patients (18%), respectively. Psammomatous melanotic schwannoma was found in 16 patients (10%).

#### ***PDE11A* sequence defects in CNC patients with *PRKAR1A* mutations and controls**

By sequencing the entire *PDE11A* gene in 150 CNC patients, we found 38 point mutations (25.3%) leading to missense substitutions (31 patients) or premature stop codon and nonsense mRNA (seven patients), all of them in the heterozygous state (Table 1 and Fig. 1). Four of these sequence defects (I873T, E382X, S275X, and L218F) have never been reported previously. The distribution of *PDE11A* sequence variants was similar between related and unrelated patients; 18 mutation carriers were observed in the group of 74 unrelated patients (24.3%), and 20 in the group of 76 relatives (26.3%).

We found no nonsense *PDE11A* mutations in the 279 controls. In the same group, four missense variants in a total of 19 individuals (6.8%) were found, all of which have been reported previously in the general population: R804H (seven individuals), R867G (seven), A349T (three), and Y727C (two) (Fig. 1). All variants were

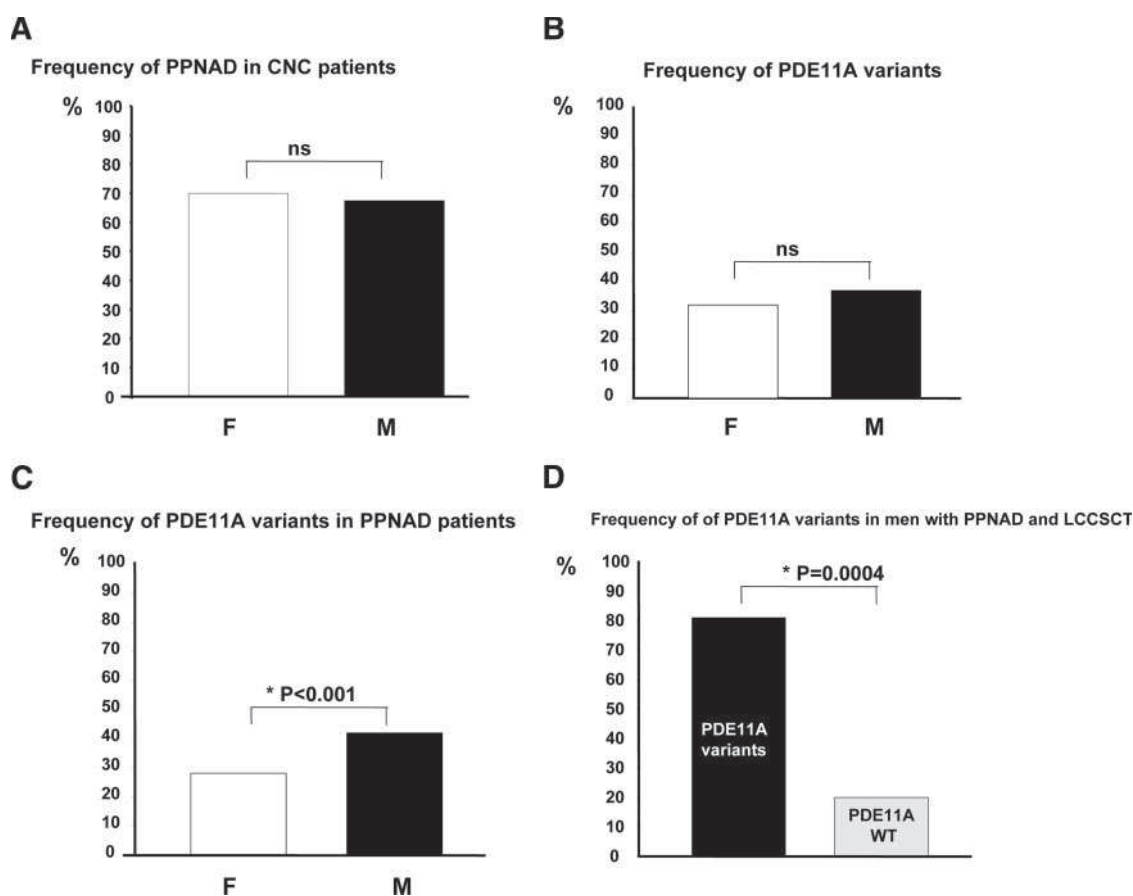
present in heterozygote state. Thus, there was an overall significantly higher frequency of *PDE11A* mutations in CNC patients compared with those in the 279 control subjects (25.3 vs. 6.8%,  $P < 0.0001$ ). The OR for a *PDE11A* defect to be with a *PRKAR1A* mutation was 3.85 (CI = 1.07–2.82;  $P = 0.0004$ ). Because there was no difference in PPNAD frequency between the two genders (70 vs. 67.5%, Fig. 2A), there were no differences in the frequency of *PDE11A* sequence variants between men and women (Fig. 2B), and the presence of the *PDE11A* defect was not associated with the status of an index case; *PDE11A* sequence variants were seen in 24.3% of unrelated (index) cases and 26.3% of related patients (vs. 6.8% of controls,  $P < 0.0001$ ).

#### ***PDE11A* sequence defects in CNC patients without *PRKAR1A* mutations**

By sequencing the entire *PDE11A* gene in 26 CNC patients without *PRKAR1A* mutations, we found eight (30.7%) point mutations (seven missense and one codon stop mutation); this was not significantly different compared with the frequency among CNC patients with *PRKAR1A* mutations.

#### ***PDE11A* sequence variants in *PRKAR1A* mutation carriers and PPNAD**

CNC patients with PPNAD ( $n = 79$ ) had a higher frequency of *PDE11A* sequence variants than the controls (27.8 vs. 6.8%, OR = 5.28; CI = 2.56–10.96;  $P = 0.0001$ ). CNC patients without PPNAD ( $n = 39$ ) had a 10.3% frequency of *PDE11A* sequence variants, a percentage that was not significantly different from the controls (OR = 1.56; CI = 0.52–4.68). In addition, all of the *PDE11A* sequence variants present in CNC patients without PPNAD were missense, and most had previously been described and were also present in the



**FIG. 2.** Relationship between PDE11A variants and clinical characteristics of patients with CNC. A, Frequency of PPNAD in CNC patients according to the gender: white bar, women; black bar, men. B, Frequency of PDE11A sequence variants in women (white bar) and men (black bar) with CNC. C, Gender distribution of PDE11A sequence variants in CNC patients with PPNAD: white bar, women; black bar, men. \*,  $P < 0.001$ . D, Frequency of men with PPNAD and LCCSCT with PDE11A sequence variants (black bar), and men with PPNAD and LCCSCT without PDE11A sequence variants (gray bar). \*,  $P = 0.0004$ .

group of controls (*i.e.* R867 and A349T). When the two groups of CNC patients were compared, patients with PPNAD were significantly more frequently carriers of PDE11A sequence variants (30.8 vs. 13%,  $P = 0.025$ ). Men with PPNAD were significantly more frequently carriers of PDE11A sequence variants (40.7%) than women with PPNAD (27.3%) ( $P < 0.001$ , Fig. 2C).

#### PDE11A sequence variants in PRKAR1A mutation carriers and LCCSCT

A higher frequency of PDE11A sequence variants was found in CNC patients with LCCSCT (nine of 18) compared with those without LCCSCT (two of 20) (50 vs. 10%,  $P = 0.0056$ ). Moreover, CNC men with LCCSCT (just like those with PPNAD) had significantly higher frequency of PDE11A sequence variants than age-matched control men with a fairly high OR (OR = 20.33; CI = 0.46–9.04;  $P < 0.0001$ ). PDE11A sequence variants were significantly associated with the copresence of PPNAD with LCCSCT; nine of 11 men (81%) with both tumors had a PDE11A sequence variant, whereas only six of 29 patients without a PDE11A

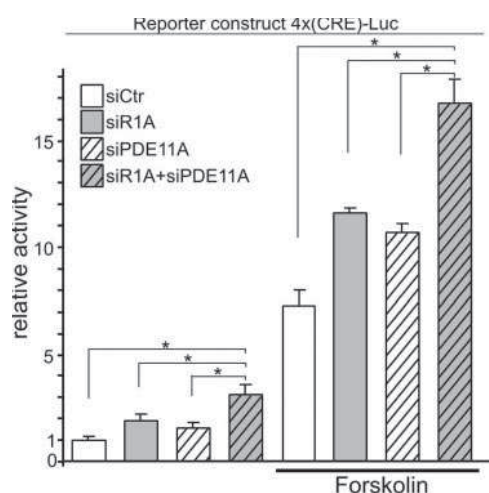
sequence variant (20%) had both PPNAD and LCCSCT ( $P < 0.004$ , Fig. 2D).

#### Other CNC manifestations

No association was found between the presence of PDE11A sequence variants and any of the other CNC manifestations that we studied, such as pituitary and thyroid adenomas, thyroid cancer, ovarian and pigmented lesions, and cardiac, skin, and breast myxomas.

#### Functional studies

We then examined the effects of PRKAR1A and/or PDE11A silencing on PKA-dependent transcription; PRKAR1A or PDE11A inactivation in HEK293 cells increased both basal (+84% and +55% from siCtr, respectively) and FK-induced (+60% and +48% from siCtr, respectively) transcriptional activity of the reporter construct. An additive effect was observed by the concurrent inactivation of both PRKAR1A and PDE11A, both in basal conditions (+208% from siCtr) and after FK (+130% from siCtr) (Fig. 3).



**FIG. 3.** *PRKAR1A* and *PDE11A* silencing increase PKA-dependent transcription at baseline and after forskolin stimulation. *PRKAR1A* inactivation (gray bars), *PDE11A* inactivation (white striped bars) in HEK293 cells increases transcriptional activity of the reporter construct; coinactivation of *PRKAR1A* and *PDE11A* (gray striped bars) led to an additive effect, and similar results were found after forskolin stimulation. \*,  $P < 0.05$ .

## Discussion

Recently, the interest in modifier genes in the study of monogenic diseases has grown because of the recognition that most genotype-phenotype correlations could only be explained with additional genetic factors that modulate the expression of a given trait (12, 13). Susceptibility genes, which are genes with functional variants that affect the cause of disease, are routinely being identified for simple Mendelian traits and, more recently, for common genetic disorders. Modifier genes are distinct from susceptibility genes, in that they usually represent relatively frequent genetic variants that affect the clinical manifestation of a disease; one of the first examples of the existence of such modifiers was in cystic fibrosis (14–16). In endocrinology, the first monogenic disorder to be shown to be affected by genetic variants of modifier genes was idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (17, 18). A similar polygenic model for susceptibility to TGCT has also been proposed (19–21). More recently, our group showed a higher frequency of *PDE11A* variants in patients with ADTs and TGCTs, suggesting that *PDE11A* can act as a genetic predisposition factor to adrenal and testicular tumor development (7, 8).

The present study suggests that *PDE11A* can act as a modifier of the phenotype in CNC patients, at least in regard to the incidence of PPNAD. The development of a second tumor, interestingly a testicular one, LCCSCT, may also be affected by the presence of *PDE11A* sequence variants, although our numbers could not exclude the influence of the copresence of PPNAD in these

patients. These data confirm the important role of *PDE11A* as a molecule with specific impact on adrenal tumorigenesis, as previously reported (7).

It was very interesting that men with *PDE11A* sequence variants were particularly more prone to develop PPNAD (along with LCCSCT) than women. Generally, PPNAD is more frequent in women than in men (71 vs. 29%), as we recently reported (4). The fact that in this study, which studied CNC patients carriers of *PRKAR1A* mutations, *PDE11A* variants were more frequent in men, might explain why the frequency of PPNAD was similar in men and women. This reinforces the idea that *PDE11A* plays an important modifier role in predisposition to PPNAD.

The genetic data are confirmed by the functional studies that demonstrated in H293 cell line an additive effect of the simultaneous inactivation of *PRKAR1A* and *PDE11A* on the transcriptional activity increase, under basal conditions and after stimulation by forskolin. These data seem to corroborate the idea that the lack of *PDE11A* increases the PKA-dependent transcription.

Finally, the fact that *PDE11A* is highly expressed in steroidogenic tissues, such as adrenal cortex and testis, may explain the specificity of this gene in increasing predisposition to adrenal and testicular tumors.

In conclusion, we found in a large cohort of patients with CNC due to *PRKAR1A* mutations (in particular with PPNAD and LCCSCT), a high frequency of *PDE11A* variants, supporting the notion that *PDE11A* may act as a genetic predisposition factor and/or modifier in adrenal and testicular tumorigenesis. These data also suggest that in CNC, as in other diseases, multiple genetic factors are responsible for the phenotypic variability, as for adrenal and testicular tumor susceptibility.

## Acknowledgments

We thank the patients and their families who participated in our research studies and donated their time for this investigation.

Address all correspondence and requests for reprints to: Prof. Jérôme Bertherat, Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, Hôpital Cochin, Pavillon Cornil, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France. E-mail: jerome.bertherat@cch.aphp.fr.

This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR06-MRAR-007 and ANR08-GENOPAT-002) and, in part, by the National Institute of Child Health and Human Development, intramural National Institutes of Health (NIH) project Z01-HD-000642-04 to C.S., and, in part, by the NIH Clinical Center.

Disclosure Summary: All the authors have nothing to declare.

## References

1. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL 1985 The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)* 64:270–283
2. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA 2000 Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- $\alpha$  regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 26:89–92
3. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA, Stratakis CA 2000 Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet* 9:3037–3046
4. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libé R, René-Corail F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA 2009 Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2085–2091
5. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libé R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA 2006 A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 38:794–800
6. Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, Stein E, Kamvissi V, Soni P, Bossis I, de Herder W, Carney JA, Bertherat J, Gregersen PK, Remmers EF, Stratakis CA 2006 Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 66:11571–11575
7. Libé R, Fratticci A, Coste J, Tissier F, Horvath A, Ragazzon B, René-Corail F, Groussin L, Bertagna X, Raffin-Sanson ML, Stratakis CA, Bertherat J 2008 Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res* 14:4016–4024
8. Horvath A, Korde L, Greene MH, Libé R, Osorio P, Faucz FR, Raffin-Sanson ML, Tsang KM, Drori-Herishanu L, Patronas Y, Remmers EF, Nikita ME, Moran J, Greene J, Nesterova M, Merino M, Bertherat J, Stratakis CA 2009 Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 69:5301–5306
9. Peverelli E, Ermetici F, Filopanti M, Elli FM, Ronchi CL, Mantovani G, Ferrero S, Bosari S, Beck-Peccoz P, Lania A, Spada A 2009 Analysis of genetic variants of phosphodiesterase 11A in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 161:687–694
10. Pharoah PD, Dunning AM, Ponder BA, Easton DF 2004 Association studies for finding cancer-susceptibility genetic variants. *Nat Rev Cancer* 4:850–860
11. Horvath A, Bertherat J, Groussin L, Guillaud-Bataille M, Tsang K, Cazabat L, Libé R, Remmers E, René-Corail F, Faucz FR, Clauser E, Calender A, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA 2010 Mutations and polymorphisms in the gene encoding regulatory subunit type 1- $\alpha$  of protein kinase A (PRKAR1A): an update. *Hum Mutat* 31:369–379
12. Nadeau JH 2001 Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2:165–174
13. Nadeau JH 2003 Modifier genes and protective alleles in humans and mice. *Curr Opin Genet Dev* 13:290–295
14. Haston CK, Hudson TJ 2005 Finding genetic modifiers of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353:1509–1511
15. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrach RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR 2005 Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353:1443–1453
16. Badano JL, Katsanis N 2002 Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* 3:779–789
17. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, Strauss KA, Shneider BL, Lim WA, Salen G, Morton DH, Bull LN 2003 Complex inheritance of familial hypercholesterolemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet* 34:91–96
18. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, Plummer L, Hughes V, Seminara S, Cheng YZ, Li WP, Maccoll G, Eliseenkova AV, Olsen SK, Ibrahim OA, Hayes FJ, Boepple P, Hall JE, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley W 2007 Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 117:457–463
19. Krausz C, Looijenga LH 2008 Genetic aspects of testicular germ cell tumors. *Cell Cycle* 7:3519–3524
20. Oosterhuis JW, Looijenga LH 2005 Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5:210–222
21. Crockford GP, Linger R, Hockley S, Dudakia D, Johnson L, Huddart R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaiti-Pellié C, Heidenreich A, Albers P, Olah E, Gecki L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA, Guilford P, Fosså SD, Heimdal K, Tjulandin SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Forman D, Oliver T, Einhorn L, McMaster M, Kramer J, Greene MH, Weber BL, Nathanson KL, Cortessis V, Easton DF, Bishop DT, Stratton MR, Rapley EA 2006 Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumour susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 15:443–451

## 2 Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

Les adénomes de la corticosurrénale sont des lésions bénignes pouvant être non sécrétantes ou sécrétantes. Lorsqu'elles sont sécrétantes, elles peuvent sécréter soit des minéralocorticoïdes (adénomes de Conn), soit des glucocorticoïdes (adénomes cortisoliques). Les mécanismes moléculaires responsables de ces hypersécrétions hormonales sont mal connus. Des avancées majeures ont été réalisées récemment dans les adénomes de Conn puisque des mutations somatiques du gène *KCNJ5* codant pour un canal potassique ont été décrites dans ces tumeurs (400). Ces mutations activent la voie de signalisation du calcium et augmentent donc la production d'aldostérone (400). Aucune mutation de ce type n'a jusqu'à présent été mise en évidence dans les adénomes cortisoliques. Dans les conditions physiologiques, la synthèse du cortisol est régulée par l'ACTH qui, en se liant à son récepteur, le récepteur à la mélanocortine active la voie AMPc/PKA. Les adénomes cortisoliques sont capables de synthétiser du cortisol en dépit d'une ACTH basse. Le profil d'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse et certains facteurs de transcription d'adénomes cortisoliques et de la surrénale saine adjacente a dès à présent été comparé (401, 402). Il avait ainsi en particulier pu être montré que la production de cortisol dans les adénomes cortisoliques étaient associée à une augmentation de l'expression des enzymes nécessaires à la production des corticostéroïdes.

L'objectif de ce travail était d'évaluer les gènes dont la modulation d'expression favorise l'apparition des adénomes cortisoliques. Nous avons donc par l'intermédiaire de l'analyse du transcriptome comparé les profils d'expression génique d'une population d'adénomes non sécrétants à une population d'adénomes cortisoliques. L'activité PKA et les niveaux d'AMPc ont parallèlement été mesurés.

Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

**Identification of gene expression profiles associated with cortisol secretion in adrenocortical adenomas. Soumis au Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**

Delphine Vezzosi\* <sup>1,2,3</sup>, Hortense Wilmot Roussel\* <sup>1,2,4</sup>, Marthe Rizk-Rabin <sup>1,2</sup>, Olivia Barreau <sup>1,2,4</sup>, Bruno Ragazzon <sup>1,2</sup>, Fernande René-Corail <sup>1,2</sup>, Aurélien de Reynies <sup>5</sup>, Jérôme Bertherat <sup>1,2,4</sup>, Guillaume Assié <sup>1,2,4</sup>

1-Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, 75014 Paris, France

2- Faculté de Médecine Paris Descartes, Université Paris Descartes, 75005 Paris, France

3-Department of Endocrinology, Hôpital Larrey, 31480 Toulouse, France

4- Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, APHP, 75014 Paris, France

5- Plateforme de Bioinformatique, Carte d'Identité des Tumeurs, Ligue contre le Cancer, 75013, Paris, France

\* Delphine Vezzosi and Hortense Wilmot Roussel contributed equally to this study

**Keywords:** adrenocortical adenoma, cortisol secretion, phosphodiesterase 8B, cAMP pathway, transcriptome

Abbreviations: ACTH: Adrenocorticotrop hormone; cAMP: cyclic AMP; PKA: protein kinase A.

Corresponding author: Jérôme Bertherat. Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, Centre de Référence des Maladies Rares de la Surrénale, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg St Jacques, 75014 Paris, France

E-mail : [jerome.bertherat@cch.aphp.fr](mailto:jerome.bertherat@cch.aphp.fr), Téléphone : +33144412390, Fax: +33146338060

## Abstract

**Context:** adrenocortical adenomas can be either hormonally silent or responsible for hypercortisolism. The mechanisms leading to the autonomous hypersecretion of cortisol are unknown.

**Objective:** to identify the molecular alterations contributing to the autonomous and excessive cortisol secretion of adrenocortical adenomas.

**Patients and Methods:** the transcriptomes of 22 unilateral adrenocortical adenomas (5 non-secreting, 6 subclinical cortisol-producing, 11 cortisol-producing) were studied and correlated with cortisol secretion. Phosphodiesterase 8B (PDE8B) expression was measured by Western Blot. Cyclic AMP (cAMP) levels and protein kinase A (PKA) activity was studied in 25 adenomas.

**Results:** unsupervised clustering identifies two groups of adenomas with a difference in secretion level ( $p=0.008$ ). Cluster 1 includes only cortisol-producing adenomas (8 out of 11), while Cluster 2 is an

admixture of the non-secreting, the subclinical cortisol-secreting and 3 of the 11 cortisol-secreting adenomas (Fisher exact  $p=0.002$ ). This cluster is driven by genes related to cortisol secretion and to extracellular matrix.

More than three thousand genes correlate with cortisol secretion. Among the positively correlated are the steroidogenic enzymes, genes involved in cholesterol metabolism and glutathione S-transferases. Among the negatively correlated genes are genes related to transcripts translation and the transcription factor GATA-6.

The PDE8B, which inactivates the PKA pathway, unexpectedly showed the strongest positive correlation with cortisol secretion, confirmed by Western Blot. Accordingly, the cAMP was low in cortisol-producing adenomas ( $p=0.009$ ). Despite low cAMP levels, PKA activity remained unchanged, suggesting constitutive activation.



**Conclusion:** The transcriptome of adrenocortical adenomas reveals a major association with cortisol secretion and identifies specific groups of genes implicated in steroid secretion.

## Introduction

Steroid hormones serve many essential roles in mammalian physiology, ranging from promoting development to the regulation of metabolism. Under physiological conditions, cortisol biosynthesis is primarily regulated by the peptide hormone adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which, upon binding to the melanocortin 2 receptor, activates a cyclic AMP(cAMP)/protein kinase A (PKA)-dependent pathway. ACTH stimulation of the adrenal cortex is required for cortisol secretion, as ACTH deficiency leads to adrenal cortex atrophy and cortisol deficiency.

The second messenger, cAMP, is shown to be one of the most important regulatory signals for the control of

cortisol steroidogenesis. Indeed, in vitro, ACTH can stimulate a continuous increase in cAMP levels in the culture medium and cAMP analogs can induce the enzymes to the same levels as ACTH stimulation (1). Moreover, alterations of various components of the cAMP pathway from the cell surface to the nucleus have been observed in adrenal Cushing's syndrome: somatic activating Gs mutations in McCune-Albright syndrome, illegitimate expression of membrane receptors in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia, inactivating mutations of the regulatory subunit R1A of PKA and inactivating mutations of the phosphodiesterases 8B et 11A (for review see (403)).

Adrenocortical adenomas are benign tumors that can cause ACTH-independent hypercortisolism. The molecular mechanisms responsible for cortisol overproduction in spite of low circulating ACTH levels are not well understood. Recently, major advances have

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

been made in understanding aldosterone-producing adenomas with the identification of the potassium channel KCNJ5 mutations activating calcium signalling (400). No such mutation in the other adrenocortical adenomas has been reported. The expression profiles of several steroid-metabolizing enzymes and transcription factors from normal adjacent adrenals and cortisol-producing adenomas were compared (401, 402). It was shown that elevated production of cortisol in cortisol-producing adenomas is associated with increased expression of enzymes needed for corticosteroid production, along with alterations in transcription factors that enhance the expression of cortisol-metabolizing enzymes. However, a majority of these works do not provide a detailed confrontation between secretion level and gene expression. Indeed, the tumors are usually classified as secreting or non-secreting, irrespective of the differences in secretion level. The

condition of subclinical Cushing Syndrome has been especially poorly explored.

The aim of this work is to identify the molecular alterations contributing to the autonomous and excessive cortisol secretion of adrenal adenomas. To that end, we confront a fine hormonal characterization of adrenocortical adenomas with the transcriptome, with validation at the protein level. PKA activity and cAMP levels are also measured.

## Patients and methods

### Patients

Forty patients with operated unilateral adrenocortical benign tumors were included. Surgery was indicated either for potential malignancy and/or cortisol secretion. Twenty-two tumors were used for the transcriptome, and 25 tumors (including 7 also included in the transcriptome series) were studied by Western Blot, PKA activity or cAMP levels.

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

The tumor samples were prospectively collected in the COrticoMEdullosurrénaux, Tumeur Endocrine network (COMETE) tumor bank (404). Informed signed consent for the analysis of the tumors and access to the data collected was obtained from all the patients, and the study was approved by the Institutional Review Board of the Cochin Hospital.

### **Hormonal exploration**

A detailed clinical and hormonal exploration was performed preoperatively, including one or two (median = 1.5) 24-hour free urinary cortisol collections from each patient (CORT-CT2 competition RIA kits, CIS Bio International, Gif sur Yvette), a midnight plasma cortisol measurement (Immulite 2000 Cortisol; Diagnostics Products Corp., Los Angeles, CA) and an early morning ACTH measurement (ELSA-ACTH; Cisbio International; Gif Sur Yvette, France). A dexamethasone suppression test was performed preoperatively following different

procedures: 1 mg at midnight suppression test (n = 7), standard 2mg per day suppression test (n = 9), 8 mg at midnight suppression test (n = 5). A short Synacthen test was performed postoperatively in 21 patients.

Cortisol-producing adenomas were defined by typical clinical signs and symptoms of Cushing's syndrome and elevated free urinary cortisol excretion (> 90 mg/day). Subclinical cortisol-producing adenomas were defined by the absence of clinically overt Cushing's Syndrome, normal 24-hour free urinary cortisol (< 90 mg/day), and at least one biological alteration among the following: incomplete dexamethasone suppression (morning plasma cortisol of 28, 32 and 49 ng/ml after 1 mg of dexamethasone at midnight (n=3), or 24-hour free urinary cortisol between 11 and 21 mg per day during day 2 of the standard 2 mg per day dexamethasone suppression (n=2)), low 8h plasma ACTH (< 10 pg/mL) or disruption of plasma cortisol circadian rhythm (0h to

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

8h serum cortisol ratio > 0.5). Non-secreting adenomas were defined by the absence of clinical Cushing's syndrome and a normal response to the tests described previously. For one non-secreting adenoma, the suppression test, the midnight cortisol and the 24-hour free urinary cortisol were missing, but the patient had a normal morning ACTH preoperatively and presented no adrenal insufficiency a few days after surgery, in addition to the absence of any clinical sign of hypercortisolism. For one subclinical cortisol-producing adenoma, the 24-hour free urinary cortisol was missing, but the morning ACTH was not low (12 pg/ml), and the morning plasma cortisol was partially suppressed (49 ng/ml) after 1 mg of dexamethasone at midnight, in addition to the absence of any clinical Cushing.

### **RNA extraction and microarray experiments**

Each tumor was snap frozen immediately after surgery and kept in

liquid nitrogen until use. RNA extraction was performed as previously described in 22 unilateral adenomas (404). Microarray experiments were performed as previously described, using Affymetrix U133 Plus 2.0 chips (404). The full dataset can be found at [Array Express](http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress) (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, experiment E-TABM-311). The sample numbers and the corresponding cortisol and tumor weights are provided in supplemental table 1.

### **Western Blot experiments**

The PDE8B protein was studied in 25 tumors, including 12 cortisol-producing adenomas, 11 non-secreting adenomas and 2 subclinical cortisol-producing adenomas. Seven of these tumors (one non-secreting adenoma, four cortisol-producing adenomas and two subclinical cortisol-producing adenomas) were common with the transcriptome cohort.

Tissue samples were lysed in buffer containing (in mM) Tris-HCl 50 pH 7.4,

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

NaCl 150, EDTA 5, EGTA 1, triton X-100 1%, protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics, Meylan, France) and centrifuged for 10 min at 800xg. Proteins in the supernatant were quantified using a BCA assay (Sigma, St. Louis, MO, USA). Similar amounts of proteins were separated on a 10% SDS-PAGE, then electrotransferred to PVDF membrane and analyzed by immunoblotting. The rabbit polyclonal antibody specific for *PDE8B* (ab14621; Abcam) was used as directed by the manufacturers at a dilution of 1:200. The signals were digitized with the Gene Tool analysis system.

### **cAMP assay**

cAMP concentration were determined in tissue samples using commercially available assay (Direct cAMP EIA kit, Enzo Life sciences) following the manufacturer's instructions. The assay is based on competitive binding, in which endogenous cAMP levels

compete with a fixed amount of alkaline phosphate-labeled cyclic nucleotides. The assay is colorimetric and absorbance is read at 405 nm.

### **Protein kinase A activity (PKA)**

PKA activity was measured in the tumor samples using Peptag non-radioactive cAMP-dependent protein kinase assay (V5340; Promega) as previously described (405). All the samples were treated together, in duplicates, and loaded in the same electrophoretic gel; the density under UV light was simultaneously measured using the Genetools 1.0 software (SYNGENE, Frederick, Maryland, USA). The basal PKA activity represents the difference between the ratio of the phosphorylated and the non-phosphorylated forms, without and with PKA inhibitor (40 ng/ml, Promega).

### **Bioinformatic and statistical analyses**

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

All the transcriptome analyses were carried out using “R” (406). The transcriptome data was normalized using the RMA method (407). Unsupervised hierarchical clustering was generated with the “heatmap” function, using the “Euclidean” metrics and the “Ward” method, considering the top 1135 genes with the highest variation among the adenomas (coefficient of variation 0.2 or higher). The LIMMA test was used for supervised group comparisons (LIMMA R package). The Spearman coefficient was used to correlate expression of each gene and secretion. Multiple testing was corrected with the Benjamini-Hodgberg false discovery rate assessment for all tests.

The functional annotation of gene lists was performed with the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7, using Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) annotations (10).

The PDE8B expression (Western Blot), cAMP assay, and PKA activity were

compared between secreting and non-secreting adenomas using the non-parametric Mann-Whitney U test.

## Results

### Patient's characteristics

The clinical and biological characteristics of the patients are provided in table 1. Nineteen female and 3 males with a median age of 51.5 years (35-78 years) were included. Average body mass index was 29 kg/m<sup>2</sup> (20-38). Five patients presented with non-secreting adenomas, 11 patients with cortisol-producing adenomas and 6 patients with subclinical cortisol-producing adenomas.

Twenty-four-hour free urinary cortisol was 409 mg/day, 23 mg/day and 33.5 mg/day in cortisol-producing adenomas, subclinical cortisol-producing adenomas and non-secreting adenomas respectively. Plasma cortisol at midnight was 189.5 ng/mL, 58 ng/mL and 26 ng/mL in cortisol-producing adenomas, subclinical cortisol-producing adenomas and non-

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

secreting adenomas respectively. ACTH levels at 8h were 4 pg/ml, 11.5 pg/ml and 18.5 pg/ml in cortisol-producing adenomas, subclinical cortisol-producing adenomas and non-secreting adenomas respectively.

### **Unsupervised clustering identifies two types of adenomas**

The 22 adenomas were sorted according to their gene expression profiles using hierarchical unsupervised clustering. Two groups could be identified (figure 1A). These 2 groups show a difference in secretion level ( $p=0.008$ , figure 1B). Of interest, considering the secretion profile, is the fact that the distribution of the adenomas among the 2 groups was not random: cluster 1 included only cortisol-producing adenomas, whereas cluster 2 was an admixture of the 6 subclinical cortisol-producing adenomas, the five non-secreting adenomas, and three (out of eleven) cortisol-producing adenomas (Fisher  $p=0.002$ , figure 1A).

Comparing the clinical features of the three cortisol-producing adenomas from cluster 2 to the cortisol-producing adenomas from cluster 1, no major clinical difference could be identified (age, sex, BMI, tumor size, secretion).

The gene expression driving the cluster is provided as supplementary data (supplemental table 2a). The gene list includes the majority of genes (almost 80%) that correlate with cortisol secretion (as defined below), reflecting the difference in cortisol secretion levels between cluster 1 and cluster 2. Once these genes are filtered out, a reduced list of genes remains, with a strong enrichment in genes related to the extracellular matrix, almost all overexpressed in cluster 1 (supplemental table 2b).

### **Correlation between spontaneous secretion and gene expression**

To identify the genes implied in cortisol secretion, the transcriptome of the adenomas and the 24-hour free urinary

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

cortisol were considered. The latter was reported to the adenoma weight, to better reflect the steroidogenic activity at the cell level. All the genes were tested for their correlation with cortisol secretion. Tables 2A and 2B provide the top list of genes positively (2A) and negatively (2B) correlated with cortisol secretion (adjusted  $p < 0.05$ ; the full tables are provided as supplemental tables 3A and 3B).

### *Genes positively correlated with cortisol secretion*

Considering the 347 probesets positively correlated with a p-value of 0.00123 or less (fdr adjusted p-value  $\leq 0.1$  or less; correlation coefficient  $\geq 0.7$ ), functional annotation showed a significant enrichment in lipid and steroid metabolism biological processes in mitochondria and endoplasmic reticulum cellular components (supplemental table 3A). These functional annotations mainly reflect the molecular machinery that is necessary for cortisol synthesis. Among those genes

were the steroidogenic enzymes (supplemental figure 1), and genes implied in cholesterol metabolism (supplemental figure 2).

Glutathione S-transferases were also strongly represented (MGST1, GSTA3, MGST3, GSTA4, GSTA1; correlation coefficients of 0.83, 0.80, 0.80, 0.69, 0.62 respectively). The latter protect active steroidogenic cells against the reactive oxygen species produced during steroidogenesis (408).

Finally, neither NR5A1 (SF1) nor NR0B1 (DAX1) showed any consistent correlation with cortisol secretion (correlation coefficients of -0.05 and 0.31; adjusted p-values 0.96 and 0.60). A specific list of transcription factors that correlate with cortisol secretion is provided as supplemental table 4.

### *Genes negatively correlated with cortisol secretion*

The 300 probesets negatively correlated with a p-value of 0.00123 or less



## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

( $\text{fdr adjusted p-value} \leq 0.1$ , correlation coefficient  $\leq -0.7$ ) show significant enrichment in genes related to transcript translation (supplemental table 3B).

Among the genes with the strongest negative correlation was the transcription factor GATA6 (correlation coefficient: -0.91).

### **Phosphodiesterase 8B (PDE8B) is increased in cortisol-producing adenomas**

Several genes related to the cAMP pathway were correlated with cortisol secretion (figure 2). Among these genes was PDE8B, showing one of the strongest correlations with cortisol secretion (table 2, figure 3A). Western Blot analysis confirmed PDE8B protein overexpression in cortisol-producing adenomas compared to non-secreting adenomas (figure 3B).

PDE8B inhibits the protein kinase A pathway by degrading cAMP. To measure the functional impact of the PDE8B increase, we measured the cAMP

levels in the adenomas. The cAMP was lower in cortisol-producing adenomas compared to non-secreting adenomas ( $p=0.009$ , figure 3C).

To test the impact of the decreased cAMP on the PKA pathway, we measured the PKA activity in the adenomas directly. Despite the lower cAMP levels, there was no decrease in PKA activity in the cortisol-producing adenomas (figure 3D).

## **Discussion**

By analyzing gene expression profile in adrenocortical adenomas, this study clearly demonstrates a major association between cortisol secretion and transcriptome. Several studies have focused on the expression of selected genes in cortisol-producing adenomas (402, 409). Few studies considered the transcriptome of cortisol-secreting tumors (401). Other studies focused on benign cortisol-producing tumors, but mainly in bilateral forms, without focusing on the cortisol

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

secretion per se (389, 409). Finally, several studies dealt with the transcriptome of malignant tumors (for review, (410)), with no specific focus on hormone secretion. Of note, a majority of these works on carcinomas considered the adenomas as a reference, showing a higher expression of genes related to steroidogenesis in the adenomas. To our knowledge, the present work is the largest cohort of benign cortisol-producing tumors so far. In addition, a detailed hormonal workup provides a detailed secretion pattern for each tumor. The fine correlation between detailed clinical investigations and transcriptome analysis allows us to perform a potent correlation to identify the gene involved in the cortisol secretory status of these adrenocortical adenomas. Among the limitations of this work is the consideration of messenger RNA level for assessing gene expression, when some genes are known to be regulated at the post-translational level (for instance, the StAR gene) (411). This could be overcome

for PDE8B with a downstream biochemical study, but this was not done for the others genes.

Unsupervised clustering of the adenomas identified two groups. This classification further extends into the benign tumors the transcriptome-based classification of the adrenocortical tumors previously established for the malignant tumors (410). This classification has functional implications. Indeed, one of the two groups is composed only of cortisol-producing adenomas, while the other is an admixture of non-secreting adenomas, subclinical cortisol-producing adenomas and a few cortisol-producing adenomas. Beyond the difference in cortisol secretion, original pathophysiological information came out by considering the genes differentially expressed between these two groups. After filtering out the genes correlated with cortisol secretion, a striking enrichment in genes related to the extracellular matrix was identified.

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

Extracellular microenvironment can orchestrate functions such as cell proliferation, migration, differentiation and apoptosis (412). Previous studies showed growth-promoting effects of the extracellular matrix environment on bovine and human fetal adrenocortical cells in culture (413). Moreover, it has been demonstrated that the extracellular matrix components modulate the profile of steroidogenesis by human fetal adrenal cells (414). The importance of the extracellular matrix on the benign adrenal tumorigenesis deserves further study.

The genes involved in cortisol secretion were identified by an original approach. The transcriptome was correlated with the quantitative measurement of spontaneous cortisol production, measured by the 24-hour free urinary cortisol. This value was divided by the tumor weight in order to better reflect the cortisol production at the cell level. Considering this continuous measurement

generated a more precise analysis and overcame the classical problem of categorizing the subclinical cortisol-producing adenomas in the cortisol-producing versus non-secreting comparison.

We could identify the list of genes directly involved in cortisol production. Among them were the steroidogenic enzymes, as previously identified (401, 402, 409, 415, 416).

A detailed picture of cholesterol metabolism could be identified, originally showing that all the pathways leading to cholesterol increase —e.g. de novo synthesis, HDL capture and LDL capture— seem activated for cortisol production.

Glutathione S-transferases were also strongly represented. Glutathione S-transferase isoenzymes are essential antioxidants that act either directly as a reductant or as a substrate for antioxidant enzymes and ensure the reduction of oxidants and the neutralization of

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

peroxydes (for review, (417)). These peroxydes are side-products of the steroidogenesis (418). Therefore, the correlation between glutathione S-transferases and cortisol secretion probably reflects the necessary detoxification process associated with steroidogenesis. It has been shown previously that in H295R cell line, the levels of glutathione transferase isoenzyme increased after addition of forskolin, an activator of adenylate cyclase (419).

Several transcription factors correlated with cortisol secretion. GATA6 showed a strong negative correlation with cortisol secretion. GATA-6 is abundantly expressed throughout development in both the mouse and human adrenal cortex (420). GATA-6 has roles in the development and differentiation of adrenocortical cells and in the regulation of steroidogenesis (421). Specifically, GATA-6 acts in synergy with SF-1, enhancing the transactivation of genes encoding StAR, CYP11A1 (P450<sub>scc</sub>), CYP17 and

dehydroepiandrosterone-sulfotransferase (SULT2A1), all necessary for adrenal steroid biosynthesis (422). GATA-6 has also been linked to adrenal androgen production (422). It has been shown previously that GATA-6 levels are usually lower than normal in human adrenal tumors (423). Moreover, GATA-6 was lower in carcinomas as compared to adenomas (424). Of note, neither NR5A1 (SF-1), a steroidogenic cell-specific activator of various steroidogenic *P450* genes, nor the other major regulator of steroidogenesis NR0B1 (DAX1) showed any strong correlation with cortisol secretion, despite their major implication in adrenal development and in steroidogenesis regulation (for review, (425)). Finally, among the transcription factors negatively correlated were NR2F2 (COUPTFII). NR2F2 is a member of the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) and is an orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily. It has been shown

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

previously that COUP-TF plays an important role in the regulation of steroidogenesis in human adrenals (426). COUP-TFs negatively regulate the transcriptional activity of SF1. It was demonstrated by Western Blot that COUP-TFII was reduced in cortisol-producing adenomas compared to normal adrenals (427). Consistent with these previous results, we demonstrate that COUP-TFII was reduced in cortisol-producing adenomas compared to non-secreting adenomas.

Two other transcription factors, NR4A1 (NUR77) and NR4A2 (NURR1), were also negatively correlated with cortisol secretion. NR4A1 and NR4A2 are members of the nuclear receptor superfamily and are involved in the transcriptional regulation of several steroidogenic enzyme genes in gonads and adrenals. In the adrenal gland, a role for NR4A1 in the regulation of CYP21, CYP11B2 and HSD3B2 gene transcription has been demonstrated, suggesting it may

regulate cortisol, aldosterone and androgen production (428). Moreover, it was shown that NR4A2 immunoreactivity was higher in aldosteronomas than in cortisol-producing adenomas (429).

cAMP/PKA pathway activation is the only known signaling alteration that has been related to abnormal cortisol secretion so far (430). Several genes controlling this pathway were correlated to cortisol secretion, either positively or negatively. The specific cell surface melanocortin 2 receptor (MC2R) is strongly correlated with cortisol secretion. It was demonstrated that MC2R has a key role in postnatal adrenal development and adrenal steroidogenesis (431).

The adrenergic receptor gene, ADRA2A, was also correlated with cortisol secretion. It was demonstrated that ADRA2A was overexpressed in AIMAH versus normal adrenal (432). ADRA2A is able to stimulate cortisol production

through activation of phospholipase C (433).

Several phosphodiesterases showed a correlation with cortisol secretion. Among those was the PDE8B, showing one of the strongest positive correlations with cortisol secretion. PDE8B inactivation on transgenic mice has shown its major role in glucocorticoid secretion regulation (139). Inactivating mutations of PDE8B are involved in the pathogenesis of some bilateral adrenocortical diseases (307). Therefore, overexpression of PDE8B is paradoxical, as it inactivates the PKA pathway by degrading the cAMP (139). This PDE8B increase in cortisol-producing adenomas seems to have a functional impact, as ascertained by the lower cAMP level in these tumors. However, despite a decreased cAMP level, the PKA activity was not decreased in cortisol-producing adenomas. This raises the hypothesis of a PKA pathway activation occurring downstream to cAMP, similar to what is observed in the Carney Complex (434).

Indeed, inactivating mutations of PRKAR1A and decreased PRKAR2B protein levels have been both observed in some adrenocortical adenomas (434). If such a hypothesis was confirmed, then potentially the PDE8B increase would be the mark of negative feedback, dedicated to lowering an aberrantly activated pathway. This hypothesis would need further confirmation, and the molecular mechanisms are yet to be established.

### **Conclusion**

The transcriptome identifies two types of cortisol-producing adenomas, one more prone to overt cortisol production, the other more heterogeneous. A large number of genes are correlated with cortisol secretion in these tumors, including the steroidogenic machinery and specific transcription factors. This study also supports the concept that PDE8B might tend to counteract the effects of constitutive activation of PKA in cortisol-producing adenomas.

## **Acknowledgments**

We thank Karine Perlemoine for excellent technical assistance and Xavier Bertagna, Rossella Libé and Lionel Groussin for helpful discussion. This work was supported by the Carte d'Identité des Tumeurs program from La Ligue Contre le

Cancer (France). This work was also supported in part by the Plan Hospitalier de Recherche Clinique Grant AOM06179 (to the COrtico-MEdullo Tumeurs Endocrines-Institut national du cancer Network) and the Cony-Maeva Foundation.

D.V. is a recipient from the Institut National du Cancer (INCa).

**Table 1: Clinical characteristics of patients included in the transcriptome analysis**

Dexamethasone suppression was defined by a morning plasma cortisol below 18 ng/mL after 1 mg of dexamethasone at midnight, or during day 2 of the standard 2 mg per day suppression test, or by a 24-hour free urinary cortisol lower than 5 µg per day during day 2 of the 2 mg suppression test. Incomplete suppression included morning plasma cortisol between 28 to 49 ng/ml after 1 mg of dexamethasone at midnight, or 24-hour free urinary cortisol between 11 and 21 µg/day. No suppression included 24-hour free urinary cortisol of 438µg per day or more during day 2 of the 2 mg suppression test, and morning plasma cortisol of 187 ng/ml or more after dexamethasone suppression. \*: p < 0.05 versus secreting adenomas

	<b>Cortisol-producing adenomas n = 11</b>	<b>Subclinical cortisol-producing adenomas n = 6</b>	<b>Non-secreting adenomas n = 5</b>	<b>Total n = 22</b>
<b>Age (year)</b>	42	52	55	51.5
Range	35-58	36-78	39-68	35-78
<b>Sex</b>				
Male	1	1	1	3
Female	10	5	4	19
<b>Body Mass Index (kg/m2)</b>	29	26.5	28	29
Range	20-32	21-38	25-38	20-38
<b>Adrenal weight (g)</b>	14	33*	20.9	18.5
Range	10-141	18.5-94	11.8-30	10-141
<b>Largest diameter of the adrenal (cm)</b>	3.5	4.5	3.5	4
Range	2-5	3-8	3-8	2-8
<b>24-hour Free Urinary Cortisol (mg/day)</b>	409	23*	33.5*	131
Range	84-759	12-68	23-63	12-1249
Data not available	0	1	1	2
<b>Plasma Cortisol at midnight (ng/mL)</b>	189.5	58*	26*	144
Range	144-233	32-146	24-40	12-233
Data not available	3	1	2	6
<b>Dexamethasone suppression</b>				
Yes	0	0	4	4
Incomplete	0	5	0	5
No	8	0	0	8
Data not available	3	1	1	5
<b>ACTH levels at 8h am (pg/mL)</b>	4	11.5	18.5*	7
Range	2-8	3-22	14-36	2-36
Data not available	2	2	1	5
<b>Renin (pg/ml)</b>	6.5	5	7	6
Range	1-106	3-8	3-18	1-106
Data not available	3	0	1	4



## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

<b>Aldosterone (pg/ml)</b>	34.5	103.5	99	86
Range	10-150	25-170	20-152	10-170
Data not available	3	0	1	4
<b>Androgens</b>				
<b>Testosterone (ng/ml) in female</b>				
Range	0.15	0.1	0.2	0.1
Data not available	0.1-3.2	0.1-0.2	0.2-0.2	0.1-3.2
	2	0	0	2
<b>sDHEA (mg/ml) in male and female</b>				
Range	0.2	0.1	0.3	0.1
Data not available	0-2.3	0-0.1	0.1-0.7	0-2.3
	2	0	1	3

**Table 2: Top genes with expression correlated with cortisol secretion**

Table 2A: Top genes with expression **positively** correlated with cortisol secretion

Affymetrix ProbeSetID	Gene Title	Gene Symbol	Correlation (Spearman)	p-value (undadjusted)	Adjusted p-value
1 223568_s_at	HTPAP protein	HTPAP	0.89	0	0
2 215945_s_at	tripartite motif-containing 2	TRIM2	0.87	0	0
3 200967_at	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	PPIB	0.87	0	0
4 213228_at	phosphodiesterase 8B	PDE8B	0.86	0	0
5 219402_s_at	Der1-like domain family, member 1	DERL1	0.86	0	0
6 235029_at	SLD5 homolog	SLD5	0.85	0	0
7 216607_s_at	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	CYP51A1	0.85	0	0
8 201568_at	low molecular mass ubiquinone-binding protein (9.5kD)	QP-C	0.84	0	0
9 243894_at	solute carrier family 41, member 2	SLC41A2	0.84	0	0
10 201387_s_at	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase)	UCHL1	0.84	0	0
11 201634_s_at	outer mitochondrial membrane cytochrome b5	CYB5-M	0.84	0	0
12 1565162_s_at	microsomal glutathione S-transferase 1 solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	MGST1	0.83	5.5E-07	0.0017
13 209610_s_at	member 4	SLC1A4	0.83	1.8E-06	0.004
14 224918_x_at	microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	0.83	1.8E-06	0.004
15 228222_at	---	---	0.83	1.8E-06	0.004
16 231736_x_at	microsomal glutathione S-transferase 1 fascin homolog 1, actin-bundling protein (Strongylocentrotus purpuratus)	MGST1	0.83	1.8E-06	0.004
17 210933_s_at	purpuratus)	FSCN1	0.83	3.2E-06	0.0068
18 205896_at	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4 solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	SLC22A4	0.83	4.7E-06	0.0078
19 209611_s_at	member 4	SLC1A4	0.83	4.7E-06	0.0078
20 225829_at	PDZ domain containing 8	PDZK8	0.83	4.7E-06	0.0078
21 229907_at	Solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2	SLC18A2	0.83	4.7E-06	0.0078
22 201120_s_at	progesterone receptor membrane component 1	PGRMC1	0.82	8.2E-06	0.011
23 205502_at	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	CYP17A1	0.82	8.2E-06	0.011
24 222686_s_at	hypothetical protein FLJ11151	FLJ11151	0.82	8.2E-06	0.011
25 225235_at	transmembrane 4 superfamily member 17	TM4SF17	0.82	1.2E-05	0.016
26 212228_s_at	coenzyme Q9 homolog (S. cerevisiae)	COQ9	0.82	1.7E-05	0.021
27 206132_at	mutated in colorectal cancers sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, fungal)-like	MCC	0.82	1.9E-05	0.021
28 211423_s_at	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	SC5DL	0.82	1.9E-05	0.021
29 217871_s_at	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	MIF	0.82	1.9E-05	0.021
30 212811_x_at	member 4	SLC1A4	0.81	2.5E-05	0.026
31 217981_s_at	fracture callus 1 homolog (rat)	FXC1	0.81	2.5E-05	0.026
32 1553959_a_at	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase polypeptide 6	B3GALT6	0.81	3.1E-05	0.03
33 210127_at	RAB6B, member RAS oncogene family	RAB6B	0.81	3.1E-05	0.03
34 214474_at	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	PRKAB2	0.81	3.5E-05	0.03
35 229118_at	Proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 3 (transmembrane)	PRRG3	0.81	3.5E-05	0.03
36 237466_s_at	hedgehog interacting protein phosphogluconate dehydrogenase /// phosphogluconate dehydrogenase	HHIP	0.81	3.5E-05	0.03
37 201118_at	dehydrogenase	PGD	0.81	3.8E-05	0.031
38 204309_at	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1 ///	CYP11A1	0.81	3.8E-05	0.031

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

39	218188_s_at	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	TIMM13	0.81	3.8E-05	0.031
40	203997_at	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	PTPN3	0.8	4.2E-05	0.033
41	222102_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	GSTA3	0.8	4.7E-05	0.036
42	203634_s_at	glutathione S-transferase A3	CPT1A	0.8	5.1E-05	0.036
43	213689_x_at	carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)	RPL5	0.8	5.1E-05	0.036
44	215834_x_at	ribosomal protein L5	SCARB1	0.8	5.1E-05	0.036
45	236514_at	scavenger receptor class B, member 1	SNX21	0.8	5.1E-05	0.036
46	201403_s_at	sorting nexin family member 21	MGST3	0.8	5.6E-05	0.036
47	202314_at	microsomal glutathione S-transferase 3	CYP51A1	0.8	5.6E-05	0.036
48	203562_at	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	FEZ1	0.8	5.6E-05	0.036
49	211572_s_at	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	SLC23A2	0.8	5.6E-05	0.036
50	218360_at	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	RAB22A	0.8	5.6E-05	0.036
51	227870_at	RAB22A, member RAS oncogene family	IGDCC4	0.8	5.6E-05	0.036
52	1554789_a_at	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4	PDE8B	0.8	6.1E-05	0.036
53	212372_at	phosphodiesterase 8B	MYH10	0.8	6.1E-05	0.036
54	225830_at	myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	PDZK8	0.8	6.1E-05	0.036
55	223312_at	PDZ domain containing 8	PRADC1	0.79	6.6E-05	0.039
56	209243_s_at	protease-associated domain containing 1	PEG3	0.79	7.1E-05	0.04
57	221620_s_at	paternally expressed 3	APOO	0.79	7.1E-05	0.04
58	222404_x_at	apolipoprotein O*	PTPLAD1	0.79	7.1E-05	0.04
59	206078_at	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	KALRN	0.79	7.7E-05	0.041
		kalirin, RhoGEF kinase				
		solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	SLC1A4	0.79	7.7E-05	0.041
60	212810_s_at	member 4	GCLM	0.79	8.3E-05	0.042
61	203925_at	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	EDNRB	0.79	8.3E-05	0.042
62	204271_s_at	endothelin receptor type B	SYP	0.79	8.3E-05	0.042
63	213200_at	Synaptophysin	MAD2L1	0.79	8.9E-05	0.043
64	1554768_a_at	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	UBE2E2	0.79	8.9E-05	0.043
65	225651_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	HPX	0.79	8.9E-05	0.043
66	39763_at	Hemopexin	EDNRB	0.79	9.6E-05	0.045
67	206701_x_at	endothelin receptor type B	MPV17L	0.78	1.0E-04	0.046
68	1559167_x_at	MPV17 mitochondrial membrane protein-like	ARHGEF9	0.78	1.0E-04	0.046
69	203263_s_at	Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 9	PORCN	0.78	1.0E-04	0.046
70	219483_s_at	porcupine homolog (Drosophila)	H19	0.78	1.0E-04	0.046
71	224997_x_at	H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	UBE2L3	0.78	1.1E-04	0.047
72	200682_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3	DESII	0.78	1.1E-04	0.047
73	212527_at	desumoylating isopeptidase 1	PANX1	0.78	1.1E-04	0.047
74	235295_at	Pannexin 1	MAD2L1	0.78	1.2E-04	0.049
75	203362_s_at	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	FAM69A	0.78	1.2E-04	0.049
76	216044_x_at	family with sequence similarity 69, member A	RGMA	0.78	1.2E-04	0.049
77	223468_s_at	RGM domain family, member A				

Table 2B: Top genes with expression **negatively** correlated with cortisol secretion

	Affymetrix ProbeSetID	Gene Title	Gene Symbol	Correlation (Spearman)	p-value (undadjusted)	Adjusted p-value
1	240385_at	GATA binding protein 6	GATA6	-0.92	8E-07	0.0023
2	214822_at	astrotactin 1	ASTN1	-0.89	0	0
3	200957_s_at	structure specific recognition protein 1	SSRP1	-0.86	0	0
4	204041_at	monoamine oxidase B	MAOB	-0.85	0	0
5	1568662_at	Homo sapiens, clone IMAGE:5266772, mRNA	---	-0.85	0	0
6	238987_at	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1	B4GALT1	-0.84	0	0
7	201970_s_at	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	NASP	-0.84	0	0
8	208779_x_at	discoidin domain receptor family, member 1	DDR1	-0.83	1.8E-06	0.004
9	225293_at	collagen, type XXVII, alpha 1	COL27A1	-0.83	1.8E-06	0.004
10	207169_x_at	discoidin domain receptor family, member 1	DDR1	-0.83	4.7E-06	0.0078
11	210749_x_at	discoidin domain receptor family, member 1	DDR1	-0.83	4.7E-06	0.0078
12	226713_at	coiled-coil domain containing 50	CCDC50	-0.83	4.7E-06	0.0078
13	232983_s_at	deafness locus associated putative guanine nucleotide exchange factor	DELGEF	-0.83	6.4E-06	0.01
14	200747_s_at	nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	-0.82	8.1E-06	0.011
15	238933_at	Insulin receptor substrate 1	IRS1	-0.82	8.1E-06	0.011
16	201369_s_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	ZFP36L2	-0.82	1.2E-05	0.016
17	1566501_at	Thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)	TBXAS1	-0.82	1.4E-05	0.018
18	229247_at	coiled-coil domain containing 50	CCDC50	-0.82	1.4E-05	0.018

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

19	224504_s_at	BUD13 homolog (S. cerevisiae)	BUD13	-0.82	1.9E-05	0.021
20	241777_x_at	---	---	-0.82	1.9E-05	0.021
21	201313_at	enolase 2 (gamma, neuronal)	ENO2	-0.81	2.2E-05	0.024
22	225166_at	Rho GTPase activating protein 18	ARHGAP18	-0.81	2.5E-05	0.026
23	205022_s_at	checkpoint suppressor 1	CHES1	-0.81	3.1E-05	0.03
24	226190_at	Ribosomal protein L4	RPL4	-0.81	3.1E-05	0.03
25	230680_at	Transcribed locus	---	-0.81	3.5E-05	0.03
26	239886_at	Ring finger protein 130	RNF130	-0.81	3.5E-05	0.03
27	241017_at	TBC1 domain family, member 8 (with GRAM domain)	TBC1D8	-0.81	3.5E-05	0.03
28	40093_at	Lutheran blood group (Aubergier b antigen included)	LU	-0.81	3.5E-05	0.03
29	203453_at	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	SCNN1A	-0.81	3.8E-05	0.031
30	218039_at	nucleolar and spindle associated protein 1	NUSAP1	-0.8	4.2E-05	0.033
31	1558815_at	Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	ARGBP2	-0.8	5.1E-05	0.036
32	1560992_at	hypothetical LOC400590	LOC400590	-0.8	5.1E-05	0.036
33	200884_at	creatine kinase, brain	CKB	-0.8	5.1E-05	0.036
34	211576_s_at	solute carrier family 19 (folate transporter), member 1	SLC19A1	-0.8	5.6E-05	0.036
35	216124_at	---	---	-0.8	6E-05	0.036
36	223915_at	BCL6 co-repressor	BCOR	-0.8	6E-05	0.036
37	225550_at	consortin, connexin sorting protein	CNST	-0.8	6E-05	0.036
38	202258_s_at	phosphonoformate immuno-associated protein 5	PFAAP5	-0.79	7.1E-05	0.04
39	208635_x_at	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	NACA	-0.79	7.1E-05	0.04
40	227466_at	family with sequence similarity 200, member B	FAM200B	-0.79	7.1E-05	0.04
41	210741_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	ARHGEF12	-0.79	7.7E-05	0.041
42	214098_at	KIAA1107 protein	KIAA1107	-0.79	7.7E-05	0.041
43	219304_s_at	platelet derived growth factor D	PDGFD	-0.79	7.7E-05	0.041
44	1554595_at	sympkin	SYMPK	-0.79	8.3E-05	0.042
45	212707_s_at	RAS p21 protein activator 4 /// hypothetical protein FLJ21767 Transcribed locus, weakly similar to XP 522030.1 similar to FTH1 protein [Pan troglodytes]	RASA4	-0.79	8.3E-05	0.042
46	235581_at	---	---	-0.79	8.3E-05	0.042
47	204311_at	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2 polypeptide	ATP1B2	-0.79	8.9E-05	0.043
48	200735_x_at	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	NACA	-0.79	9.6E-05	0.045
49	201502_s_at	---	NFKBIA	-0.79	9.6E-05	0.045
50	219837_s_at	cytokine-like 1	CYTL1	-0.79	9.6E-05	0.045
51	200965_s_at	actin binding LIM protein 1	ABLIM1	-0.78	1E-04	0.046
52	218253_s_at	ligatin	LGTN	-0.78	1E-04	0.046
53	214084_x_at	neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)	NCF1	-0.78	1.1E-4	0.047
54	222288_at	Similar to CG9996-PA	---	-0.78	1.1E-4	0.047
55	213588_x_at	ribosomal protein L14	RPL14	-0.78	1.2E-4	0.049
56	225549_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	DDX6	-0.78	1.2E-4	0.049
57	1007_s_at	discoidin domain receptor family, member 1	DDR1	-0.78	1.3E-4	0.05
58	1558299_at	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	PTPNS1	-0.78	1.3E-4	0.05
59	200949_x_at	ribosomal protein S20	RPS20	-0.78	1.3E-4	0.05
60	234088_at	Hypothetical protein LOC154761	LOC154761	-0.78	1.3E-4	0.05

## Figure legends

**Figure 1: Transcriptome analysis of cortisol-producing adenomas versus non-secreting adrenocortical adenomas**

**Figure 1A: Unsupervised clustering of adrenocortical adenomas**

Samples are presented as columns and genes as lines. CPA: cortisol-producing adenoma; NS: non-secreting adenoma; SCPA: subclinical cortisol-producing adenoma

**Figure 1B: 24-hour urinary free cortisol secretion between cluster 1 and cluster 2 (expressed in mg/day). Wilcoxon  $p=0.008$**

**Figure 2: Correlation between cortisol secretion and cAMP pathway genes**

Each member of the cAMP/PKA pathway showing a correlation between its expression and cortisol secretion is presented. The correlation level is coded by colours, ranging from red for the strongest positive correlations, to blue for the strongest negative correlations.

**Abbreviations:**

ADCY2 adenylylase 2 (brain)  
ADORA3 Adenosine A3 receptor  
ADRA2A adrenergic, alpha-2A-, receptor  
AKAP8L A kinase (PRKA) anchor protein 8-like  
ARRB2 arrestin, beta 2  
AVPR1A arginine vasopressin receptor 1A  
C3AR1 complement component 3a receptor 1  
CNR2 cannabinoid receptor 2 (macrophage)  
CREB3 cAMP responsive element binding protein 3  
CREB3L2 CAMP responsive element binding protein 3-like 2  
CREM CAMP responsive element modulator  
EDNRB endothelin receptor type B  
GNA13 Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13  
GNA15 guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)  
GNAS GNAS complex locus  
GNB5 guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5  
GNG2 guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2  
GNG7 guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 7  
GPR155 G protein-coupled receptor 155

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

GPR30	G protein-coupled receptor 30
GPR52	G protein-coupled receptor 52
GPR89	G protein-coupled receptor 89
GPSM2	G-protein signalling modulator 2 (AGS3-like, <i>C. elegans</i> )
GRK4	G protein-coupled receptor kinase 4
HTR2A	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
LHCGR	Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor
MC2R	melanocortin 2 receptor (adrenocorticotrophic hormone)
NPY5R	neuropeptide Y receptor Y5
NPY6R	Neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)
PDE1A	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent
PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated
PDE4C	phosphodiesterase 4C, cAMP-specific (phosphodiesterase E1 dunce homolog, <i>Drosophila</i> )
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)
PDE5A	Phosphodiesterase 5A, cGMP-specific
PDE6D	phosphodiesterase 6D, cGMP-specific, rod, delta
PDE8A	phosphodiesterase 8A
PDE8B	phosphodiesterase 8B
PKIB	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta
PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit
PTGER1	prostaglandin E receptor 1 (subtype EP1), 42kDa
RGS10	regulator of G-protein signalling 10
RGS14	regulator of G-protein signalling 14
RGS19	regulator of G-protein signalling 19
RGS2	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa

### Figure 3: Cortisol secretion and PDE8B expression, cAMP level and PKA activity

Figure 3A: Correlation between PDE8B mRNA level (Affymetrix probe ""213228\_at") and cortisol secretion.

Correlation secretion was evaluated with free urinary cortisol (mg/day) per gram of adrenal.

Figure 3B: PDE8B protein expression in cortisol-producing and in non-secreting adenomas

Figure 3C: cAMP levels in cortisol-producing and in non-secreting adenomas

Figure 3D: PKA activity in cortisol-producing and in non-secreting adenomas

## Supplemental figures:

### Supplemental figure 1: Correlation between cortisol secretion and genes coding for steroidogenic enzymes

#### Abbreviations:

CYP11A1 cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1

CYP11B1 cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1

CYP11B2 cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2

CYP17A1 cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1

CYP21A2 cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2

HSD3B2 hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2

StAR steroidogenic acute regulator

SULT2A1 sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1

### Supplemental figure 2: Correlation between cortisol secretion and genes coding for cholesterol metabolism

#### Abbreviations:

APOC1 apolipoprotein C-I

CH25H cholesterol 25-hydroxylase

CYP51A1 cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1

DHCR24 24-dehydrocholesterol reductase

EBP emopamil binding protein (sterol isomerase)

EBP emopamil binding protein (sterol isomerase)

FDPS farnesyl diphosphate synthase (farnesyl pyrophosphate synthetase, dimethylallyltranstransferase, geranyltranstransferase)

HMGCS1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)

INSIG1 insulin induced gene 1

LDLR low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)

LIPA lipase A, lysosomal acid, cholesterol esterase (Wolman disease)

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

LSS lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase)  
PPARA peroxisome proliferative activated receptor, alpha  
PPARD peroxisome proliferative activated receptor, delta  
SC4MOL sterol-C4-methyl oxidase-like  
SC5DL sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase homolog, fungal)-like  
SCARB1 scavenger receptor class B, member 1  
SQLE squalene epoxidase

### Supplemental tables:

#### **Supplemental table 1: Urinary and plasma cortisol and tumor weight of transcriptome samples**

#### **Supplemental table 2A: Genes differentially expressed between cluster 1 and cluster 2 (as defined in figure 1).**

The column “Correlated.With.Cortisol.Secretion” states whether the gene is correlated with cortisol secretion (as defined in table 2).

#### **Supplemental table 2B: Subset of genes differentially expressed between cluster 1 and cluster 2, but not correlated with cortisol secretion.**

Genes with adjusted p values  $\leq 0.1$  were considered significant and served as input for the computation of the “Gene Ontology” (GO) enrichment. Columns 12 to 21 report the significantly enriched GO terms, with the GO entry (ex: GO: 0031012), the GO term (ex: “extracellular matrix”) and the GO domain (“Cellular component”, “Biological process” or “Molecular function”).

#### **Supplemental table 3A: Genes positively correlated with cortisol secretion.**

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

Genes with adjusted p values  $\leq 0.1$  served as input for the computation of the “Gene Ontology” (GO) enrichment. Columns 10 to 32 report the significantly enriched GO terms, as defined for supplemental table 1B.

### **Supplemental table 3B: Genes negatively correlated with cortisol secretion.**

Genes with adjusted p values  $\leq 0.1$  served as input for the computation of the “Gene Ontology” (GO) enrichment. Columns 10 to 19 report the significantly enriched GO terms, as defined for supplemental table 1B.

### **Supplemental table 4: Genes coding for transcription factors correlated with cortisol secretion.**

## References

1. Kramer RE, Rainey WE, Funkenstein B, Dee A, Simpson ER, Waterman MR 1984 Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *The Journal of biological chemistry* 259:707-713
2. Vezzosi D, Bertherat J, Groussin L 2010 Pathogenesis of benign adrenocortical tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:893-905
3. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Akerstrom G, Wang W, Carling T, Lifton RP 2011 K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331:768-772
4. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, Stewart PM, Bujalska I, Rainey WE 2005 Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:5446-5455
5. Suzuki H, Shibata H, Maruyama T, Ishimura Y, Saruta T 1995 Significance of steroidogenic enzymes in the pathogenesis of hyperfunctioning and non-hyperfunctioning adrenal tumor. *Steroids* 60:42-47
6. De Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J 2009 Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* 27:1108-1115
7. Vincent-Dejean C, Cazabat L, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Tissier F, Bertagna X, Bertherat J 2008 Identification of a clinically homogenous subgroup of



## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

- benign cortisol-secreting adrenocortical tumors characterized by alterations of the protein kinase A (PKA) subunits and high PKA activity. *Eur J Endocrinol* 158:829-839
8. Team RC 2012 R: A Language and Environment for statistical Computing. Vienna, Austria.
  9. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP 2003 Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31:e15
  10. Hanukoglu I 2006 Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev* 38:171-196
  11. Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, Arlt W, Vay S, Sassone-Corsi P, Allolio B 1998 DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83:2597-2600
  12. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, Libutti SK, Stratakis CA 2004 Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 23:1575-1585
  13. Assie G, Giordano TJ, Bertherat J 2012 Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. *Mol Cell Endocrinol* 351:111-117
  14. Cherradi N, Brandenburger Y, Capponi AM 1998 Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur J Endocrinol* 139:249-256
  15. Streuli C 1999 Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:634-640
  16. Crickard K, Ill CR, Jaffe RB 1981 Control of proliferation of human fetal adrenal cells in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53:790-796
  17. Chamoux E, Narcy A, Lehoux JG, Gallo-Payet N 2002 Fibronectin, laminin, and collagen IV interact with ACTH and angiotensin II to dictate specific cell behavior and secretion in human fetal adrenal cells in culture. *Endocr Res* 28:637-640
  18. Enberg U, Farnebo LO, Wedell A, Grondal S, Thoren M, Grimelius L, Kjellman M, Backdahl M, Hamberger B 2001 In vitro release of aldosterone and cortisol in human adrenal adenomas correlates to mRNA expression of steroidogenic enzymes for genes CYP11B2 and CYP17. *World J Surg* 25:957-966
  19. Ogo A, Haji M, Ohashi M, Nawata H 1991 Markedly increased expression of cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase (P-450c17) mRNA in adrenocortical adenomas from patients with Cushing's syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 80:83-89
  20. Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC 2004 Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 6:289-300
  21. Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu MC, Bae SH, Rhee SG 2012 Feedback control of adrenal steroidogenesis via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent, reversible inactivation of peroxiredoxin III in mitochondria. *Mol Cell* 46:584-594
  22. Stark T, Mankowitz L, Depierre JW 2002 Expression of glutathione transferase isoenzymes in the human H295R adrenal cell line and the effect of forskolin. *J Biochem Mol Toxicol* 16:169-173
  23. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, Heikinheimo M 2002 Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology* 143:3136-3143

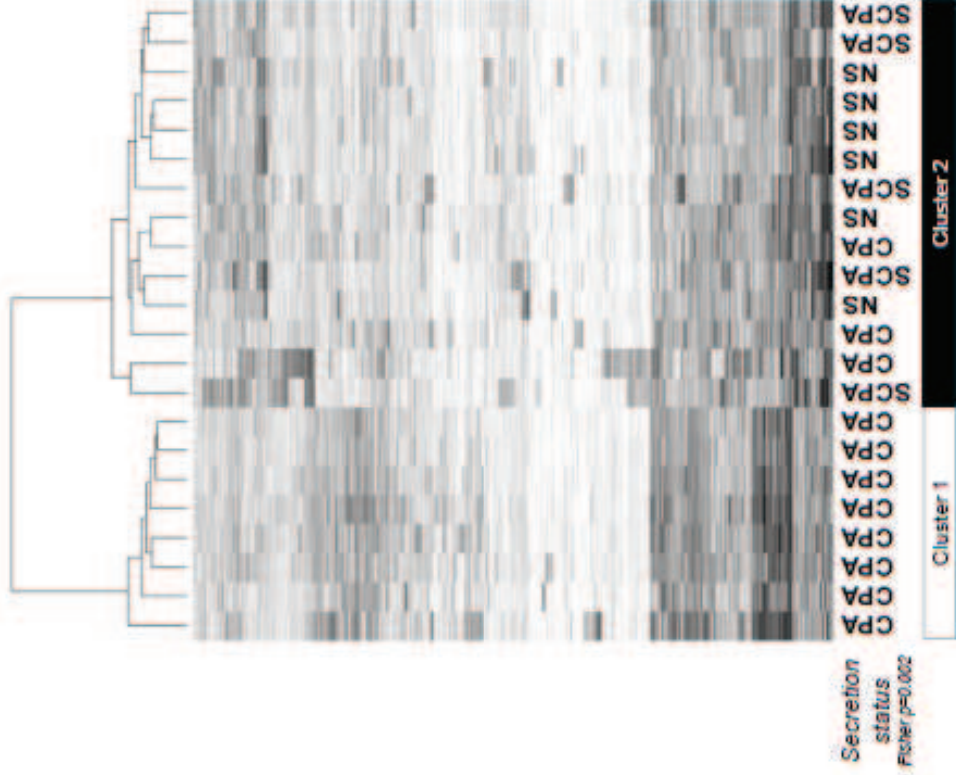
## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

24. Parviainen H, Kiiveri S, Bielinska M, Rahman N, Huhtaniemi IT, Wilson DB, Heikinheimo M 2007 GATA transcription factors in adrenal development and tumors. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:17-22
25. Jimenez P, Saner K, Mayhew B, Rainey WE 2003 GATA-6 is expressed in the human adrenal and regulates transcription of genes required for adrenal androgen biosynthesis. *Endocrinology* 144:4285-4288
26. Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ 2004 Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord* 4:3
27. Kiiveri S, Siltanen S, Rahman N, Bielinska M, Lehto VP, Huhtaniemi IT, Muglia LJ, Wilson DB, Heikinheimo M 1999 Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans. *Mol Med* 5:490-501
28. Kempna P, Fluck CE 2008 Adrenal gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:77-93
29. Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I, Saruta T 2001 Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab* 74:206-216
30. Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Suda N, Saito I, Saruta T 2003 Regulation of differential COUP-TF-coregulator interactions in adrenal cortical steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:449-456
31. Kelly SN, Mckenna TJ, Young LS 2004 Modulation of steroidogenic enzymes by orphan nuclear transcriptional regulation may control diverse production of cortisol and androgens in the human adrenal. *J Endocrinol* 181:355-365
32. Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H 2004 Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:4113-4118
33. Almeida MQ, Stratakis CA 2011 How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? *Mol Cell Endocrinol* 336:162-168
34. Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y 2007 Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18205-18210
35. Assie G, Louisset E, Sturm N, Rene-Corail F, Groussin L, Bertherat J, Thomas M, Lefebvre H, Feige JJ, Clauser E, Chabre O, Cherradi N 2010 Systematic analysis of G protein-coupled receptor gene expression in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia identifies novel targets for pharmacological control of adrenal Cushing's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:E253-262
36. Dorn GW, 2nd, Oswald KJ, Mccluskey TS, Kuhel DG, Liggett SB 1997 Alpha 2A-adrenergic receptor stimulated calcium release is transduced by Gi-associated G(beta gamma)-mediated activation of phospholipase C. *Biochemistry* 36:6415-6423
37. Tsai LC, Shimizu-Albergine M, Beavo JA 2011 The high-affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland. *Mol Pharmacol* 79:639-648
38. Horvath A, Mericq V, Stratakis CA 2008 Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 358:750-752

## Résultats expérimentaux : Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

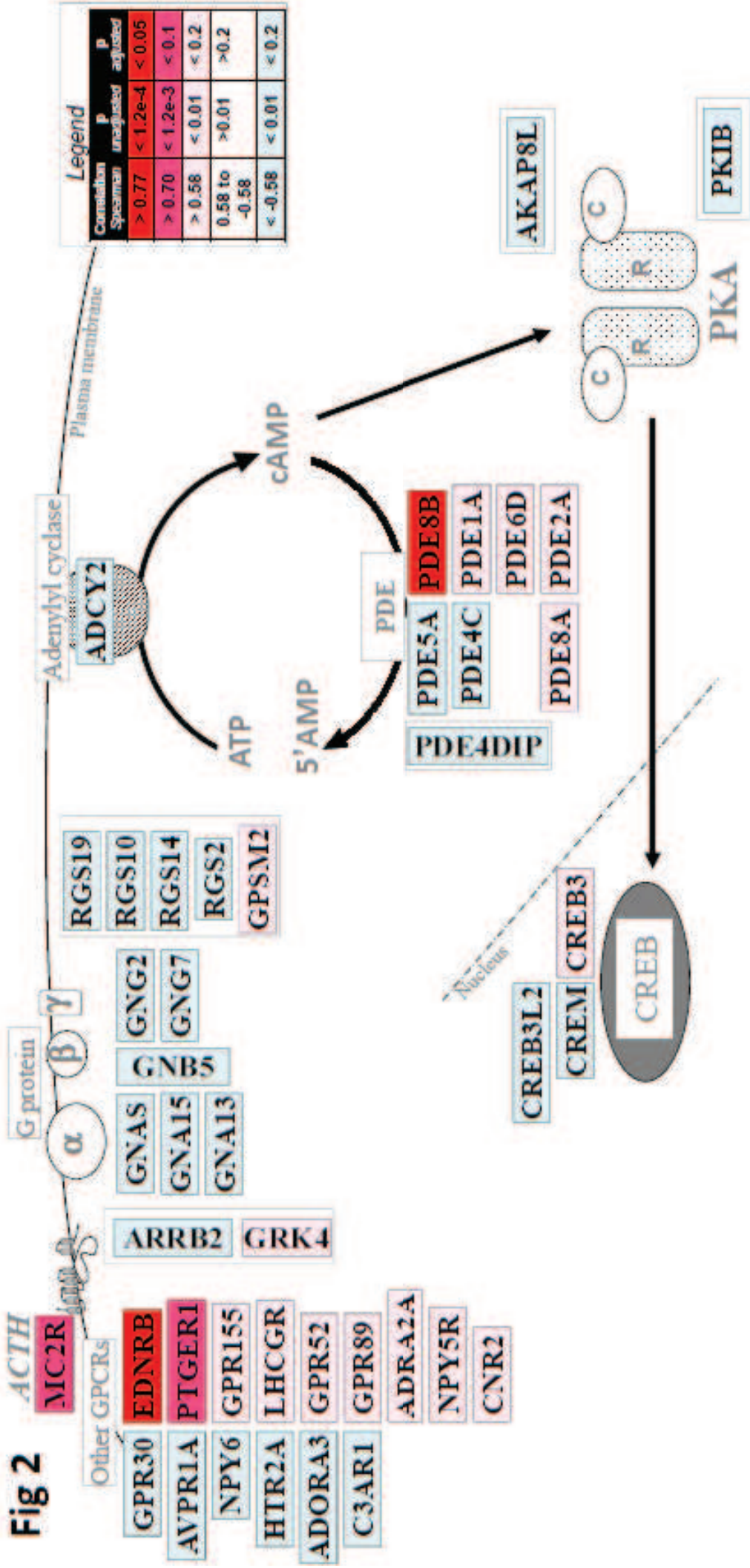
39. Yu B, Ragazzon B, Rizk-Rabin M, Bertherat J 2012 Protein kinase a alterations in endocrine tumors. *Horm Metab Res* 44:741-748

**Figure 1A**

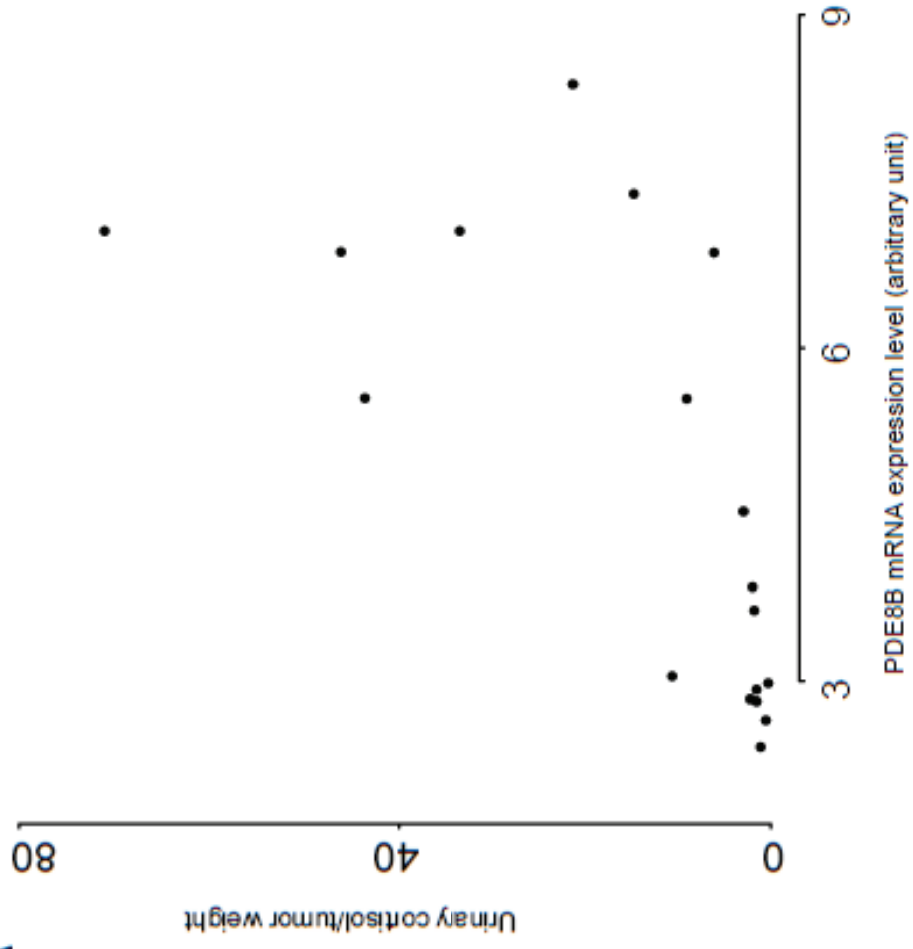




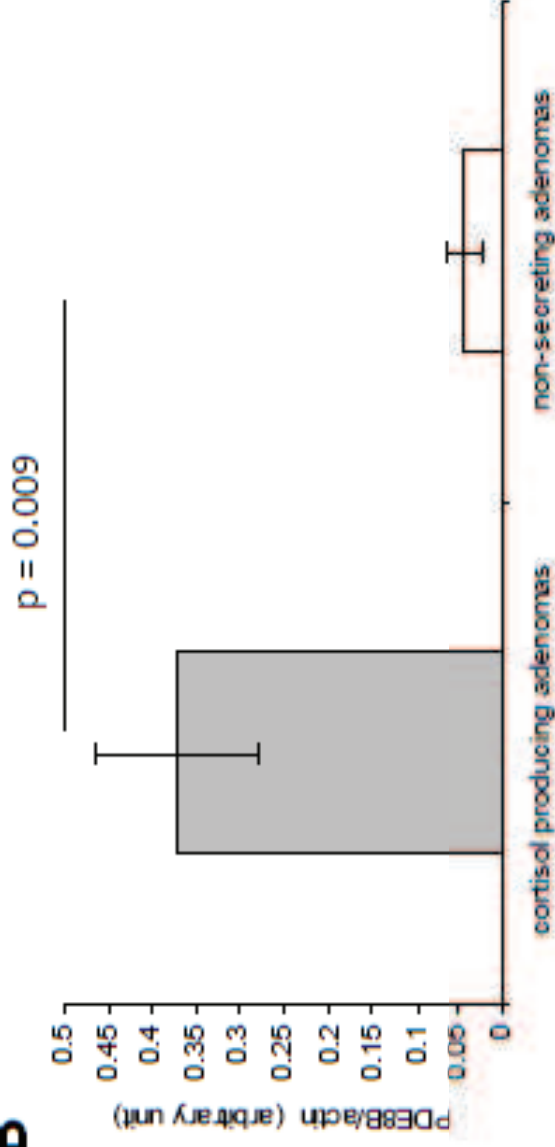
**Fig 2**



3A



**3B**



**PDE8B**



**actin**

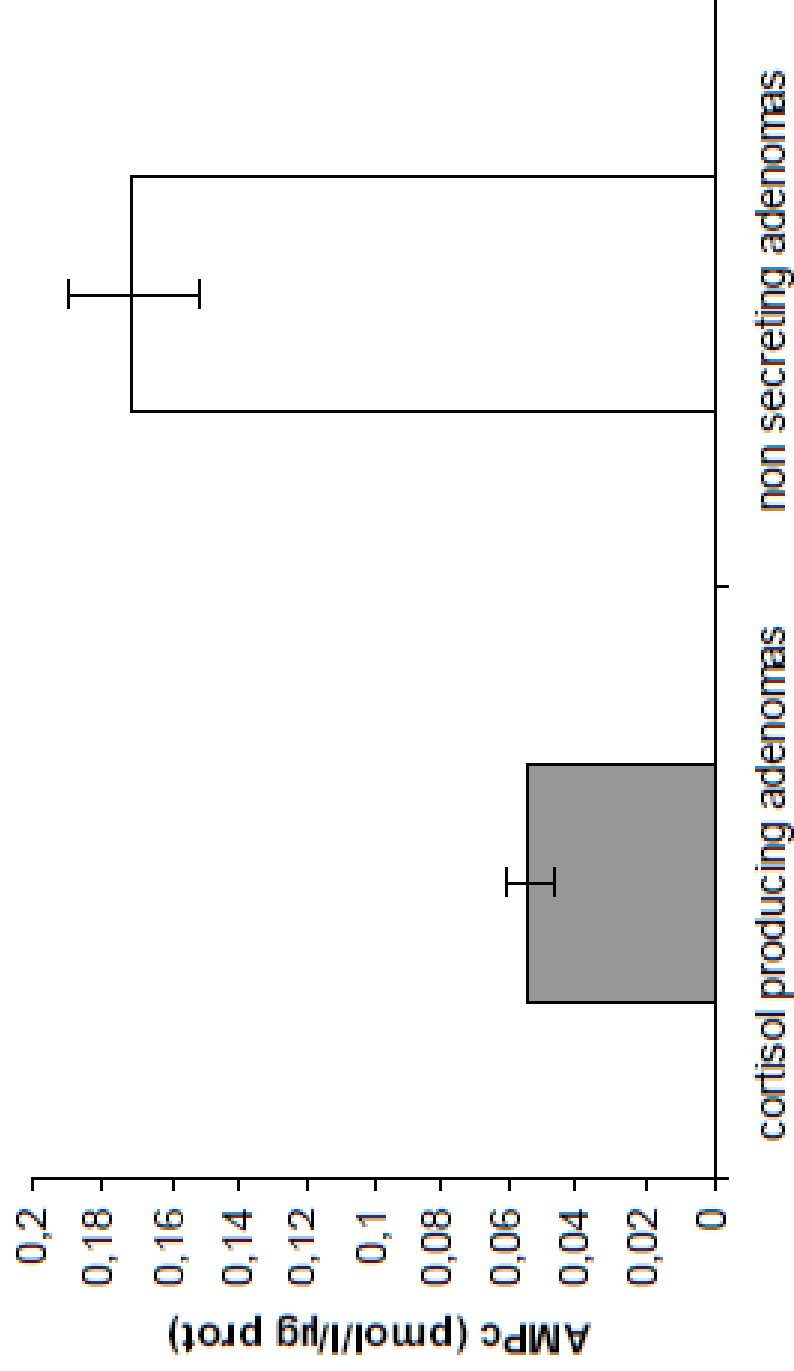


cortisol producing adenomas      non-secreting adenomas

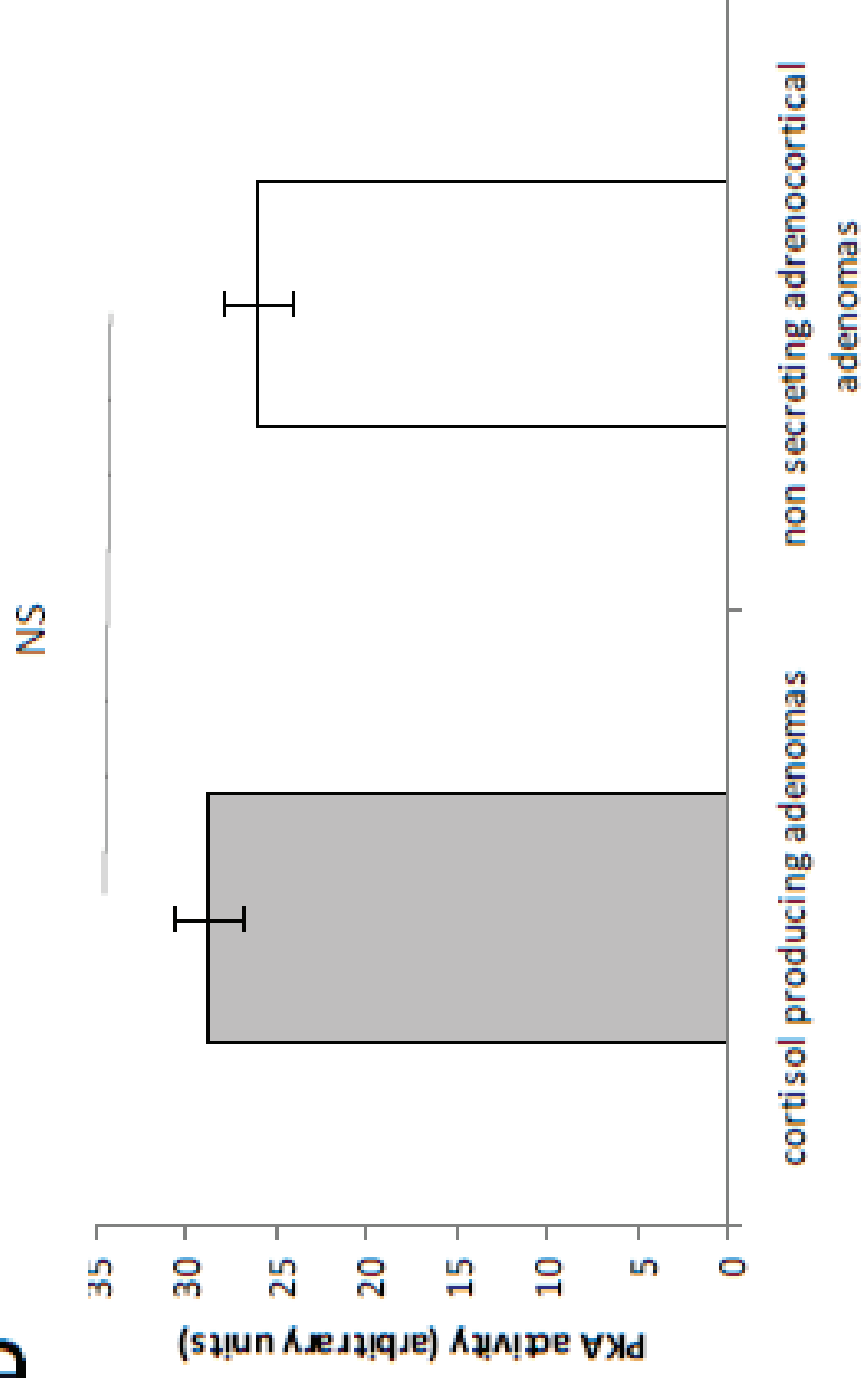


**3C**

$p = 0.009$



# 3D



# Discussion

## 1 Conséquences de la présence de variants génétiques de *PDE11A* chez des patients avec une tumeur de la surrénale

Nous avons tout d'abord apporté dans ce travail des arguments pour un rôle des variants de *PDE11A* dans la tumorigénèse des hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales.

Les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales (AIMAH) sont des lésions bénignes bilatérales des surrénales survenant principalement chez l'homme ou la femme entre 50 et 60 ans (435). Elles peuvent être non sécrétantes ou responsables d'un syndrome de Cushing. Le plus souvent les AIMAH sont sporadiques. Plusieurs publications ont cependant rapportés des AIMAH familiales avec une transmission autosomique dominante (436-441). La prévalence exacte de ces AIMAH familiales reste cependant indéterminée dans la mesure où un dépistage systématique des apparentés au premier degré n'est jamais proposé. La présence de récepteurs illicites dans le tissu surrénalien a été retrouvée chez certains de ces patients. Les gènes impliqués dans ces anomalies n'ont cependant pour l'instant pas été identifiés. Certains variants du récepteur des glucocorticoïdes seraient plus fréquents dans les AIMAH que dans des incidentalomes surrénaliens unilatéraux (442). Une étude antérieure avait également mis en évidence que certains variants de *PDE11A* étaient plus fréquents chez des patients présentant une lésion surrénalienne uni ou bilatérale par rapport à des sujets sains (311). Seuls 29 patients avec une AIMAH avaient cependant été inclus dans cette étude. Il a parallèlement déjà été montré que des variants des PDEs pouvaient avoir un rôle dans la genèse de certaines pathologies telles que la schizophrénie (*PDE4B*) (443), l'infarctus du myocarde (*PDE4D*) (444), la rétinopathie pigmentaire (*PDE6A* and *PDE6B*) (445), la leucémie lymphoïde chronique (*PDE7B*) (446), la dépression (*PDE1A* et *PDE11A*) (447, 448), la broncho-pneumopathie chronique obstructive (*PDE4D*) (269), l'asthme

## Discussion

(*PDE11A*) (449), l'athérosclérose carotidienne (*PDE4D*) (448), les tumeurs testiculaires (*PDE11A*) (332) ou le cancer de la prostate (*PDE11A*) (278).

Notre étude portant sur 46 patients avec une AIMAH et 192 sujets contrôles a tout d'abord confirmé que la fréquence des variants de *PDE11A* (28%) chez les patients était significativement plus élevée que dans la population contrôle (7.2%). Tous les patients et contrôles ont été inclus de façon prospective dans le même centre. Le diagnostic d'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales a été affirmé sur la présence de nodules surrénaliens supracentimétriques répartis dans les deux surrénales associé à un syndrome de Cushing clinique ou infraclinique. Tous les sujets contrôles ont été examinés par un endocrinologue senior afin d'éliminer une pathologie endocrinologique clinique. En revanche, tous les contrôles n'ont pas bénéficié d'un scanner surrénalien systématique. Nous ne pouvons donc pas éliminer chez ces contrôles la présence d'un incidentalome surrénalien non sécrétant cliniquement. La prévalence des incidentalomes surrénaliens est élevée variant de 1% chez des sujets jeunes à 3% chez des sujets de 50 ans et à plus de 15% chez les sujets âgés de plus de 70 ans (20, 23) Il est donc envisageable qu'une partie des sujets contrôles porteurs d'un variant de *PDE11* ait présenté une lésion surrénalienne lors de l'étude ou développe une lésion surrénalienne dans un second temps. La réalisation systématique d'un scanner surrénalien n'avait cependant pas été soumise au début de l'étude au comité d'éthique local et n'a donc pas été réalisé. Il n'a pas non plus été prévu de suivre les sujets contrôles sur le long terme. Un argument supplémentaire pour lier les variants de *PDE11A* à l'apparition d'une tumeur surrénalienne serait également de suivre sur le long terme en prospectif tous les sujets contrôles inclus dans notre étude. L'objectif serait d'évaluer la fréquence d'apparition d'une pathologie surrénalienne chez les contrôles présentant un variant de *PDE11A* comparés à ceux porteurs du *PDE11A* non mutés. Les variants de *PDE11A* étant également plus fréquents dans des pathologies extra-surréniennes tels que les cancers testiculaires ou les cancers de la prostate (278, 332), ce suivi prospectif pourrait également permettre de déterminer si les sujets contrôles porteurs d'un variant faux sens de *PDE11A* ont plus de risques de développer ce type de tumeurs comparés aux sujets contrôles sans variants faux sens.

Même si ces études complémentaires mériteraient d'être réalisées, la prévalence plus élevée des variants de *PDE11A* dans les AIMAH comparés aux sujets contrôles

## Discussion

est un premier élément épidémiologique fort pour suspecter une association entre la présence de ces variants et l'apparition d'une AIMAH. Ceci a d'autant plus de poids que ces résultats confirment une association décrite antérieurement par l'équipe sur une cohorte différente de patients et sujets contrôles (311).

Afin d'avoir des arguments biologiques pour impliquer ces variants, nous avons ensuite évalué *in vitro* les conséquences fonctionnelles sur la voie de l'AMPc de deux de ces variants de *PDE11A*. Les deux variants utilisés dans notre étude sont des mutations faux sens (missense mutations) qui sont responsables d'un changement du triplet du codon en celui d'un acide aminé différent mais avec conservation du cadre de lecture. Les deux mutations faux sens examinées sont toutes les deux situées dans le domaine catalytique de *PDE11A*, l'une dans l'exon 14 pour D609N et l'autre dans l'exon 22 pour M878V. Ces deux exons sont situés dans des domaines hautement conservés interespèces. La connaissance des fonctions de chaque exon du domaine catalytique de *PDE11A* est cependant encore parcellaire. En effet *PDE11* est la phosphodiesterase la plus récemment décrite et la structure cristallographique de *PDE11A* n'a pour l'instant pas été publiée. Par ailleurs un inhibiteur de *PDE11* n'a été identifié que très récemment (450). Il n'est donc pas possible à ce jour de déterminer le rôle exact de ces deux exons dans la fonction de *PDE11A*. Cependant, nous savons que le domaine catalytique est un domaine important des PDEs. Il contient en particulier, des éléments responsables de l'hydrolyse des nucléotides cycliques ainsi que des domaines spécifiques à chaque PDEs déterminant l'affinité aux substrats de chaque PDEs et leurs réponses aux inhibiteurs. L'hypothèse est donc que ces mutations sont responsables d'une diminution de la fonction catalytique de *PDE11A*. Il est cependant à ce jour difficile d'expliquer de façon précise comment ces mutations faux sens peuvent avoir un impact sur *PDE11A*. Il est en revanche important de souligner que des mutations faux sens d'autres phosphodiesterases ont déjà été décrites comme responsables d'un tableau clinique pathologique. Ainsi des variants faux sens de *PDE4D* ont été rapportées et démontrées comme pathogènes chez des patients avec une acrodysostose (451) alors que ce sont des variants faux sens de *PDE6C* qui sont pathogènes dans l'achromatopsie autosomique récessive (452).

Nous avons donc décidé d'évaluer ces deux variants et ceci en dépit des résultats obtenus avec le logiciel Polyphen. En effet, selon ce logiciel (453) qui permet de prédire l'impact d'une substitution d'acide aminé sur la fonction protéique, le variant

## Discussion

M878V a un risque intermédiaire alors que le variant D609N a un risque faible d'entraîner une dysfonction protéique. Les valeurs prédictives de ce logiciel ne sont cependant pas parfaites puisque les valeurs prédictives positives et négatives annoncées de ce logiciel sont de 69 et 70% respectivement (453). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la présence de l'un ou l'autre de ces deux variants était responsable d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle dépendante de l'AMPc aussi bien dans les cellules de type HEK 293 que dans les cellules de la lignée de corticosurrénale H295R. Ainsi, la présence de ces variants entraîne une élévation des taux d'AMPc par rapport à des cellules transfectées avec le *PDE11A* sauvage. Parallèlement, la dynamique de l'AMPc évalué dans des cellules vivantes par la méthode du FRET retrouve une élévation plus rapide et plus importante de l'AMPc après administration de la Forskoline comparée aux cellules transfectées avec le *PDE11A* sauvage.

Parallèlement à ces résultats, il aurait pu être intéressant d'évaluer l'impact de ces variants de *PDE11A* sur la croissance cellulaire. En effet, classiquement les AIMAH sont de volumineuses tumeurs surrénaliennes (454-456). Démontrer que les cellules transfectées avec les variants de *PDE11A* avaient une croissance plus rapide que les contrôles aurait été un argument supplémentaire pour montrer la pathogénicité des variants de *PDE11A*.

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles des variants de *PDE11A* sur la stéroïdogénèse surrénalienne, nous avons transfecté dans les cellules H295R le promoteur P450<sub>ssc</sub> couplé à la luciférase. Le facteur limitant de la stéroïdogénèse est en effet le transfert du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie, siège du cytochrome P450<sub>ssc</sub>. Nous avons ainsi pu montrer que l'activité P450 était plus élevée dans les cellules transfectées avec le vecteur exprimant le mutant M878V comparé au vecteur de *PDE11A* sauvage. En revanche, les résultats étaient moins francs et statistiquement non significatifs lorsque D609N était transfecté. Afin de confirmer le rôle de ces variants sur la stéroïdogénèse, il aurait pu être intéressant d'évaluer de façon fine la fonction surrénalienne des sujets contrôles présentant un variant de *PDE11* comparé aux sujets contrôles non mutés. Cela n'avait cependant pas été demandé au comité d'éthique local lors du début de l'étude et n'a donc pas été fait par la suite.

Enfin, un des problèmes de notre étude est la technique de surexpression que nous avons utilisée. En effet, il est difficile de déterminer de façon certaine si les résultats

## Discussion

que nous obtenons sont réellement secondaires à une surexpression du variant de *PDE11* ou si ces surexpressions n'entraînent pas une régulation négative d'autres PDEs qui seraient alors responsables du phénotype. La régulation des PDEs est en effet complexe et toutes les PDEs sont étroitement corrélés.

Nous nous sommes ensuite plus spécifiquement intéressés à la présence des variants de *PDE11A* chez des patients présentant un complexe de Carney. Le complexe de Carney est une pathologie familiale à transmission autosomique dominante responsable de multiples atteintes endocrines et non endocrines. Des myxomes cardiaques, des lésions cutanées à type de lentiginose, naevis bleus, myxomes cutanés..., des lésions surrénaliennes appelés dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales, des tumeurs calcifiées testiculaires... sont entre autres retrouvées (457). Cette pathologie est secondaire à une mutation inactivatrice de la sous unité régulatrice R1A de la protéine kinase A (*PRKAR1A*). Plus de 80 mutations du gène *PRKAR1A* ont été mises en évidence à ce jour avec présence d'une corrélation phénotype/génotype pour certaines de ces mutations (18). Cependant la fréquence de certaines atteintes varie chez les patients porteurs de la même mutation (18). D'autres facteurs pourraient donc influencer le phénotype des patients porteurs d'un complexe de Carney comme cela est le cas pour d'autres pathologies (458-462). Il s'agirait de gènes modificateurs du phénotype et non de gènes de susceptibilité. L'hypothèse de notre travail était que les variants de *PDE11A* pouvaient avoir un rôle dans le phénotype de ces patients. En effet, il a préalablement été montré que des mutations inactivatrices (codon stop précoce) de *PDE11A* prédisposent aux dysplasies micronodulaires pigmentées des surrénales (PPNAD), lésion endocrine la plus fréquente dans le complexe de Carney (302). D'autre part des variants des *PDE11A* ont été associés aux tumeurs testiculaires familiales (332). Nous avons montré dans cette étude que, dans une population de patients porteurs d'un complexe de Carney avec mutation du gène *PRKAR1A*, la fréquence des variants de *PDE11A* est significativement plus élevée chez les patients avec une PPNAD comparés aux patients ne présentant pas de PPNAD. Parallèlement, la fréquence de ces variants est plus élevée chez les patients porteurs d'une tumeur testiculaire calcifiée que chez les patients sans tumeur testiculaire. Ces données pourraient être en faveur du rôle modificateur de

## Discussion

phénotype des variants de *PDE11A* chez les patients avec un complexe de Carney. Cette hypothèse est soutenue par des expériences de knockdown individuel ou combiné de *PRKAR1A* et *PDE11A* qui montrent un effet additif sur la signalisation de l'AMPc. Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des études complémentaires en transfectant les variants de *PDE11A* tout en inactivant *PRKAR1A*. Les effets observés étaient mineurs posant la question de l'implication de la *PDE11* endogène dans ces expériences. Pour confirmer ces résultats il aurait donc fallu réaliser des expériences de knock-in afin d'inhiber la *PDE11* endogène.

Il est intéressant de noter que la fréquence des PPNADs est similaire chez les hommes et les femmes dans cette étude. Or les variants de *PDE11A* sont, dans notre étude, plus fréquents chez les hommes que chez les femmes. Ces résultats mériteraient bien évidemment d'être confirmés sur une plus grande cohorte mais la présence de variants de *PDE11A* pourrait prédisposer préférentiellement les hommes à l'apparition d'une PPNAD. Le mécanisme moléculaire est cependant difficile à préciser à ce jour.

Une des limites de cette étude est l'absence de familles avec de nombreux apparentés. Les mutations de *PRKAR1A* sont en effet multiples il est donc difficile de conclure de façon certaine que la susceptibilité génétique aux tumeurs surrenaliennes et testiculaires est secondaire à la présence du variant de *PDE11A*. Comment peut-on être sûr qu'elle n'est pas plutôt liée au type de mutation de *PRKAR1A* ? Sur les 150 patients inclus dans l'étude, 74 étaient des cas index alors que 76 étaient des apparentés au premier degré. La plupart des familles ne comportaient que 2 ou 3 membres. La plus grande famille comportait 5 membres. Il n'a donc pas été possible d'évaluer dans les familles avec la même mutation de *PRKAR1A* quelle était la fréquence des tumeurs testiculaires et surrenaliennes en fonction de la présence ou non du variant de *PDE11A*. Il avait cependant précédemment été montré que, chez les patients porteurs de la même mutation *PRKAR1A* la fréquence de certaines atteintes variait (18). Il est donc probable que les variants de *PDE11A* aient réellement un impact sur le phénotype de ces patients. Nous ne pouvons pas non plus affirmer que seul *PDE11A* est impliqué dans cette susceptibilité génétique. En effet, les PDEs sont nombreuses dans la surrenale et nous n'avons pas évalué dans cet article si des variants d'autres PDEs pouvaient expliquer la susceptibilité génétique aux tumeurs surrenaliennes et testiculaires. Il



aurait en particulier été intéressant d'évaluer si les variants de *PDE8* pouvaient avoir un rôle dans l'apparition de ces tumeurs.

Il est enfin difficile d'expliquer pourquoi, alors que la présence de variants de *PDE11* prédispose au cancer prostatique (278), les patients avec un complexe de Carney et un variant de *PDE11* ne présentent pas une augmentation de fréquence des cancers prostatiques. Cependant, le complexe de Carney étant une pathologie rare et les patients étudiés en général plutôt jeunes, les données sont manquantes. Peut-être faudrait-il réaliser un dépistage systématique de ces cancers chez ces patients ?

## 2 Transcriptome des adénomes corticosurrénaux

De nombreuses études se sont intéressées au transcriptome des tumeurs surrénales (404, 463-465). Il a ainsi tout d'abord été montré que le profil génique des adénomes bénins de la surrénale différait de celui des corticosurrénaux. L'analyse du transcriptome pourrait également permettre dans une population de patients avec un corticosurrénaux d'orienter le pronostic de ces patients (404). En effet, même si le pronostic des corticosurrénaux est mauvais dans la majorité des cas, il peut varier d'un patient à l'autre. A ce jour, le stade de la maladie au diagnostic est le meilleur paramètre permettant d'orienter le pronostic de la maladie (466, 467). Cependant ce paramètre ne permet pas d'expliquer toutes les situations où une variabilité de pronostic est mise en évidence en pratique courante. Grâce à l'analyse du transcriptome deux types de corticosurrénaux ont pu être identifiés. Ces deux groupes diffèrent sur leur signature moléculaire ainsi que sur leur pronostic (404). Plus récemment il a été montré que l'expression génique était différente dans une population d'adénomes de Conn comparé à la surrénale saine adjacente (468). Aucune étude n'a, à ce jour, évalué l'expression génique des adénomes cortisoliques par rapport aux adénomes non sécrétants en corrélant cette expression à la sécrétion cortisolique. Certes nous n'évaluons que l'expression de l'ARNm pour la plupart de ces gènes alors qu'au moins certains d'entre eux ont une régulation post-

## Discussion

traductionnelle (411). Nous avons cependant confirmé ces résultats au niveau protéique pour PDE8B.

L'analyse non supervisée du transcriptome a permis d'identifier deux groupes. Le premier groupe était composé exclusivement d'adénomes cortisoliques alors que le second groupe incluait tous les adénomes non sécrétants et infracliniques ainsi que 3 adénomes cortisoliques. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence statistiquement significative au niveau des caractéristiques cliniques ou biologiques entre les 3 adénomes cortisoliques du second groupe et les adénomes cortisoliques du premier groupe. A noter cependant que cette absence de différence peut être secondaire au faible effectif des adénomes cortisoliques du second groupe.

Il est intéressant de remarquer que, sur le plan de l'expression génique, les adénomes infra-cliniques se rapprochent plus des adénomes non sécrétants que des adénomes cortisoliques. Cette constatation est cohérente avec ce que les cliniciens observent en pratique clinique courante c'est-à-dire l'absence d'évolution vers un syndrome de Cushing franc pour la majorité des patients suivis pour un adénome cortisolique infra-clinique (469).

Si on s'intéresse de façon plus précise aux gènes de ce cluster, on met en évidence de façon logique que de nombreux gènes impliqués dans la stéroïdogénèse sont présents. De façon plus surprenante, de nombreux gènes impliqués dans la matrice extra-cellulaire sont également retrouvés. Il a été montré depuis plusieurs années que la matrice extra cellulaire a de nombreux rôles dans la prolifération, la migration, la différenciation et l'apoptose cellulaire (412, 470, 471). Il avait par ailleurs précédemment été montré que l'environnement extra-cellulaire était un élément important dans la croissance cellulaire des cultures de cellules surrénaliennes fetales humaines ou bovines (413, 472). Ainsi des composants de la matrice extra-cellulaire, tels que le collagène type I $\alpha$ 1, type XI, fibrinogène A et fibrilline 2 sont largement exprimés dans le cortex surrénalien foetal par rapport à celui de l'adulte. Il avait même été montré que la matrice extra-cellulaire avait un rôle dans la stéroïdogénèse des cellules surrénaliennes humaines foetales (414). Les protéines de la matrice extra-cellulaire semblerait donc jouer un rôle non seulement dans la plasticité du cortex surrénalien mais également dans la réponse hormonale (473). L'environnement extra-cellulaire pourrait donc également avoir un rôle dans la physiopathologie des adénomes cortisoliques. Cette constatation mériterait des études ultérieures afin de confirmer et d'étayer ces premières données. La suite du

## Discussion

travail pourrait ainsi consister à surexprimer certains de ces acteurs de la matrice extra-cellulaire dans des cultures cellulaires afin d'évaluer les capacités de prolifération et de sécrétion cortisolique de ces cellules transfectées.

La différenciation entre adénomes cortisoliques, adénomes cortisoliques infra-cliniques et adénomes non sécrétants est arbitraire. En effet, il existe plus vraisemblablement un continuum entre ces différentes entités (469). Nous avons donc choisi d'étudier dans un second temps la corrélation entre sécrétion du cortisol et expression génique afin de s'affranchir de ces groupes. Nous avons ainsi évalué la sécrétion de cortisol par masse de tissu tumoral en divisant le cortisol libre urinaire/24 h par le poids de la tumeur surrénalienne. Nous avons ainsi pu identifier une liste de gènes qui sont corrélés à la sécrétion de cortisol. Les enzymes de la stéroïdogénèse sont bien sûr au premier plan comme cela avait été décrit antérieurement (401, 402, 415, 416, 474). A noter également que le gène codant pour le récepteur du gastro-intestinal-peptide (GIP) est surexprimé de façon significative dans le cluster regroupant les adénomes sécrétants comparés au second cluster. Il n'arrive cependant qu'en 1607 positions. Il ne semble donc pas s'agir d'un gène surexprimé de façon majeur et/ou homogène dans les adénomes sécrétants. Le récepteur du GIP est un récepteur non présent physiologiquement dans le cortex surrénalien. La présence de ce récepteur dans les surrénales de certains patients présentant une hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales a été décrite (475). Classiquement, on observe alors chez ces patients un syndrome de Cushing clinique associé à des niveaux de cortisol bas à jeun et augmentant en période post-prandiale. Il a également été décrit des adénomes cortisoliques exprimant le récepteur au GIP même s'il semble s'agir d'un événement beaucoup moins fréquent que dans les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales (476). Il est donc possible que certains des adénomes sécrétants de notre série expriment de façon ectopique le récepteur du GIP.

Les enzymes de la famille des glutathion S-transférases sont également largement représentées. Il s'agit d'une famille d'enzymes qui jouent un rôle important dans la détoxification de composés toxiques d'origine exogène et endogène. Elles peuvent agir soit directement, soit en tant que substrat des enzymes anti-oxydantes. Elles permettent la neutralisation des peroxydes (417). Or il a été montré que ces

## Discussion

peroxydes résultaient de la stéroïdogénèse (418). L'augmentation des enzymes de la famille des glutathion S-transferases en cas d'hypersécrétion de cortisol reflète donc probablement la nécessité de détoxifier la cellule des produits générés par la stéroïdogénèse. Il avait ainsi déjà été montré que dans des lignées cellulaires de type H295R les niveaux de glutathion S-transférases augmentaient après adjonction de forskoline, un activateur de l'adénylyl cyclase (419).

Dans notre travail d'autres gènes sont corrélés à la sécrétion de cortisol, et en particulier certains gènes de la voie Hedgehog. Cette voie a un rôle important dans le développement surrénalien (477). Une anomalie dans la voie Hedgehog est ainsi responsable d'une aplasie surrénalienne (478, 479). Par ailleurs, les patients présentant un syndrome de Pallister-Hall, une pathologie rare secondaire à des anomalies du facteur de transcription Gli3 (GLI Krüppel family member 3) impliqué dans la voie Hedgehog peuvent également présenter une hypoplasie ou une aplasie des surrénales (480, 481). Gli3 est une cible en aval de la voie Hedgehog (482) (482) et est un activateur de transcription important dans le développement surrénalien. Une protéine Gli3 tronquée est donc responsable d'une diminution de la transcription et donc d'un déficit dans le développement surrénalien (481). Alors qu'il n'avait pas été mis de surexpression de la voie Hedgehog dans les corticosurrénales (483), nous mettons en évidence que l'expression de certains membres de la voie Hedgehog est corrélée de façon positive à la sécrétion cortisolique. Certains facteurs de transcription sont corrélés négativement avec la sécrétion de cortisol. Ainsi dans notre étude GATA-6 est corrélé négativement à la sécrétion cortisolique. GATA-6 est un facteur de transcription abondamment exprimé tout au long du développement du cortex surrénalien chez la souris ou chez l'homme (420). Il a également un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse (421). Le rôle exact de GATA-6 dans la surrénale n'est pas encore complètement déterminé. Cependant il agit en particulier en synergie avec SF-1 afin d'augmenter la transactivation de gènes codant pour des enzymes nécessaires à la synthèse des stéroïdes surrénaliens telles que StAR, CYP11A1 (P450<sub>sc</sub>), CYP17 ainsi que la dehydroépiandrostérone-sulfotransférase (SULT2A1) (422, 484). Ainsi, StAR et GATA-6 sont coexprimés dans le cortex surrénalien murin (485). Il avait été précédemment montré que les niveaux de GATA-6 étaient plus faibles dans des tumeurs surrénaliennes humaines comparées à des surrénales saines (423). GATA-

## Discussion

6 est également plus faible dans des carcinomes surrenaliens comparés aux adénomes (424). Dans notre population d'adénomes bénins, l'expression de GATA-6 est inversement corrélée à la sécrétion de cortisol. Il avait été précédemment montré que GATA-6 pouvait avoir un rôle dans la sécrétion d'androgènes par la surrénale (422). Ainsi, GATA-6 était surexprimé dans les tumeurs surrenaliennes virilisantes (486). Dans notre série, aucun des adénomes ne présentait une sécrétion d'androgènes. Nous montrons donc que GATA-6 pourrait également avoir un rôle dans la sécrétion de cortisol des adénomes surrenaliens.

Nous retrouvons d'autres facteurs de transcription négativement corrélés à la sécrétion de cortisol dans notre travail, tels que NR2F2 (COUP-TFII). NR2F2 est un récepteur orphelin de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Il fait partie de la famille des COUP-TF (Chicken ovalbumine upstream promoter-transcription factor). Il avait été précédemment montré que la famille des COUP-TF avait un rôle important dans la régulation de la stéroïdogénèse des surrénales humaines (426). En effet, COUP-TF régule négativement l'activité transcriptionnelle de SF1. Une étude menée dans des adénomes cortisoliques comparés à des surrénales normales avaient montré par Western-Blot que COUP-TFII était diminué dans les adénomes cortisoliques par rapport aux contrôles.

NR4A1 (NURR77) et NR4A2 (NURR1) sont également dans notre étude négativement corrélés à la sécrétion de cortisol. Ce sont également deux membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes codant pour des enzymes de la stéroïdogénèse dans les gonades et les surrénales. Ainsi, dans la surrénale, NR4A1 a un rôle important dans la régulation de la transcription des gènes de CYP21, CYP11B2 et HSD3B2 suggérant donc que NR4A1 aurait un rôle dans la sécrétion d'androgènes, d'aldostérone et de cortisol (428, 487).

En revanche, deux facteurs de transcription majeurs impliqués dans le développement surrenalien sont absents. Ainsi nous n'avons pas mis en évidence de corrélation entre la sécrétion de cortisol et SF1 (NR5A1) et DAX1 (NR0B1). Ceci avait déjà été observé par Lefrançois-Martinez et coll (488). SF1 et DAX1 appartiennent tous les deux à la famille des récepteurs hormonaux nucléaires. Ils semblent avoir des relations complexes avec à la fois des effets synergiques et

## Discussion

antagonistes (489, 490). SF1 est impliqué en particulier dans le développement et la différenciation des surrénales ainsi que dans le maintien des fonctions stéroïdogéniques (491-494). SF1 régule ainsi la transcription de plus de 40 gènes, tels que MC2R, StAR et la plupart des gènes codant pour les enzymes de la stéroïdogénèse. Ce facteur de transcription, dont le gène est localisé sur le chromosome 9, s'exprime parallèlement à DAX-1, mais plus précocement (491-494). Les anomalies observées chez les souris invalidées pour le gène SF-1 (495) confirment le rôle fondamental de SF-1 dans le développement de la surrénale. En effet des souris homozygotes invalidées pour SF-1 ont en particulier une agénésie surrénalienne. Les souris hétérozygotes invalidées pour SF1 ont des surrénales de petite taille, mais une fonction surrénalienne normale de base grâce à une surexpression de Star. En revanche, elles décompensent une insuffisance surrénalienne dans les états de stress. L'homme semble plus sensible que la souris à une diminution de SF-1. En effet, une mutation isolée à l'état hétérozygote donne le même phénotype que chez la souris homozygote. Dans ces cas, l'haplo insuffisance (diminution maximale de 50% de la protéine SF-1 car l'allèle est muté) n'explique pas ce phénotype. Un effet dominant négatif pourrait se surajouter (496). Compte tenu de l'implication forte de SF1 dans la stéroïdogénèse, il est donc surprenant que ce gène ne soit pas surexprimé dans les adénomes cortisoliques.

L'absence de DAX1 dans nos résultats est plus facilement compréhensible. Le gène DAX-1 est localisé sur le bras court du chromosome X. La protéine DAX-1 est apparentée à la famille des récepteurs nucléaires orphelins par sa partie C-terminale. DAX1 est particulièrement impliquée dans le développement de la surrénale fœtale. Ainsi c'est l'hypoplasie congénitale des surrénales qui a permis la découverte du gène DAX-1 (497, 498). La plupart des mutations de DAX1 décrites à ce jour sont ponctuelles, entraînant un déplacement du cadre de lecture. Ces mutations lèvent l'inhibition induite par DAX-1 sur l'effet stimulant de SF-1 (499). L'invalidation du gène DAX-1 chez la souris transgénique n'entraîne pas d'insuffisance surrénalienne, mais laisse persister le cortex fœtal dans la surrénale adulte. DAX-1 semble donc essentiellement impliqué dans le développement surrénalien plus que dans la stéroïdogénèse permettant ainsi d'expliquer l'absence de différence observée dans son expression dans les adénomes cortisoliques comparés aux adénomes non sécrétants.

## Discussion

Il est désormais bien établi que la voie de l'AMPc a un rôle important dans le développement du cortex surrénalien ainsi que dans la pathophysiologie de certaines tumeurs surrénaliennes. Ainsi, l'activation de la voie AMPc/PKA est la seule anomalie liée à l'hypersécrétion de cortisol connue à ce jour (430). Nous avons paradoxalement observé dans les adénomes cortisoliques une diminution du niveau d'AMPc. Peu de travaux ont étudiés de façon spécifique le niveau d'AMPc dans les adénomes cortisoliques. Au milieu des années 1970 par des études biochimiques fines J M Saez avait décrit des anomalies de l'adénylyl cyclase et de l'activité PKA dans les tumeurs de la surrénale (500, 501). Cependant la plupart des tumeurs étudiées étaient des cancers et seuls 3 adénomes avaient été en partie étudiés. Par rapport à la surrénale normale dans ces travaux historiques l'activité adénylyl cyclase de base semblait plus basse dans les deux adénomes responsables d'un syndrome clinique d'hypersécrétion par rapport à l'adénome cliniquement non sécrétant. Dans une étude plus récente, les niveaux d'AMPc ont été évalués sur 3 adénomes cortisoliques et comparés à 4 surrénales normales et 5 adénomes de Conn (502). Les auteurs ont pu mettre en évidence que les niveaux d'AMPc étaient plus élevés dans les adénomes cortisoliques et dans les adénomes de Conn que dans les surrénales normales. Le niveau d'AMPc dans des adénomes non sécrétants n'avait pas été évalué dans cette étude. Dans notre étude, les niveaux d'AMPc sont bas dans les adénomes cortisoliques comparés aux adénomes non sécrétants. Cela peut être le témoin d'une disparité importante dans les niveaux d'AMPc des adénomes cortisoliques. Il avait ainsi déjà été montré dans la thyroïde que le niveau d'AMPc des nodules toxiques et des adénomes thyroïdiens non sécrétants avaient une variabilité importante et que les résultats se chevauchaient entre ces deux groupes de tumeurs (316). Nos résultats vont cependant, comme dans les études antérieures, vers une tendance à l'activation de la voie de l'AMPc dans les adénomes cortisoliques. En effet, même si le niveau d'AMPc est bas dans les adénomes cortisoliques, l'activité PKA est identique dans les adénomes cortisoliques et dans les adénomes non sécrétants, témoin donc d'une activation de la voie de l'AMPc dans les adénomes cortisoliques par rapport aux adénomes non sécrétants. Une des hypothèses pourrait donc être que l'activation de la voie AMPc/PKA se situe en aval de l'AMPc. Dans ce cadre une anomalie de la PKA elle-même serait vraisemblable. Des mutations inactivatrices de PRKAR1A ont été observées dans de

## Discussion

rare adénomes sécrétants (503). De la même façon une perte de la protéine R2B a aussi été décrite par notre équipe (405) et celle d'Ana Spada (504). Cette hypothèse nécessiterait cependant confirmation.

Dans notre travail, l'expression de plusieurs phosphodiésterases, et en particulier la PDE8B, semble lier à la sécrétion de cortisol. Ces données ont été confirmées sur le plan protéique pour PDE8B. Il avait été préalablement montré que des mutations germinales inactivatrices de la phosphodiésterase 8B pouvaient être retrouvées dans des tumeurs surrenaliennes (253, 307). Cela semble cependant un événement rare dans les adénomes cortisoliques. Des mutations inactivatrices de PDE8B ont ainsi été mises en évidence chez 9/216 patients porteurs d'une tumeur surrenalienne (505). Sur ces 9 patients porteurs d'une mutation inactivatrice, seul 1 patient présentait un adénome cortisolique. A contrario, tous les adénomes cortisoliques de notre étude ont une surexpression de PDE8B comparée à la population d'adénomes non sécrétants. La surexpression de PDE8B semble donc un élément relativement constant dans les adénomes cortisoliques responsables d'un syndrome de Cushing clinique et biologique. La surexpression de phosphodiésterases dans les tumeurs endocrines sécrétantes par rapport à des tumeurs non sécrétantes avaient déjà été mises en évidence antérieurement que ce soit dans la thyroïde (316) ou dans l'hypophyse (506). Ces données semblent paradoxales dans la mesure où une surexpression de PDE8B inactive la voie de l'AMPc en dégradant l'AMPc en son composé inactif. Cette augmentation de l'expression de certaines phosphodiésterases lorsque la voie de l'AMPc est activée pourrait être le témoin du blocage après activation de la voie de l'AMPc. En effet, il est vraisemblable que l'activation continue et/ou trop forte de la voie de l'AMPc est toxique pour la cellule. La surexpression de certaines phosphodiésterases dans les situations pathologiques où la voie de l'AMPc est activée de façon constitutive pourrait être un moyen de protection de la cellule afin de limiter l'emballement de la voie de signalisation AMPc/PKA dans ces adénomes sécrétants.

Dans cette hypothèse il faudrait mettre en évidence les anomalies génétiques activant la voie de signalisation de l'AMPc dans toutes les tumeurs comportant une surexpression de PDE8B. Actuellement les mutations de *Gs* et *PRKAR1A* ne sont retrouvés que dans une minorité d'adénomes sécrétants. Le développement des techniques de séquençage à haut débit appliqué aux adénomes cortisoliques



## Discussion

comparés à celui des adénomes non sécrétants devrait apporter des éléments de réponse à cette question.

## Conclusion

Les phosphodiésterases sont des enzymes clés de la voie de l'AMPc. Elles semblent également être particulièrement importantes dans la physiopathologie de nombreuses tumeurs endocrines. Nous avons pu montrer dans ce travail qu'au moins deux phosphodiésterases, PDE11A et PDE8B, étaient impliquées dans la physiopathologie de certaines tumeurs surrénaliennes. Le rôle exact de ces phosphodiésterases dans la genèse des tumeurs surrénaliennes reste à préciser par des études fonctionnelles. Cela serait d'autant plus important qu'une meilleure connaissance de l'implication de ces phosphodiésterases dans les tumeurs surrénaliennes pourrait permettre à terme de nouvelles approches thérapeutiques.

## Références bibliographiques

1. Kramer RE, Rainey WE, Funkenstein B, Dee A, Simpson ER, Waterman MR 1984 Induction of synthesis of mitochondrial steroidogenic enzymes of bovine adrenocortical cells by analogs of cyclic AMP. *The Journal of biological chemistry* 259:707-713
2. Dibartolomeis MJ, Jefcoate CR 1984 Characterization of the acute stimulation of steroidogenesis in primary bovine adrenal cortical cell cultures. *The Journal of biological chemistry* 259:10159-10167
3. Waterman MR, Bischof LJ 1997 Cytochromes P450 12: diversity of ACTH (cAMP)-dependent transcription of bovine steroid hydroxylase genes. *FASEB J* 11:419-427
4. Jefcoate CR, Dibartolomeis MJ, Williams CA, Mcnamara BC 1987 ACTH regulation of cholesterol movement in isolated adrenal cells. *J Steroid Biochem* 27:721-729
5. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM 1994 The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *The Journal of biological chemistry* 269:28314-28322
6. Arakane F, King SR, Du Y, Kallen CB, Walsh LP, Watari H, Stocco DM, Strauss JF, 3rd 1997 Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *The Journal of biological chemistry* 272:32656-32662
7. Palos-Paz F, Perez-Guerra O, Cameselle-Teijeiro J, Rueda-Chimeno C, Barreiro-Morandeira F, Lado-Abeal J, Araujo Vilar D, Argueso R, Barca O, Botana M, Cabezas-Agricola JM, Catalina P, Dominguez Gerpe L, Fernandez T, Mato A, Nuno A, Penin M, Victoria B 2008 Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A and RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur J Endocrinol* 159:623-631
8. Trulzsch B, Krohn K, Wonerow P, Chey S, Holzapfel HP, Ackermann F, Fuhrer D, Paschke R 2001 Detection of thyroid-stimulating hormone receptor and Gsalpha mutations: in 75 toxic thyroid nodules by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Mol Med (Berl)* 78:684-691
9. Gozu HI, Bircan R, Krohn K, Muller S, Vural S, Gezen C, Sargin H, Yavuzer D, Sargin M, Cirakoglu B, Paschke R 2006 Similar prevalence of somatic TSH receptor and Gsalpha mutations in toxic thyroid nodules in geographical regions with different iodine supply in Turkey. *Eur J Endocrinol* 155:535-545
10. De Leener A, Caltabiano G, Erkan S, Idil M, Vassart G, Pardo L, Costagliola S 2008 Identification of the first germline mutation in the extracellular domain of the follitropin receptor responsible for spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Mutat* 29:91-98
11. Smits G, Olatunbosun O, Delbaere A, Pierson R, Vassart G, Costagliola S 2003 Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. *N Engl J Med* 349:760-766

## Références bibliographiques

12. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Jr., Minegishi T, Cutler GB, Jr. 1993 A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 365:652-654
13. Liu G, Duranteau L, Carel JC, Monroe J, Doyle DA, Shenker A 1999 Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. *N Engl J Med* 341:1731-1736
14. Swords FM, Baig A, Malchoff DM, Malchoff CD, Thorner MO, King PJ, Hunyady L, Clark AJ 2002 Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Mol Endocrinol* 16:2746-2753
15. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L 1989 GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 340:692-696
16. Christopoulos S, Bourdeau I, Lacroix A 2004 Aberrant expression of hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Pituitary* 7:225-235
17. Shenoy BV, Carpenter PC, Carney JA 1984 Bilateral primary pigmented nodular adrenocortical disease. Rare cause of the Cushing syndrome. *Am J Surg Pathol* 8:335-344
18. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, Libe R, Rene-Corail F, Stergiopoulos S, Bourdeau I, Bei T, Clauser E, Calender A, Kirschner LS, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA 2009 Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:2085-2091
19. Vezzosi D, Vignaux O, Dupin N, Bertherat J 2010 Carney complex: Clinical and genetic 2010 update. *Ann Endocrinol (Paris)* 71:486-493
20. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B 1995 Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev* 16:460-484
21. Rossi R, Tauchmanova L, Luciano A, Di Martino M, Battista C, Del Viscovo L, Nuzzo V, Lombardi G 2000 Subclinical Cushing's syndrome in patients with adrenal incidentaloma: clinical and biochemical features. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85:1440-1448
22. Bertherat J, Mosnier-Pudar H, Bertagna X 2002 Adrenal incidentalomas. *Curr Opin Oncol* 14:58-63
23. Grumbach M, Biller B, Braunstein G, Campbell K, Carney J, Godley P, Harris E, Lee J, Oertel Y, Posner M, Schlechte J, Wieand H 2003 Management of the Clinically Inapparent Adrenal Mass ("Incidentaloma"). *Annals of Internal Medicine* 138:424-429
24. Lieberman SA, Eccleshall TR, Feldman D 1994 ACTH-independent massive bilateral adrenal disease (AIMBAD): a subtype of Cushing's syndrome with major diagnostic and therapeutic implications. *Eur J Endocrinol* 131:67-73
25. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A 1998 The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 19:647-672
26. Fassnacht M, Johanssen S, Fenske W, Weismann D, Agha A, Beuschlein F, Fuhrer D, Jurowich C, Quinkler M, Petersenn S, Spahn M, Hahner S, Allolio B 2010 Improved survival in patients with stage II adrenocortical carcinoma followed up prospectively

## Références bibliographiques

- by specialized centers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:4925-4932
27. Houslay MD 2010 Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci* 35:91-100
  28. Vezzosi D, Bertherat J 2011 Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease. *Eur J Endocrinol* 165:177-188
  29. Manganiello VC, Degerman E 1999 Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): diverse regulators of cyclic nucleotide signals and inviting molecular targets for novel therapeutic agents. *Thromb Haemost* 82:407-411
  30. Soderling SH, Beavo JA 2000 Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* 12:174-179
  31. Dousa TP 1999 Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int* 55:29-62
  32. Huai Q, Wang H, Zhang W, Colman RW, Robinson H, Ke H 2004 Crystal structure of phosphodiesterase 9 shows orientation variation of inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9624-9629
  33. Ke H, Wang H 2007 Crystal structures of phosphodiesterases and implications on substrate specificity and inhibitor selectivity. *Curr Top Med Chem* 7:391-403
  34. Zoraghi R, Francis SH, Corbin JD 2007 Critical amino acids in phosphodiesterase-5 catalytic site that provide for high-affinity interaction with cyclic guanosine monophosphate and inhibitors. *Biochemistry* 46:13554-13563
  35. Saldou N, Obernolte R, Huber A, Baecker PA, Wilhelm R, Alvarez R, Li B, Xia L, Callan O, Su C, Jarnagin K, Shelton ER 1998 Comparison of recombinant human PDE4 isoforms: interaction with substrate and inhibitors. *Cell Signal* 10:427-440
  36. Richter W, Conti M 2004 The oligomerization state determines regulatory properties and inhibitor sensitivity of type 4 cAMP-specific phosphodiesterases. *The Journal of biological chemistry* 279:30338-30348
  37. Corbin JD 1983 Determination of the cAMP-dependent protein kinase activity ratio in intact tissues. *Methods Enzymol* 99:227-232
  38. Weeks JL, 2nd, Corbin JD, Francis SH 2009 Interactions between cyclic nucleotide phosphodiesterase 11 catalytic site and substrates or tadalafil and role of a critical Gln-869 hydrogen bond. *J Pharmacol Exp Ther* 331:133-141
  39. Zoraghi R, Corbin JD, Francis SH 2006 Phosphodiesterase-5 Gln817 is critical for cGMP, vardenafil, or sildenafil affinity: its orientation impacts cGMP but not cAMP affinity. *The Journal of biological chemistry* 281:5553-5558
  40. Chen G, Wang H, Robinson H, Cai J, Wan Y, Ke H 2008 An insight into the pharmacophores of phosphodiesterase-5 inhibitors from synthetic and crystal structural studies. *Biochem Pharmacol* 75:1717-1728
  41. Huai Q, Colicelli J, Ke H 2003 The crystal structure of AMP-bound PDE4 suggests a mechanism for phosphodiesterase catalysis. *Biochemistry* 42:13220-13226
  42. Pandit J, Forman MD, Fennell KF, Dillman KS, Menniti FS 2009 Mechanism for the allosteric regulation of phosphodiesterase 2A deduced from the X-ray structure of a near full-length construct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18225-18230
  43. Wang H, Liu Y, Huai Q, Cai J, Zoraghi R, Francis SH, Corbin JD, Robinson H, Xin Z, Lin G, Ke H 2006 Multiple conformations of phosphodiesterase-5: implications for enzyme function and drug development. *The Journal of biological chemistry* 281:21469-21479

## Références bibliographiques

44. Wang H, Ye M, Robinson H, Francis SH, Ke H 2008 Conformational variations of both phosphodiesterase-5 and inhibitors provide the structural basis for the physiological effects of vardenafil and sildenafil. *Mol Pharmacol* 73:104-110
45. Wang H, Liu Y, Hou J, Zheng M, Robinson H, Ke H 2007 Structural insight into substrate specificity of phosphodiesterase 10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5782-5787
46. Baillie GS, Mackenzie SJ, Mcphee I, Houslay MD 2000 Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *Br J Pharmacol* 131:811-819
47. Burgin AB, Magnusson OT, Singh J, Witte P, Staker BL, Bjornsson JM, Thorsteinsdottir M, Hrafnisdottir S, Hagen T, Kiselyov AS, Stewart LJ, Gurney ME 2010 Design of phosphodiesterase 4D (PDE4D) allosteric modulators for enhancing cognition with improved safety. *Nat Biotechnol* 28:63-70
48. Houslay MD, Adams DR 2010 Putting the lid on phosphodiesterase 4. *Nat Biotechnol* 28:38-40
49. Blount MA, Zoraghi R, Bessay EP, Beasley A, Francis SH, Corbin JD 2007 Conversion of phosphodiesterase-5 (PDE5) catalytic site to higher affinity by PDE5 inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 323:730-737
50. Blount MA, Zoraghi R, Ke H, Bessay EP, Corbin JD, Francis SH 2006 A 46-amino acid segment in phosphodiesterase-5 GAF-B domain provides for high vardenafil potency over sildenafil and tadalafil and is involved in phosphodiesterase-5 dimerization. *Mol Pharmacol* 70:1822-1831
51. Houslay MD, Adams DR 2003 PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 370:1-18
52. Richter W, Conti M 2002 Dimerization of the type 4 cAMP-specific phosphodiesterases is mediated by the upstream conserved regions (UCRs). *The Journal of biological chemistry* 277:40212-40221
53. Bjorgo E, Solheim SA, Abrahamsen H, Baillie GS, Brown KM, Berge T, Okkenhaug K, Houslay MD, Tasken K 2010 Cross talk between phosphatidylinositol 3-kinase and cyclic AMP (cAMP)-protein kinase a signaling pathways at the level of a protein kinase B/beta-arrestin/cAMP phosphodiesterase 4 complex. *Mol Cell Biol* 30:1660-1672
54. Aravind L, Ponting CP 1997 The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends Biochem Sci* 22:458-459
55. Martinez SE, Beavo JA, Hol WG 2002 GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv* 2:317-323
56. Martinez SE, Wu AY, Glavas NA, Tang XB, Turley S, Hol WG, Beavo JA 2002 The two GAF domains in phosphodiesterase 2A have distinct roles in dimerization and in cGMP binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13260-13265
57. Zoraghi R, Bessay EP, Corbin JD, Francis SH 2005 Structural and functional features in human PDE5A1 regulatory domain that provide for allosteric cGMP binding, dimerization, and regulation. *The Journal of biological chemistry* 280:12051-12063
58. Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L 2001 Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *J Mol Biol* 307:1271-1292

## Références bibliographiques

59. Zoraghi R, Corbin JD, Francis SH 2004 Properties and functions of GAF domains in cyclic nucleotide phosphodiesterases and other proteins. *Mol Pharmacol* 65:267-278
60. Jager R, Russwurm C, Schwede F, Genieser HG, Koesling D, Russwurm M 2012 Activation of PDE10 and PDE11 phosphodiesterases. *The Journal of biological chemistry* 287:1210-1219
61. Heikaus CC, Stout JR, Sekharan MR, Eakin CM, Rajagopal P, Brzovic PS, Beavo JA, Klevit RE 2008 Solution structure of the cGMP binding GAF domain from phosphodiesterase 5: insights into nucleotide specificity, dimerization, and cGMP-dependent conformational change. *The Journal of biological chemistry* 283:22749-22759
62. Martinez SE, Heikaus CC, Klevit RE, Beavo JA 2008 The structure of the GAF A domain from phosphodiesterase 6C reveals determinants of cGMP binding, a conserved binding surface, and a large cGMP-dependent conformational change. *The Journal of biological chemistry* 283:25913-25919
63. Wang H, Robinson H, Ke H 2010 Conformation changes, N-terminal involvement, and cGMP signal relay in the phosphodiesterase-5 GAF domain. *The Journal of biological chemistry* 285:38149-38156
64. Mou H, Grazio HJ, 3rd, Cook TA, Beavo JA, Cote RH 1999 cGMP binding to noncatalytic sites on mammalian rod photoreceptor phosphodiesterase is regulated by binding of its gamma and delta subunits. *The Journal of biological chemistry* 274:18813-18820
65. Wu AY, Tang XB, Martinez SE, Ikeda K, Beavo JA 2004 Molecular determinants for cyclic nucleotide binding to the regulatory domains of phosphodiesterase 2A. *The Journal of biological chemistry* 279:37928-37938
66. Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, Xu H, Florio V, Rybalkin SD, Beavo JA, Chen YF, Li JD, Blaxall BC, Abe J, Yan C 2009 Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 105:956-964
67. Yan Z, Wang H, Cai J, Ke H 2009 Refolding and kinetic characterization of the phosphodiesterase-8A catalytic domain. *Protein Expr Purif* 64:82-88
68. Taylor BL, Zhulin IB 1999 PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:479-506
69. Kenan Y, Murata T, Shakur Y, Degerman E, Manganiello VC 2000 Functions of the N-terminal region of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE 3) isoforms. *The Journal of biological chemistry* 275:12331-12338
70. Shakur Y, Takeda K, Kenan Y, Yu ZX, Rena G, Brandt D, Houslay MD, Degerman E, Ferrans VJ, Manganiello VC 2000 Membrane localization of cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 (PDE3). Two N-terminal domains are required for the efficient targeting to, and association of, PDE3 with endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 275:38749-38761
71. Baillie GS, Huston E, Scotland G, Hodgkin M, Gall I, Peden AH, Mackenzie C, Houslay ES, Currie R, Pettitt TR, Walmsley AR, Wakelam MJ, Warwicker J, Houslay MD 2002 TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 277:28298-28309

## Références bibliographiques

72. Bender AT, Beavo JA 2006 Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 58:488-520
73. Sonnenburg WK, Seger D, Kwak KS, Huang J, Charbonneau H, Beavo JA 1995 Identification of inhibitory and calmodulin-binding domains of the PDE1A1 and PDE1A2 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *The Journal of biological chemistry* 270:30989-31000
74. Guo LW, Muradov H, Hajipour AR, Sievert MK, Artemyev NO, Ruoho AE 2006 The inhibitory gamma subunit of the rod cGMP phosphodiesterase binds the catalytic subunits in an extended linear structure. *The Journal of biological chemistry* 281:15412-15422
75. Liu YT, Matte SL, Corbin JD, Francis SH, Cote RH 2009 Probing the catalytic sites and activation mechanism of photoreceptor phosphodiesterase using radiolabeled phosphodiesterase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 284:31541-31547
76. Richter W, Day P, Agrawal R, Bruss MD, Granier S, Wang YL, Rasmussen SG, Horner K, Wang P, Lei T, Patterson AJ, Kobilka B, Conti M 2008 Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J* 27:384-393
77. Handa N, Mizohata E, Kishishita S, Toyama M, Morita S, Uchikubo-Kamo T, Akasaka R, Omori K, Kotera J, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S 2008 Crystal structure of the GAF-B domain from human phosphodiesterase 10A complexed with its ligand, cAMP. *The Journal of biological chemistry* 283:19657-19664
78. Yan C, Bentley JK, Sonnenburg WK, Beavo JA 1994 Differential expression of the 61 kDa and 63 kDa calmodulin-dependent phosphodiesterases in the mouse brain. *J Neurosci* 14:973-984
79. Hurwitz RL, Hirsch KM, Clark DJ, Holcombe VN, Hurwitz MY 1990 Induction of a calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase during phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte mitogenesis. *The Journal of biological chemistry* 265:8901-8907
80. Tenor H, Hatzelmann A, Kupferschmidt R, Stanciu L, Djukanovic R, Schudt C, Wendel A, Church MK, Shute JK 1995 Cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme activities in human alveolar macrophages. *Clin Exp Allergy* 25:625-633
81. Kanda N, Watanabe S 2001 Regulatory roles of adenylate cyclase and cyclic nucleotide phosphodiesterases 1 and 4 in interleukin-13 production by activated human T cells. *Biochem Pharmacol* 62:495-507
82. Yan C, Zhao AZ, Sonnenburg WK, Beavo JA 2001 Stage and cell-specific expression of calmodulin-dependent phosphodiesterases in mouse testis. *Biology of reproduction* 64:1746-1754
83. Andersson KE, Uckert S, Stief C, Hedlund P 2007 Phosphodiesterases (PDEs) and PDE inhibitors for treatment of LUTS. *Neurourol Urodyn* 26:928-933
84. Conti M, Kasson BG, Hsueh AJ 1984 Hormonal regulation of 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterases in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 114:2361-2368
85. Juilfs DM, Soderling S, Burns F, Beavo JA 1999 Cyclic GMP as substrate and regulator of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135:67-104
86. Michie AM, Lobban M, Muller T, Harnett MM, Houslay MD 1996 Rapid regulation of PDE-2 and PDE-4 cyclic AMP phosphodiesterase activity following ligation of the



## Références bibliographiques

- T cell antigen receptor on thymocytes: analysis using the selective inhibitors erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) and rolipram. *Cell Signal* 8:97-110
87. Komasa N, Lugnier C, Andriantsitohaina R, Stoclet JC 1991 Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterases from rat mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* 208:85-87
  88. Liu H, Maurice DH 1998 Expression of cyclic GMP-inhibited phosphodiesterases 3A and 3B (PDE3A and PDE3B) in rat tissues: differential subcellular localization and regulated expression by cyclic AMP. *Br J Pharmacol* 125:1501-1510
  89. Maurice DH 2005 Cyclic nucleotide phosphodiesterase-mediated integration of cGMP and cAMP signaling in cells of the cardiovascular system. *Front Biosci* 10:1221-1228
  90. Palmer D, Maurice DH 2000 Dual expression and differential regulation of phosphodiesterase 3A and phosphodiesterase 3B in human vascular smooth muscle: implications for phosphodiesterase 3 inhibition in human cardiovascular tissues. *Mol Pharmacol* 58:247-252
  91. Sun B, Li H, Shakur Y, Hensley J, Hockman S, Kambayashi J, Manganiello VC, Liu Y 2007 Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. *Cell Signal* 19:1765-1771
  92. Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC, Bondy CA 1995 Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Clin Invest* 95:1528-1538
  93. Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E, Manganiello V 2001 Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:241-277
  94. Reinhardt RR, Bondy CA 1996 Differential cellular pattern of gene expression for two distinct cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases in developing and mature rat brain. *Neuroscience* 72:567-578
  95. Shakur Y, Wilson M, Pooley L, Lobban M, Griffiths SL, Campbell AM, Beattie J, Daly C, Houslay MD 1995 Identification and characterization of the type-IVA cyclic AMP-specific phosphodiesterase RD1 as a membrane-bound protein expressed in cerebellum. *Biochem J* 306 ( Pt 3):801-809
  96. Bolger GB, McPhee I, Houslay MD 1996 Alternative splicing of cAMP-specific phosphodiesterase mRNA transcripts. Characterization of a novel tissue-specific isoform, RNPDE4A8. *The Journal of biological chemistry* 271:1065-1071
  97. Naro F, Zhang R, Conti M 1996 Developmental regulation of unique adenosine 3',5'-monophosphate-specific phosphodiesterase variants during rat spermatogenesis. *Endocrinology* 137:2464-2472
  98. Bolger GB, Rodgers L, Riggs M 1994 Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases. *Gene* 149:237-244
  99. Swinnen JV, Joseph DR, Conti M 1989 Molecular cloning of rat homologues of the *Drosophila melanogaster dunce* cAMP phosphodiesterase: evidence for a family of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5325-5329
  100. Miro X, Perez-Torres S, Puigdomenech P, Palacios JM, Mengod G 2002 Differential distribution of PDE4D splice variant mRNAs in rat brain suggests association with specific pathways and presynaptic localization. *Synapse* 45:259-269
  101. Salanova M, Chun SY, Iona S, Puri C, Stefanini M, Conti M 1999 Type 4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterases are expressed in discrete subcellular compartments during rat spermiogenesis. *Endocrinology* 140:2297-2306

## Références bibliographiques

102. Wang D, Deng C, Bugaj-Gaweda B, Kwan M, Gunwaldsen C, Leonard C, Xin X, Hu Y, Unterbeck A, De Vivo M 2003 Cloning and characterization of novel PDE4D isoforms PDE4D6 and PDE4D7. *Cell Signal* 15:883-891
103. Richter W, Jin SL, Conti M 2005 Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem J* 388:803-811
104. Mcphee I, Pooley L, Lobban M, Bolger G, Houslay MD 1995 Identification, characterization and regional distribution in brain of RPDE-6 (RNPDE4A5), a novel splice variant of the PDE4A cyclic AMP phosphodiesterase family. *Biochem J* 310 ( Pt 3):965-974
105. Mcphee I, Cochran S, Houslay MD 2001 The novel long PDE4A10 cyclic AMP phosphodiesterase shows a pattern of expression within brain that is distinct from the long PDE4A5 and short PDE4A1 isoforms. *Cell Signal* 13:911-918
106. Wallace DA, Johnston LA, Huston E, Macmaster D, Houslay TM, Cheung YF, Campbell L, Millen JE, Smith RA, Gall I, Knowles RG, Sullivan M, Houslay MD 2005 Identification and characterization of PDE4A11, a novel, widely expressed long isoform encoded by the human PDE4A cAMP phosphodiesterase gene. *Mol Pharmacol* 67:1920-1934
107. Wyatt TA, Naftilan AJ, Francis SH, Corbin JD 1998 ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 274:H448-455
108. Shimizu-Albergine M, Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Wolfsgruber W, Hofmann F, Beavo JA 2003 Individual cerebellar Purkinje cells express different cGMP phosphodiesterases (PDEs): in vivo phosphorylation of cGMP-specific PDE (PDE5) as an indicator of cGMP-dependent protein kinase (PKG) activation. *J Neurosci* 23:6452-6459
109. Sopory S, Kaur T, Visweswariah SS 2004 The cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5): intestinal cell expression, regulation and role in fluid secretion. *Cell Signal* 16:681-692
110. Coquil JF, Franks DJ, Wells JN, Dupuis M, Hamet P 1980 Characteristics of a new binding protein distinct from the kinase for guanosine 3':5'-monophosphate in rat platelets. *Biochim Biophys Acta* 631:148-165
111. Zhu B, Strada S, Stevens T 2005 Cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 regulates growth and apoptosis in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L196-206
112. Kotera J, Fujishige K, Omori K 2000 Immunohistochemical localization of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in rat tissues. *J Histochem Cytochem* 48:685-693
113. D'amati G, Di Gioia CR, Bologna M, Giordano D, Giorgi M, Dolci S, Jannini EA 2002 Type 5 phosphodiesterase expression in the human vagina. *Urology* 60:191-195
114. Loughney K, Hill TR, Florio VA, Uher L, Rosman GJ, Wolda SL, Jones BA, Howard ML, Mcallister-Lucas LM, Sonnenburg WK, Francis SH, Corbin JD, Beavo JA, Ferguson K 1998 Isolation and characterization of cDNAs encoding PDE5A, a human cGMP-binding, cGMP-specific 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 216:139-147

## Références bibliographiques

115. Scipioni A, Stefanini S, Santone R, Giorgi M 2005 Immunohistochemical localisation of PDE5 in Leydig and myoid cells of prepuberal and adult rat testis. *Histochem Cell Biol* 124:401-407
116. Vaccari S, Weeks JL, 2nd, Hsieh M, Menniti FS, Conti M 2009 Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of reproduction* 81:595-604
117. Burns ME, Arshavsky VY 2005 Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48:387-401
118. Blackshaw S, Snyder SH 1997 Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. *J Neurosci* 17:8074-8082
119. Holthues H, Vollrath L 2004 The phototransduction cascade in the isolated chick pineal gland revisited. *Brain Res* 999:175-180
120. Carcamo B, Hurwitz MY, Craft CM, Hurwitz RL 1995 The mammalian pineal expresses the cone but not the rod cyclic GMP phosphodiesterase. *J Neurochem* 65:1085-1092
121. Morin F, Lugnier C, Kameni J, Voisin P 2001 Expression and role of phosphodiesterase 6 in the chicken pineal gland. *J Neurochem* 78:88-99
122. Bloom TJ, Beavo JA 1996 Identification and tissue-specific expression of PDE7 phosphodiesterase splice variants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14188-14192
123. Michaeli T, Bloom TJ, Martins T, Loughney K, Ferguson K, Riggs M, Rodgers L, Beavo JA, Wigler M 1993 Isolation and characterization of a previously undetected human cAMP phosphodiesterase by complementation of cAMP phosphodiesterase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 268:12925-12932
124. Glavas NA, Ostenson C, Schaefer JB, Vasta V, Beavo JA 2001 T cell activation up-regulates cyclic nucleotide phosphodiesterases 8A1 and 7A3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6319-6324
125. Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM 2000 Cloning, characterization, and tissue distribution of mouse phosphodiesterase 7A1. *Biochem Biophys Res Commun* 276:1271-1277
126. Li L, Yee C, Beavo JA 1999 CD3- and CD28-dependent induction of PDE7 required for T cell activation. *Science* 283:848-851
127. Smith SJ, Brookes-Fazakerley S, Donnelly LE, Barnes PJ, Barnette MS, Giembycz MA 2003 Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L279-289
128. Smith SJ, Cieslinski LB, Newton R, Donnelly LE, Fenwick PS, Nicholson AG, Barnes PJ, Barnette MS, Giembycz MA 2004 Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Mol Pharmacol* 66:1679-1689
129. Sasaki T, Kotera J, Omori K 2002 Novel alternative splice variants of rat phosphodiesterase 7B showing unique tissue-specific expression and phosphorylation. *Biochem J* 361:211-220
130. Sasaki T, Kotera J, Yuasa K, Omori K 2000 Identification of human PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 271:575-583

## Références bibliographiques

131. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB 1998 Isolation and characterization of PDE8A, a novel human cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 246:570-577
132. Wang P, Wu P, Egan RW, Billah MM 2001 Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene* 280:183-194
133. Vasta V, Shimizu-Albergine M, Beavo JA 2006 Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19925-19930
134. Dov A, Abramovitch E, Warwar N, Neshet R 2008 Diminished phosphodiesterase-8B potentiates biphasic insulin response to glucose. *Endocrinology* 149:741-748
135. Hayashi M, Matsushima K, Ohashi H, Tsunoda H, Murase S, Kawarada Y, Tanaka T 1998 Molecular cloning and characterization of human PDE8B, a novel thyroid-specific isozyme of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 250:751-756
136. Patrucco E, Albergine MS, Santana LF, Beavo JA 2010 Phosphodiesterase 8A (PDE8A) regulates excitation-contraction coupling in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 49:330-333
137. Dong H, Osmanova V, Epstein PM, Brocke S 2006 Phosphodiesterase 8 (PDE8) regulates chemotaxis of activated lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 345:713-719
138. Vang AG, Ben-Sasson SZ, Dong H, Kream B, Deninno MP, Claffey MM, Housley W, Clark RB, Epstein PM, Brocke S 2010 PDE8 regulates rapid Teff cell adhesion and proliferation independent of ICER. *PLoS One* 5:e12011
139. Tsai LC, Shimizu-Albergine M, Beavo JA 2011 The high-affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland. *Mol Pharmacol* 79:639-648
140. Fisher DA, Smith JF, Pillar JS, St Denis SH, Cheng JB 1998 Isolation and characterization of PDE9A, a novel human cGMP-specific phosphodiesterase. *The Journal of biological chemistry* 273:15559-15564
141. Guipponi M, Scott HS, Kudoh J, Kawasaki K, Shibuya K, Shintani A, Asakawa S, Chen H, Lalioti MD, Rossier C, Minoshima S, Shimizu N, Antonarakis SE 1998 Identification and characterization of a novel cyclic nucleotide phosphodiesterase gene (PDE9A) that maps to 21q22.3: alternative splicing of mRNA transcripts, genomic structure and sequence. *Hum Genet* 103:386-392
142. Rentero C, Monfort A, Puigdomenech P 2003 Identification and distribution of different mRNA variants produced by differential splicing in the human phosphodiesterase 9A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 301:686-692
143. Loughney K, Snyder PB, Uher L, Rosman GJ, Ferguson K, Florio VA 1999 Isolation and characterization of PDE10A, a novel human 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Gene* 234:109-117
144. Fujishige K, Kotera J, Michibata H, Yuasa K, Takebayashi S, Okumura K, Omori K 1999 Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *The Journal of biological chemistry* 274:18438-18445
145. Fujishige K, Kotera J, Omori K 1999 Striatum- and testis-specific phosphodiesterase PDE10A isolation and characterization of a rat PDE10A. *Eur J Biochem* 266:1118-1127

## Références bibliographiques

146. Seeger TF, Bartlett B, Coskran TM, Culp JS, James LC, Krull DL, Lanfear J, Ryan AM, Schmidt CJ, Strick CA, Varghese AH, Williams RD, Wylie PG, Menniti FS 2003 Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Res* 985:113-126
147. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA 1999 Isolation and characterization of a dual-substrate phosphodiesterase gene family: PDE10A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7071-7076
148. Kelly MP, Logue SF, Brennan J, Day JP, Lakkaraju S, Jiang L, Zhong X, Tam M, Sukoff Rizzo SJ, Platt BJ, Dwyer JM, Neal S, Pulito VL, Agostino MJ, Grauer SM, Navarra RL, Kelley C, Comery TA, Murrills RJ, Houslay MD, Brandon NJ 2010 Phosphodiesterase 11A in brain is enriched in ventral hippocampus and deletion causes psychiatric disease-related phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8457-8462
149. Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, Mcgrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA, Phillips SC 2000 Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3702-3707
150. Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM, Keely SL 1977 Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *The Journal of biological chemistry* 252:3854-3861
151. Keely SL 1979 Prostaglandin E1 activation of heart cAMP-dependent protein kinase: apparent dissociation of protein kinase activation from increases in phosphorylase activity and contractile force. *Mol Pharmacol* 15:235-245
152. Scott JD, Santana LF 2010 A-kinase anchoring proteins: getting to the heart of the matter. *Circulation* 121:1264-1271
153. Rich TC, Fagan KA, Nakata H, Schaack J, Cooper DM, Karpen JW 2000 Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol* 116:147-161
154. Saucerman JJ, Zhang J, Martin JC, Peng LX, Stenbit AE, Tsien RY, McCulloch AD 2006 Systems analysis of PKA-mediated phosphorylation gradients in live cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12923-12928
155. Nikolaev VO, Moshkov A, Lyon AR, Miragoli M, Novak P, Paur H, Lohse MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J 2010 Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science* 327:1653-1657
156. Fischmeister R, Castro LR, Abi-Gerges A, Rochais F, Jurevicius J, Leroy J, Vandecasteele G 2006 Compartmentation of cyclic nucleotide signaling in the heart: the role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Circ Res* 99:816-828
157. Rapundalo ST, Solaro RJ, Kranias EG 1989 Inotropic responses to isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors in intact guinea pig hearts: comparison of cyclic AMP levels and phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins. *Circ Res* 64:104-111
158. Weishaar RE, Kobylarz-Singer DC, Steffen RP, Kaplan HR 1987 Subclasses of cyclic AMP-specific phosphodiesterase in left ventricular muscle and their involvement in regulating myocardial contractility. *Circ Res* 61:539-547
159. Rochais F, Abi-Gerges A, Horner K, Lefebvre F, Cooper DM, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G 2006 A specific pattern of phosphodiesterases controls the cAMP

## Références bibliographiques

- signals generated by different Gs-coupled receptors in adult rat ventricular myocytes. *Circ Res* 98:1081-1088
160. Nikolaev VO, Gambaryan S, Engelhardt S, Walter U, Lohse MJ 2005 Real-time monitoring of the PDE2 activity of live cells: hormone-stimulated cAMP hydrolysis is faster than hormone-stimulated cAMP synthesis. *The Journal of biological chemistry* 280:1716-1719
161. Mongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Dostmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolucci N, Houslay MD, Zaccolo M 2006 Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circ Res* 98:226-234
162. Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS 2007 Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20990-20995
163. Kammerer S, Burns-Hamuro LL, Ma Y, Hamon SC, Canaves JM, Shi MM, Nelson MR, Sing CF, Cantor CR, Taylor SS, Braun A 2003 Amino acid variant in the kinase binding domain of dual-specific A kinase-anchoring protein 2: a disease susceptibility polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4066-4071
164. Wirtenberger M, Schmutzhard J, Hemminki K, Meindl A, Sutter C, Schmutzler RK, Wappenschmidt B, Kiechle M, Arnold N, Weber BH, Niederacher D, Bartram CR, Burwinkel B 2007 The functional genetic variant Ile646Val located in the kinase binding domain of the A-kinase anchoring protein 10 is associated with familial breast cancer. *Carcinogenesis* 28:423-426
165. Manni S, Mauban JH, Ward CW, Bond M 2008 Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells. *The Journal of biological chemistry* 283:24145-24154
166. Li X, Vadrevu S, Dunlop A, Day J, Advant N, Troeger J, Klussmann E, Jaffrey E, Hay RT, Adams DR, Houslay MD, Baillie GS 2010 Selective SUMO modification of cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) regulates the functional consequences of phosphorylation by PKA and ERK. *Biochem J* 428:55-65
167. Zakhary DR, Moravec CS, Bond M 2000 Regulation of PKA binding to AKAPs in the heart: alterations in human heart failure. *Circulation* 101:1459-1464
168. Aye TT, Soni S, Van Veen TA, Van Der Heyden MA, Cappadona S, Varro A, De Weger RA, De Jonge N, Vos MA, Heck AJ, Scholten A 2012 Reorganized PKA-AKAP associations in the failing human heart. *J Mol Cell Cardiol* 52:511-518
169. Sin YY, Edwards HV, Li X, Day JP, Christian F, Dunlop AJ, Adams DR, Zaccolo M, Houslay MD, Baillie GS 2011 Disruption of the cyclic AMP phosphodiesterase-4 (PDE4)-HSP20 complex attenuates the beta-agonist induced hypertrophic response in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 50:872-883
170. Serrels B, Sandilands E, Serrels A, Baillie G, Houslay MD, Brunton VG, Canel M, Machesky LM, Anderson KI, Frame MC 2010 A complex between FAK, RACK1, and PDE4D5 controls spreading initiation and cancer cell polarity. *Curr Biol* 20:1086-1092
171. Smith KJ, Baillie GS, Hyde EI, Li X, Houslay TM, Mccahill A, Dunlop AJ, Bolger GB, Klussmann E, Adams DR, Houslay MD 2007 1H NMR structural and functional characterisation of a cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) N-terminal region peptide that disrupts PDE4D5 interaction with the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1. *Cell Signal* 19:2612-2624

## Références bibliographiques

172. Kotera J, Francis SH, Grimes KA, Rouse A, Blount MA, Corbin JD 2004 Allosteric sites of phosphodiesterase-5 sequester cyclic GMP. *Front Biosci* 9:378-386
173. Sonnenburg WK, Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Kwak KS, Rybalkina IG, Beavo JA 1998 Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Methods* 14:3-19
174. Nagel DJ, Aizawa T, Jeon KI, Liu W, Mohan A, Wei H, Miano JM, Florio VA, Gao P, Korshunov VA, Berk BC, Yan C 2006 Role of nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated phosphodiesterase 1A in vascular smooth muscle cell growth and survival. *Circ Res* 98:777-784
175. Rybalkin SD, Bornfeldt KE, Sonnenburg WK, Rybalkina IG, Kwak KS, Hanson K, Krebs EG, Beavo JA 1997 Calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1C) is induced in human arterial smooth muscle cells of the synthetic, proliferative phenotype. *J Clin Invest* 100:2611-2621
176. Vandeput F, Wolda SL, Krall J, Hambleton R, Uher L, Mccaw KN, Radwanski PB, Florio V, Movsesian MA 2007 Cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1C1 in human cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 282:32749-32757
177. Murray F, Patel HH, Suda RY, Zhang S, Thistlethwaite PA, Yuan JX, Insel PA 2007 Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension: role for PDE1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L294-303
178. Schermuly RT, Pullamsetti SS, Kwapiszewska G, Dumitrescu R, Tian X, Weissmann N, Ghofrani HA, Kaulen C, Dunkern T, Schudt C, Voswinckel R, Zhou J, Samidurai A, Klepetko W, Paddenberg R, Kummer W, Seeger W, Grimminger F 2007 Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* 115:2331-2339
179. Jiang X, Li J, Paskind M, Epstein PM 1996 Inhibition of calmodulin-dependent phosphodiesterase induces apoptosis in human leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11236-11241
180. Bender AT, Ostenson CL, Wang EH, Beavo JA 2005 Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:497-502
181. Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ 2006 Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 5:660-670
182. Kelly MP, Brandon NJ 2009 Differential function of phosphodiesterase families in the brain: gaining insights through the use of genetically modified animals. *Prog Brain Res* 179:67-73
183. Siuciak JA, Mccarthy SA, Chapin DS, Reed TM, Vorhees CV, Repaske DR 2007 Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-1B (PDE1B) enzyme. *Neuropharmacology* 53:113-124
184. Beavo JA, Hardman JG, Sutherland EW 1971 Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate hydrolysis by guanosine 3',5'-monophosphate. *The Journal of biological chemistry* 246:3841-3846
185. Macfarland RT, Zelus BD, Beavo JA 1991 High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *The Journal of biological chemistry* 266:136-142

## Références bibliographiques

186. Hepp R, Tricoire L, Hu E, Gervasi N, Paupardin-Tritsch D, Lambolez B, Vincent P 2007 Phosphodiesterase type 2 and the homeostasis of cyclic GMP in living thalamic neurons. *J Neurochem* 102:1875-1886
187. Rutten K, Van Donkelaar EL, Ferrington L, Blokland A, Bollen E, Steinbusch HW, Kelly PA, Prickaerts JH 2009 Phosphodiesterase inhibitors enhance object memory independent of cerebral blood flow and glucose utilization in rats. *Neuropsychopharmacology* 34:1914-1925
188. Schmidt CJ 2010 Phosphodiesterase inhibitors as potential cognition enhancing agents. *Curr Top Med Chem* 10:222-230
189. Van Donkelaar EL, Rutten K, Blokland A, Akkerman S, Steinbusch HW, Prickaerts J 2008 Phosphodiesterase 2 and 5 inhibition attenuates the object memory deficit induced by acute tryptophan depletion. *Eur J Pharmacol* 600:98-104
190. Castro LR, Verde I, Cooper DM, Fischmeister R 2006 Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113:2221-2228
191. Masood A, Huang Y, Hajjhussein H, Xiao L, Li H, Wang W, Hamza A, Zhan CG, O'donnell JM 2009 Anxiolytic effects of phosphodiesterase-2 inhibitors associated with increased cGMP signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 331:690-699
192. Manns JM, Brenna KJ, Colman RW, Sheth SB 2002 Differential regulation of human platelet responses by cGMP inhibited and stimulated cAMP phosphodiesterases. *Thromb Haemost* 87:873-879
193. Velardez MO, De Laurentis A, Del Carmen Diaz M, Lasaga M, Pisera D, Seilicovich A, Duvilanski BH 2000 Role of phosphodiesterase and protein kinase G on nitric oxide-induced inhibition of prolactin release from the rat anterior pituitary. *Eur J Endocrinol* 143:279-284
194. Seybold J, Thomas D, Witzernath M, Boral S, Hocke AC, Burger A, Hatzelmann A, Tenor H, Schudt C, Krull M, Schutte H, Hippenstiel S, Suttorp N 2005 Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* 105:3569-3576
195. Surapisitchat J, Jeon KI, Yan C, Beavo JA 2007 Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circ Res* 101:811-818
196. Favot L, Keravis T, Holl V, Le Bec A, Lugnier C 2003 VEGF-induced HUVEC migration and proliferation are decreased by PDE2 and PDE4 inhibitors. *Thromb Haemost* 90:334-343
197. Favot L, Keravis T, Lugnier C 2004 Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost* 92:634-645
198. Netherton SJ, Maurice DH 2005 Vascular endothelial cell cyclic nucleotide phosphodiesterases and regulated cell migration: implications in angiogenesis. *Mol Pharmacol* 67:263-272
199. Suttorp N, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Podzuweit T 1996 Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol* 270:C778-785
200. Ding B, Abe J, Wei H, Xu H, Che W, Aizawa T, Liu W, Molina CA, Sadoshima J, Blaxall BC, Berk BC, Yan C 2005 A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14771-14776



## Références bibliographiques

201. Eriksson JW, Wesslau C, Smith U 1994 The cGMP-inhibitable phosphodiesterase modulates glucose transport activation by insulin. *Biochim Biophys Acta* 1189:163-167
202. Zmuda-Trzebiatowska E, Oknianska A, Manganiello V, Degerman E 2006 Role of PDE3B in insulin-induced glucose uptake, GLUT-4 translocation and lipogenesis in primary rat adipocytes. *Cell Signal* 18:382-390
203. Walz HA, Harndahl L, Wierup N, Zmuda-Trzebiatowska E, Svnnelid F, Manganiello VC, Ploug T, Sundler F, Degerman E, Ahren B, Holst LS 2006 Early and rapid development of insulin resistance, islet dysfunction and glucose intolerance after high-fat feeding in mice overexpressing phosphodiesterase 3B. *J Endocrinol* 189:629-641
204. Tang Y, Osawa H, Onuma H, Nishimiya T, Ochi M, Sugita A, Makino H 2001 Phosphodiesterase 3B gene expression is enhanced in the liver but reduced in the adipose tissue of obese insulin resistant db/db mouse. *Diabetes Res Clin Pract* 54:145-155
205. Rahn Landstrom T, Mei J, Karlsson M, Manganiello V, Degerman E 2000 Down-regulation of cyclic-nucleotide phosphodiesterase 3B in 3T3-L1 adipocytes induced by tumour necrosis factor alpha and cAMP. *Biochem J* 346 Pt 2:337-343
206. Zhang HH, Halbleib M, Ahmad F, Manganiello VC, Greenberg AS 2002 Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP. *Diabetes* 51:2929-2935
207. Zhao AZ, Shinohara MM, Huang D, Shimizu M, Eldar-Finkelman H, Krebs EG, Beavo JA, Bornfeldt KE 2000 Leptin induces insulin-like signaling that antagonizes cAMP elevation by glucagon in hepatocytes. *The Journal of biological chemistry* 275:11348-11354
208. Zhao AZ, Zhao H, Teague J, Fujimoto W, Beavo JA 1997 Attenuation of insulin secretion by insulin-like growth factor 1 is mediated through activation of phosphodiesterase 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3223-3228
209. Zhao AZ, Bornfeldt KE, Beavo JA 1998 Leptin inhibits insulin secretion by activation of phosphodiesterase 3B. *J Clin Invest* 102:869-873
210. Muller B, Lugnier C, Stoclet JC 1990 Implication of cyclic AMP in the positive inotropic effects of cyclic GMP-inhibited cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors on guinea pig isolated left atria. *J Cardiovasc Pharmacol* 15:444-451
211. Beavo JA 1995 Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 75:725-748
212. Manganiello VC, Murata T, Taira M, Belfrage P, Degerman E 1995 Diversity in cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzyme families. *Arch Biochem Biophys* 322:1-13
213. Bolger G, Michaeli T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, Riggs M, Wigler M, Ferguson K 1993 A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol Cell Biol* 13:6558-6571
214. Haworth RS, Cuello F, Avkiran M 2011 Regulation by phosphodiesterase isoforms of protein kinase A-mediated attenuation of myocardial protein kinase D activation. *Basic Res Cardiol* 106:51-63

## Références bibliographiques

215. Houslay MD, Baillie GS, Maurice DH 2007 cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res* 100:950-966
216. Kerfant BG, Zhao D, Lorenzen-Schmidt I, Wilson LS, Cai S, Chen SR, Maurice DH, Backx PH 2007 PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circ Res* 101:400-408
217. Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warriar S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR 2005 Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell* 123:25-35
218. Perry SJ, Baillie GS, Kohout TA, McPhee I, Magiera MM, Ang KL, Miller WE, Mclean AJ, Conti M, Houslay MD, Lefkowitz RJ 2002 Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science* 298:834-836
219. Xiang Y, Naro F, Zoudilova M, Jin SL, Conti M, Kobilka B 2005 Phosphodiesterase 4D is required for beta2 adrenoceptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:909-914
220. Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, Conti M, Fischmeister R, Vandecasteele G 2008 Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca<sup>2+</sup> channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circ Res* 102:1091-1100
221. Blokland A, Schreiber R, Prickaerts J 2006 Improving memory: a role for phosphodiesterases. *Curr Pharm Des* 12:2511-2523
222. Siuciak JA 2008 The role of phosphodiesterases in schizophrenia : therapeutic implications. *CNS Drugs* 22:983-993
223. Kotera J, Fujishige K, Imai Y, Kawai E, Michibata H, Akatsuka H, Yanaka N, Omori K 1999 Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur J Biochem* 262:866-873
224. Lin CS, Lau A, Tu R, Lue TF 2000 Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 268:596-602
225. Bessay EP, Blount MA, Zoraghi R, Beasley A, Grimes KA, Francis SH, Corbin JD 2008 Phosphorylation increases affinity of the phosphodiesterase-5 catalytic site for tadalafil. *J Pharmacol Exp Ther* 325:62-68
226. Blount MA, Beasley A, Zoraghi R, Sekhar KR, Bessay EP, Francis SH, Corbin JD 2004 Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. *Mol Pharmacol* 66:144-152
227. Corbin JD, Turko IV, Beasley A, Francis SH 2000 Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *Eur J Biochem* 267:2760-2767
228. Mullershausen F, Friebe A, Feil R, Thompson WJ, Hofmann F, Koesling D 2003 Direct activation of PDE5 by cGMP: long-term effects within NO/cGMP signaling. *J Cell Biol* 160:719-727
229. Mullershausen F, Russwurm M, Thompson WJ, Liu L, Koesling D, Friebe A 2001 Rapid nitric oxide-induced desensitization of the cGMP response is caused by increased activity of phosphodiesterase type 5 paralleled by phosphorylation of the enzyme. *J Cell Biol* 155:271-278

## Références bibliographiques

230. Rybalkin SD, Rybalkina IG, Feil R, Hofmann F, Beavo JA 2002 Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 277:3310-3317
231. Borlaug BA, Melenovsky V, Marhin T, Fitzgerald P, Kass DA 2005 Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. *Circulation* 112:2642-2649
232. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA 2005 Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11:214-222
233. Wharton J, Strange JW, Moller GM, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR 2005 Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med* 172:105-113
234. Van Staveren WC, Steinbusch HW, Markerink-Van Ittersum M, Repaske DR, Goy MF, Kotera J, Omori K, Beavo JA, De Vente J 2003 mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol* 467:566-580
235. Bender AT, Beavo JA 2004 Specific localized expression of cGMP PDEs in Purkinje neurons and macrophages. *Neurochem Int* 45:853-857
236. Kotera J, Yanaka N, Fujishige K, Imai Y, Akatsuka H, Ishizuka T, Kawashima K, Omori K 1997 Expression of rat cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase mRNA in Purkinje cell layers during postnatal neuronal development. *Eur J Biochem* 249:434-442
237. Corbin JD, Francis SH 1999 Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *The Journal of biological chemistry* 274:13729-13732
238. Jeremy JY, Ballard SA, Naylor AM, Miller MA, Angelini GD 1997 Effects of sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, and papaverine on cyclic GMP and cyclic AMP levels in the rabbit corpus cavernosum in vitro. *Br J Urol* 79:958-963
239. Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS 2007 Protein kinase G-mediated stimulation of basal Leydig cell steroidogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E1399-1408
240. Mochida H, Takagi M, Inoue H, Noto T, Yano K, Fujishige K, Sasaki T, Yuasa K, Kotera J, Omori K, Kikkawa K 2002 Enzymological and pharmacological profile of T-0156, a potent and selective phosphodiesterase type 5 inhibitor. *Eur J Pharmacol* 456:91-98
241. Saraiva KL, Silva AK, Wanderley MI, De Araujo AA, De Souza JR, Peixoto CA 2009 Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. *Int J Exp Pathol* 90:454-462
242. Andric SA, Janjic MM, Stojkov NJ, Kostic TS 2010 Sildenafil treatment in vivo stimulates Leydig cell steroidogenesis via the cAMP/cGMP signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299:E544-550
243. Hurwitz RL, Bunt-Milam AH, Chang ML, Beavo JA 1985 cGMP phosphodiesterase in rod and cone outer segments of the retina. *The Journal of biological chemistry* 260:568-573
244. Lipkin VM, Khramtsov NV, Vasilevskaya IA, Atabekova NV, Muradov KG, Gubanov VV, Li T, Johnston JP, Volpp KJ, Applebury ML 1990 Beta-subunit of bovine rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase. Comparison with the phosphodiesterase family. *The Journal of biological chemistry* 265:12955-12959

## Références bibliographiques

245. Li TS, Volpp K, Applebury ML 1990 Bovine cone photoreceptor cGMP phosphodiesterase structure deduced from a cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:293-297
246. Cote RH, Bownds MD, Arshavsky VY 1994 cGMP binding sites on photoreceptor phosphodiesterase: role in feedback regulation of visual transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4845-4849
247. Mou H, Cote RH 2001 The catalytic and GAF domains of the rod cGMP phosphodiesterase (PDE6) heterodimer are regulated by distinct regions of its inhibitory gamma subunit. *The Journal of biological chemistry* 276:27527-27534
248. Han P, Sonati P, Rubin C, Michaeli T 2006 PDE7A1, a cAMP-specific phosphodiesterase, inhibits cAMP-dependent protein kinase by a direct interaction with C. *The Journal of biological chemistry* 281:15050-15057
249. Sasaki T, Kotera J, Omori K 2004 Transcriptional activation of phosphodiesterase 7B1 by dopamine D1 receptor stimulation through the cyclic AMP/cyclic AMP-dependent protein kinase/cyclic AMP-response element binding protein pathway in primary striatal neurons. *J Neurochem* 89:474-483
250. Soderling SH, Bayuga SJ, Beavo JA 1998 Cloning and characterization of a cAMP-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8991-8996
251. Esposito G, Jaiswal BS, Xie F, Krajnc-Franken MA, Robben TJ, Strik AM, Kuil C, Philipsen RL, Van Duin M, Conti M, Gossen JA 2004 Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2993-2998
252. Nolan MA, Babcock DF, Wennemuth G, Brown W, Burton KA, Mcknight GS 2004 Sperm-specific protein kinase A catalytic subunit Calpha2 orchestrates cAMP signaling for male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13483-13488
253. Horvath A, Giatzakis C, Tsang K, Greene E, Osorio P, Boikos S, Libe R, Patronas Y, Robinson-White A, Remmers E, Bertherat J, Nesterova M, Stratakis CA 2008 A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Eur J Hum Genet* 16:1245-1253
254. Lakics V, Karran EH, Boess FG 2010 Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59:367-374
255. Bartsch O, Bartlick B, Ivell R 2004 Phosphodiesterase 4 inhibition synergizes with relaxin signaling to promote decidualization of human endometrial stromal cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:324-334
256. Kleiman RJ, Chapin DS, Christoffersen C, Freeman J, Fonseca KR, Geoghegan KF, Grimwood S, Guanowsky V, Hajos M, Harms JF, Helal CJ, Hoffmann WE, Kocan GP, Majchrzak MJ, McGinnis D, Mclean S, Menniti FS, Nelson F, Roof R, Schmidt AW, Seymour PA, Stephenson DT, Tingley FD, Vanase-Frawley M, Verhoest PR, Schmidt CJ 2012 Phosphodiesterase 9A regulates central cGMP and modulates responses to cholinergic and monoaminergic perturbation in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 341:396-409
257. Gross-Langenhoff M, Hofbauer K, Weber J, Schultz A, Schultz JE 2006 cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *The Journal of biological chemistry* 281:2841-2846

## Références bibliographiques

258. Schmidt CJ, Chapin DS, Cianfrogna J, Corman ML, Hajos M, Harms JF, Hoffman WE, Lebel LA, Mccarthy SA, Nelson FR, Proulx-Lafrance C, Majchrzak MJ, Ramirez AD, Schmidt K, Seymour PA, Siuciak JA, Tingley FD, 3rd, Williams RD, Verhoest PR, Menniti FS 2008 Preclinical characterization of selective phosphodiesterase 10A inhibitors: a new therapeutic approach to the treatment of schizophrenia. *J Pharmacol Exp Ther* 325:681-690
259. Giampa C, Patassini S, Borreca A, Laurenti D, Marullo F, Bernardi G, Menniti FS, Fusco FR 2009 Phosphodiesterase 10 inhibition reduces striatal excitotoxicity in the quinolinic acid model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 34:450-456
260. Hetman JM, Robas N, Baxendale R, Fidock M, Phillips SC, Soderling SH, Beavo JA 2000 Cloning and characterization of two splice variants of human phosphodiesterase 11A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12891-12895
261. Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T, Omori K 2000 Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *The Journal of biological chemistry* 275:31469-31479
262. Wayman C, Phillips S, Lunny C, Webb T, Fawcett L, Baxendale R, Burgess G 2005 Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *Int J Impot Res* 17:216-223
263. Himes BE, Hunninghake GM, Baurley JW, Rafaels NM, Sleiman P, Strachan DP, Wilk JB, Willis-Owen SA, Klanderma B, Lasky-Su J, Lazarus R, Murphy AJ, Soto-Quiros ME, Avila L, Beaty T, Mathias RA, Ruczinski I, Barnes KC, Celedon JC, Cookson WO, Gauderman WJ, Gilliland FD, Hakonarson H, Lange C, Moffatt MF, O'connor GT, Raby BA, Silverman EK, Weiss ST 2009 Genome-wide association analysis identifies PDE4D as an asthma-susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 84:581-593
264. Hansen G, Jin S, Umetsu DT, Conti M 2000 Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6751-6756
265. Kung TT, Crawley Y, Luo B, Young S, Kreutner W, Chapman RW 2000 Inhibition of pulmonary eosinophilia and airway hyperresponsiveness in allergic mice by rolipram: involvement of endogenously released corticosterone and catecholamines. *Br J Pharmacol* 130:457-463
266. Ariga M, Neitzert B, Nakae S, Mottin G, Bertrand C, Pruniaux MP, Jin SL, Conti M 2004 Nonredundant function of phosphodiesterases 4D and 4B in neutrophil recruitment to the site of inflammation. *J Immunol* 173:7531-7538
267. Gantner F, Kupferschmidt R, Schudt C, Wendel A, Hatzelmann A 1997 In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors. *Br J Pharmacol* 121:221-231
268. Barber R, Baillie GS, Bergmann R, Shepherd MC, Sepper R, Houslay MD, Heeke GV 2004 Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L332-343
269. Homma S, Sakamoto T, Hegab AE, Saitoh W, Nomura A, Ishii Y, Morishima Y, Iizuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Massoud HH, Massoud HM, Hassanein KM, Sekizawa K 2006 Association of phosphodiesterase 4D gene polymorphisms with

## Références bibliographiques

- chronic obstructive pulmonary disease: relationship to interleukin 13 gene polymorphism. *Int J Mol Med* 18:933-939
270. Rabe KF, Bateman ED, O'donnell D, Witte S, Bredenbroeker D, Bethke TD 2005 Roflumilast--an oral anti-inflammatory treatment for chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet* 366:563-571
271. Rennard SI, Schachter N, Streck M, Rickard K, Amit O 2006 Cilomilast for COPD: results of a 6-month, placebo-controlled study of a potent, selective inhibitor of phosphodiesterase 4. *Chest* 129:56-66
272. Calverley PM, Sanchez-Toril F, Mcivor A, Teichmann P, Bredenbroeker D, Fabbri LM 2007 Effect of 1-year treatment with roflumilast in severe chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 176:154-161
273. Fabbri LM, Calverley PM, Izquierdo-Alonso JL, Bundschuh DS, Brose M, Martinez FJ, Rabe KF 2009 Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet* 374:695-703
274. Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Lane KB, Morgan NV, Wheeler L, Phillips JA, 3rd, Newman J, Williams D, Galie N, Manes A, Mcneil K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Corris P, Humbert M, Donnai D, Martensson G, Tranebjaerg L, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC 2001 BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* 68:92-102
275. Humbert M, Trembath RC 2002 Genetics of pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur Respir J* 20:741-749
276. Schermuly RT, Kreisselmeier KP, Ghofrani HA, Yilmaz H, Butrous G, Ermert L, Ermert M, Weissmann N, Rose F, Guenther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F 2004 Chronic sildenafil treatment inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 169:39-45
277. Sastry BK, Narasimhan C, Reddy NK, Raju BS 2004 Clinical efficacy of sildenafil in primary pulmonary hypertension: a randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Am Coll Cardiol* 43:1149-1153
278. Faucz FR, Horvath A, Rothenbuhler A, Almeida MQ, Libe R, Raffin-Sanson ML, Bertherat J, Carraro DM, Soares FA, Molina Gde C, Campos AH, Alexandre RB, Bendhack ML, Nesterova M, Stratakis CA 2011 Phosphodiesterase 11A (PDE11A) genetic variants may increase susceptibility to prostatic cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:E135-140
279. Lassen LH, Thomsen LL, Olesen J 1995 Histamine induces migraine via the H1-receptor. Support for the NO hypothesis of migraine. *Neuroreport* 6:1475-1479
280. Olesen J, Thomsen LL, Iversen H 1994 Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *Trends Pharmacol Sci* 15:149-153
281. Cherry JA, Davis RL 1999 Cyclic AMP phosphodiesterases are localized in regions of the mouse brain associated with reinforcement, movement, and affect. *J Comp Neurol* 407:287-301
282. Iona S, Cuomo M, Bushnik T, Naro F, Sette C, Hess M, Shelton ER, Conti M 1998 Characterization of the rolipram-sensitive, cyclic AMP-specific phosphodiesterases: identification and differential expression of immunologically distinct forms in the rat brain. *Mol Pharmacol* 53:23-32

## Références bibliographiques

283. Ye Y, O'donnell JM 1996 Diminished noradrenergic stimulation reduces the activity of rolipram-sensitive, high-affinity cyclic AMP phosphodiesterase in rat cerebral cortex. *J Neurochem* 66:1894-1902
284. Suvarna NU, O'donnell JM 2002 Hydrolysis of N-methyl-D-aspartate receptor-stimulated cAMP and cGMP by PDE4 and PDE2 phosphodiesterases in primary neuronal cultures of rat cerebral cortex and hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 302:249-256
285. Shotwell SL 1983 Cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase and its role in learning in *Drosophila*. *J Neurosci* 3:739-747
286. Tully T, Cambiazo V, Kruse L 1994 Memory through metamorphosis in normal and mutant *Drosophila*. *J Neurosci* 14:68-74
287. Villiger JW, Dunn AJ 1981 Phosphodiesterase inhibitors facilitate memory for passive avoidance conditioning. *Behav Neural Biol* 31:354-359
288. Randt CT, Judge ME, Bonnet KA, Quartermain D 1982 Brain cyclic AMP and memory in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 17:677-680
289. Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER 1999 Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5280-5285
290. Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, Malloy MP, Chubb JE, Huston E, Baillie GS, Thomson PA, Hill EV, Brandon NJ, Rain JC, Camargo LM, Whiting PJ, Houslay MD, Blackwood DH, Muir WJ, Porteous DJ 2005 DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* 310:1187-1191
291. Pickard BS, Thomson PA, Christoforou A, Evans KL, Morris SW, Porteous DJ, Blackwood DH, Muir WJ 2007 The PDE4B gene confers sex-specific protection against schizophrenia. *Psychiatr Genet* 17:129-133
292. Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JC 2007 Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. *Neuron* 54:387-402
293. Siuciak JA, Mccarthy SA, Chapin DS, Martin AN 2008 Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-4B (PDE4B) enzyme. *Psychopharmacology (Berl)* 197:115-126
294. Smith SM, Uslaner JM, Cox CD, Huszar SL, Cannon CE, Vardigan JD, Eddins D, Toolan DM, Kandebo M, Yao L, Raheem IT, Schreier JD, Breslin MJ, Coleman PJ, Renger JJ 2012 The novel phosphodiesterase 10A inhibitor THPP-1 has antipsychotic-like effects in rat and improves cognition in rat and rhesus monkey. *Neuropharmacology*
295. Maroteaux P, Malamut G 1968 [Acrodysostosis]. *Presse Med* 76:2189-2192
296. Robinow M, Pfeiffer RA, Gorlin RJ, Mckusick VA, Renuart AW, Johnson GF, Summitt RL 1971 Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis Child* 121:195-203
297. Linglart A, Menguy C, Couvineau A, Auzan C, Gunes Y, Cancel M, Motte E, Pinto G, Chanson P, Bougneres P, Clauser E, Silve C 2011 Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N Engl J Med* 364:2218-2226

## Références bibliographiques

298. Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E, Guerrot AM, Flahaut P, Duncombe A, Baujat G, Lyonnet S, Thalassinos C, Nitschke P, Casanova JL, Le Merrer M, Munnich A, Cormier-Daire V 2012 Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 90:740-745
299. Lee H, Graham JM, Jr., Rimoin DL, Lachman RS, Krejci P, Tompson SW, Nelson SF, Krakow D, Cohn DH 2012 Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am J Hum Genet* 90:746-751
300. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM 1991 Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med* 325:1688-1695
301. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA 2000 Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 26:89-92
302. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libe R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I, Stratakis CA 2006 A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 38:794-800
303. Bingham J, Sudarsanam S, Srinivasan S 2006 Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 350:25-32
304. Sonnenburg WK, Mullaney PJ, Beavo JA 1991 Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *The Journal of biological chemistry* 266:17655-17661
305. Cote M, Payet MD, Rousseau E, Guillon G, Gallo-Payet N 1999 Comparative involvement of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylyl cyclase on adrenocorticotropin-induced increase of cyclic adenosine monophosphate in rat and human glomerulosa cells. *Endocrinology* 140:3594-3601
306. Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H 2006 The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 69:318-328
307. Horvath A, Mericq V, Stratakis CA 2008 Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 358:750-752
308. Di Luigi L, Baldari C, Sgro P, Emerenziani GP, Gallotta MC, Bianchini S, Romanelli F, Pigozzi F, Lenzi A, Guidetti L 2008 The type 5 phosphodiesterase inhibitor tadalafil influences salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulphate responses to maximal exercise in healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:3510-3514
309. Di Luigi L, Sgro P, Baldari C, Gallotta MC, Emerenziani GP, Crescioli C, Bianchini S, Romanelli F, Lenzi A, Guidetti L 2012 The phosphodiesterases type 5 inhibitor tadalafil reduces the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in men during cycle ergometric exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E972-978
310. Morelli A, Filippi S, Mancina R, Luconi M, Vignozzi L, Marini M, Orlando C, Vannelli GB, Aversa A, Natali A, Forti G, Giorgi M, Jannini EA, Ledda F, Maggi M 2004 Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology* 145:2253-2263
311. Libe R, Fratticci A, Coste J, Tissier F, Horvath A, Ragazzon B, Rene-Corail F, Groussin L, Bertagna X, Raffin-Sanson ML, Stratakis CA, Bertherat J 2008



## Références bibliographiques

- Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res* 14:4016-4024
312. Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, Sestu N, Maschio A, Busonero F, Albai G, Dei M, Lai S, Mulas A, Crisponi L, Tanaka T, Bandinelli S, Guralnik JM, Loi A, Balaci L, Sole G, Prinzis A, Mariotti S, Shuldiner AR, Cao A, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Nagaraja R, Sanna S, Naitza S 2008 Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *Am J Hum Genet* 82:1270-1280
313. Taylor PN, Panicker V, Sayers A, Shields B, Iqbal A, Bremner AP, Beilby JP, Leedman PJ, Hattersley AT, Vaidya B, Frayling T, Evans J, Tobias JH, Timpson NJ, Walsh JP, Dayan CM 2011 A meta-analysis of the associations between common variation in the PDE8B gene and thyroid hormone parameters, including assessment of longitudinal stability of associations over time and effect of thyroid hormone replacement. *Eur J Endocrinol* 164:773-780
314. Grandone A, Perrone L, Cirillo G, Di Sessa A, Corona AM, Amato A, Cresta N, Romano T, Miraglia Del Giudice E 2012 Impact of phosphodiesterase 8B gene rs4704397 variation on thyroid homeostasis in childhood obesity. *Eur J Endocrinol* 166:255-260
315. Shields BM, Freathy RM, Knight BA, Hill A, Weedon MN, Frayling TM, Hattersley AT, Vaidya B 2009 Phosphodiesterase 8B gene polymorphism is associated with subclinical hypothyroidism in pregnancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94:4608-4612
316. Persani L, Lania A, Alberti L, Romoli R, Mantovani G, Filetti S, Spada A, Conti M 2000 Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 85:2872-2878
317. Volpato CB, De Grandi A, Gogele M, Taliun D, Fuchsberger C, Facheris MF, Minelli C, Pattaro C, Pramstaller PP, Hicks AA 2011 Linkage and association analysis of hyperthyrotropinaemia in an Alpine population reveal two novel loci on chromosomes 3q28-29 and 6q26-27. *J Med Genet* 48:549-556
318. Loughney K, Taylor J, Florio VA 2005 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *Int J Impot Res* 17:320-325
319. Stephenson DT, Coskran TM, Wilhelms MB, Adamowicz WO, O'donnell MM, Muravnick KB, Menniti FS, Kleiman RJ, Morton D 2009 Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *J Histochem Cytochem* 57:933-949
320. Persani L, Borgato S, Lania A, Filopanti M, Mantovani G, Conti M, Spada A 2001 Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:3795-3800
321. Gonzalez-Iglesias AE, Jiang Y, Tomic M, Kretschmannova K, Andric SA, Zemkova H, Stojilkovic SS 2006 Dependence of electrical activity and calcium influx-controlled prolactin release on adenylyl cyclase signaling pathway in pituitary lactotrophs. *Mol Endocrinol* 20:2231-2246
322. Ang KL, Antoni FA 2002 Functional plasticity of cyclic AMP hydrolysis in rat adenohipophysial corticotroph cells. *Cell Signal* 14:445-452

## Références bibliographiques

323. Kumari M, Cover PO, Poyser RH, Buckingham JC 1997 Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by three selective type-4 phosphodiesterase inhibitors: in vitro and in vivo studies. *Br J Pharmacol* 121:459-468
324. Hadley AJ, Kumari M, Cover PO, Osborne J, Poyser R, Flack JD, Buckingham JC 1996 Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat by the type 4 phosphodiesterase (PDE-4) inhibitor, denbufylline. *Br J Pharmacol* 119:463-470
325. Lania A, Persani L, Ballare E, Mantovani S, Losa M, Spada A 1998 Constitutively active Gs alpha is associated with an increased phosphodiesterase activity in human growth hormone-secreting adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83:1624-1628
326. Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA 2006 Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 312:1228-1230
327. Leontiou CA, Gueorguiev M, Van Der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A, Jr., Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M 2008 The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:2390-2401
328. Bolger GB, Peden AH, Steele MR, Mackenzie C, Mcewan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS, Houslay MD 2003 Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *The Journal of biological chemistry* 278:33351-33363
329. Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellin G, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB, Korbonits M 2010 Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat* 31:950-960
330. Peverelli E, Ermetici F, Filopanti M, Elli FM, Ronchi CL, Mantovani G, Ferrero S, Bosari S, Beck-Peccoz P, Lania A, Spada A 2009 Analysis of genetic variants of phosphodiesterase 11A in acromegalic patients. *Eur J Endocrinol* 161:687-694
331. Hellstrom WJ, Overstreet JW, Yu A, Saikali K, Shen W, Beasley CM, Jr., Watkins VS 2003 Tadalafil has no detrimental effect on human spermatogenesis or reproductive hormones. *J Urol* 170:887-891
332. Horvath A, Korde L, Greene MH, Libe R, Osorio P, Faucz FR, Raffin-Sanson ML, Tsang KM, Drori-Herishanu L, Patronas Y, Remmers EF, Nikita ME, Moran J, Greene J, Nesterova M, Merino M, Bertherat J, Stratakis CA 2009 Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 69:5301-5306
333. Saez JM 1994 Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15:574-626
334. Shimizu-Albergine M, Tsai LC, Patrucco E, Beavo JA 2012 cAMP-specific phosphodiesterases 8A and 8B, essential regulators of Leydig cell steroidogenesis. *Mol Pharmacol* 81:556-566

## Références bibliographiques

335. Sasseville M, Albuz FK, Cote N, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ 2009 Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biology of reproduction* 81:415-425
336. Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, Cortvrindt R, Bourgain C, Devroey P, Smitz J 2003 Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biology of reproduction* 69:1042-1052
337. Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C, Tsafiriri A 2002 Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 187:153-159
338. Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M, Manganiello V 2004 Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest* 114:196-205
339. Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M 1996 Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol* 178:393-402
340. Mckenna SD, Pietropaolo M, Tos EG, Clark A, Fischer D, Kagan D, Bao B, Chedrese PJ, Palmer S 2005 Pharmacological inhibition of phosphodiesterase 4 triggers ovulation in follicle-stimulating hormone-primed rats. *Endocrinology* 146:208-214
341. Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'ercole AJ, Conti M 1999 Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:11998-12003
342. Chen C, Wickenheisser J, Ewens KG, Ankener W, Legro RS, Dunaif A, Mcallister JM, Spielman RS, Strauss JF, 3rd 2009 PDE8A genetic variation, polycystic ovary syndrome and androgen levels in women. *Mol Hum Reprod* 15:459-469
343. Jiang X, Paskind M, Weltzien R, Epstein PM 1998 Expression and regulation of mRNA for distinct isoforms of cAMP-specific PDE-4 in mitogen-stimulated and leukemic human lymphocytes. *Cell Biochem Biophys* 28:135-160
344. Savai R, Pullamsetti SS, Banat GA, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Schermuly RT 2010 Targeting cancer with phosphodiesterase inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* 19:117-131
345. Lugnier C 2006 Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109:366-398
346. Shimizu K, Murata T, Watanabe Y, Sato C, Morita H, Tagawa T 2009 Characterization of phosphodiesterase 1 in human malignant melanoma cell lines. *Anticancer Res* 29:1119-1122
347. Boess FG, Hendrix M, Van Der Staay FJ, Erb C, Schreiber R, Van Staveren W, De Vente J, Prickaerts J, Blokland A, Koenig G 2004 Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology* 47:1081-1092
348. Domek-Lopacinska K, Strosznajder JB 2008 The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res* 1216:68-77
349. Wenzel J, Zeisig R, Fichtner I 2010 Inhibition of metastasis in a murine 4T1 breast cancer model by liposomes preventing tumor cell-platelet interactions. *Clin Exp Metastasis* 27:25-34

## Références bibliographiques

350. Murata K, Kameyama M, Fukui F, Ohigashi H, Hiratsuka M, Sasaki Y, Kabuto T, Mukai M, Mammoto T, Akedo H, Ishikawa O, Imaoka S 1999 Phosphodiesterase type III inhibitor, cilostazol, inhibits colon cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis* 17:525-530
351. Bobon D, Breulet M, Gerard-Vandenhove MA, Guiot-Goffioul F, Plomteux G, Sastre-Y-Hernandez M, Schratzer M, Troisfontaines B, Von Frenckell R, Wachtel H 1988 Is phosphodiesterase inhibition a new mechanism of antidepressant action? A double blind double-dummy study between rolipram and desipramine in hospitalized major and/or endogenous depressives. *Eur Arch Psychiatry Neurol Sci* 238:2-6
352. Wachtel H 1983 Potential antidepressant activity of rolipram and other selective cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 22:267-272
353. Goldhoff P, Warrington NM, Limbrick DD, Jr., Hope A, Woerner BM, Jackson E, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin JB 2008 Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression. *Clin Cancer Res* 14:7717-7725
354. Chen TC, Wadsten P, Su S, Rawlinson N, Hofman FM, Hill CK, Schonthal AH 2002 The type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram induces expression of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1), resulting in growth inhibition, increased differentiation, and subsequent apoptosis of malignant A-172 glioma cells. *Cancer Biol Ther* 1:268-276
355. Kolosionek E, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Guenther A, Grimminger F, Seeger W, Banat GA, Schermuly RT, Pullamsetti SS 2009 Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4. *Mol Biol Cell* 20:4751-4765
356. Kanehiro A, Ikemura T, Makela MJ, Lahn M, Joetham A, Dakhama A, Gelfand EW 2001 Inhibition of phosphodiesterase 4 attenuates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in a model of secondary allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 163:173-184
357. Harbinson PL, Macleod D, Hawksworth R, O'toole S, Sullivan PJ, Heath P, Kilfeather S, Page CP, Costello J, Holgate ST, Lee TH 1997 The effect of a novel orally active selective PDE4 isoenzyme inhibitor (CDP840) on allergen-induced responses in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 10:1008-1014
358. Van Schalkwyk E, Strydom K, Williams Z, Venter L, Leichtl S, Schmid-Wirlitsch C, Bredenkroger D, Bardin PG 2005 Roflumilast, an oral, once-daily phosphodiesterase 4 inhibitor, attenuates allergen-induced asthmatic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 116:292-298
359. Boswell-Smith V, Spina D, Oxford AW, Comer MB, Seeds EA, Page CP 2006 The pharmacology of two novel long-acting phosphodiesterase 3/4 inhibitors, RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one] and RPL565 [6,7-dihydro-2-(2,6-diisopropylphenoxy)-9,10-dimethoxy-4H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one]. *J Pharmacol Exp Ther* 318:840-848
360. Zhang R, Maratos-Flier E, Flier JS 2009 Reduced adiposity and high-fat diet-induced adipose inflammation in mice deficient for phosphodiesterase 4B. *Endocrinology* 150:3076-3082
361. Papp K, Cather JC, Rosoph L, Sofen H, Langley RG, Matheson RT, Hu C, Day RM 2012 Efficacy of apremilast in the treatment of moderate to severe psoriasis: a randomised controlled trial. *Lancet*

## Références bibliographiques

362. Thompson WJ, Piazza GA, Li H, Liu L, Fetter J, Zhu B, Sperl G, Ahnen D, Pamukcu R 2000 Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated beta-catenin. *Cancer Res* 60:3338-3342
363. Piazza GA, Thompson WJ, Pamukcu R, Alila HW, Whitehead CM, Liu L, Fetter JR, Gresh WE, Jr., Klein-Szanto AJ, Farnell DR, Eto I, Grubbs CJ 2001 Exisulind, a novel proapoptotic drug, inhibits rat urinary bladder tumorigenesis. *Cancer Res* 61:3961-3968
364. Lu S, Liu N, Dass SB, Reiss TF, Knorr BA 2009 Randomized, placebo-controlled study of a selective PDE4 inhibitor in the treatment of asthma. *Respir Med* 103:342-347
365. Torphy TJ, Barnette MS, Underwood DC, Griswold DE, Christensen SB, Murdoch RD, Nieman RB, Compton CH 1999 Ariflo (SB 207499), a second generation phosphodiesterase 4 inhibitor for the treatment of asthma and COPD: from concept to clinic. *Pulm Pharmacol Ther* 12:131-135
366. Calverley PM, Rabe KF, Goehring UM, Kristiansen S, Fabbri LM, Martinez FJ 2009 Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 374:685-694
367. Rennard SI, Calverley PM, Goehring UM, Bredenbroker D, Martinez FJ 2011 Reduction of exacerbations by the PDE4 inhibitor roflumilast--the importance of defining different subsets of patients with COPD. *Respir Res* 12:18
368. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP 2006 Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S252-257
369. Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, Binet JL, Delic J, Merle-Beral H 2003 Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 101:265-269
370. Tinel H, Stelte-Ludwig B, Hutter J, Sandner P 2006 Pre-clinical evidence for the use of phosphodiesterase-5 inhibitors for treating benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms. *BJU Int* 98:1259-1263
371. Koika V, Zhou Z, Vasileiadis I, Roussos C, Finetti F, Monti M, Morbidelli L, Papapetropoulos A 2010 PKG-I inhibition attenuates vascular endothelial growth factor-stimulated angiogenesis. *Vascul Pharmacol* 53:215-222
372. Radovits T, Bomicke T, Kokeny G, Arif R, Loganathan S, Kecsan K, Korkmaz S, Barnucz E, Sandner P, Karck M, Szabo G 2009 The phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil improves cardiovascular dysfunction in experimental diabetes mellitus. *Br J Pharmacol* 156:909-919
373. Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, Dolcetti L, Bronte V, Borrello I 2006 Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 203:2691-2702
374. Adamo CM, Dai DF, Percival JM, Minami E, Willis MS, Patrucco E, Froehner SC, Beavo JA 2010 Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19079-19083
375. Tinsley HN, Gary BD, Keeton AB, Zhang W, Abadi AH, Reynolds RC, Piazza GA 2009 Sulindac sulfide selectively inhibits growth and induces apoptosis of human

## Références bibliographiques

- breast tumor cells by phosphodiesterase 5 inhibition, elevation of cyclic GMP, and activation of protein kinase G. *Mol Cancer Ther* 8:3331-3340
376. Whitehead CM, Earle KA, Fetter J, Xu S, Hartman T, Chan DC, Zhao TL, Piazza G, Klein-Szanto AJ, Pamukcu R, Alila H, Bunn PA, Jr., Thompson WJ 2003 Exisulind-induced apoptosis in a non-small cell lung cancer orthotopic lung tumor model augments docetaxel treatment and contributes to increased survival. *Mol Cancer Ther* 2:479-488
377. Arozarena I, Sanchez-Laorden B, Packer L, Hidalgo-Carcedo C, Hayward R, Viros A, Sahai E, Marais R 2011 Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* 19:45-57
378. Kerr NM, Danesh-Meyer HV 2009 Phosphodiesterase inhibitors and the eye. *Clin Experiment Ophthalmol* 37:514-523
379. Zhang L, Murray F, Zahno A, Kanter JR, Chou D, Suda R, Fenlon M, Rassenti L, Cottam H, Kipps TJ, Insel PA 2008 Cyclic nucleotide phosphodiesterase profiling reveals increased expression of phosphodiesterase 7B in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19532-19537
380. Saravani R, Karami-Tehrani F, Hashemi M, Aghaei M, Edalat R 2012 Inhibition of phosphodiesterase 9 induces cGMP accumulation and apoptosis in human breast cancer cell lines, MCF-7 and MDA-MB-468. *Cell Prolif* 45:199-206
381. Van Der Staay FJ, Rutten K, Barfacker L, Devry J, Erb C, Heckroth H, Karthaus D, Tersteegen A, Van Kampen M, Blokland A, Prickaerts J, Reymann KG, Schroder UH, Hendrix M 2008 The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. *Neuropharmacology* 55:908-918
382. Tian X, Vroom C, Ghofrani HA, Weissmann N, Bieniek E, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS 2011 Phosphodiesterase 10A upregulation contributes to pulmonary vascular remodeling. *PLoS One* 6:e18136
383. Koyama H, Bornfeldt KE, Fukumoto S, Nishizawa Y 2001 Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J Cell Physiol* 186:1-10
384. Siuciak JA, Chapin DS, Harms JF, Lebel LA, Mccarthy SA, Chambers L, Shrikhande A, Wong S, Menniti FS, Schmidt CJ 2006 Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology* 51:386-396
385. Sullivan P, Bekir S, Jaffar Z, Page C, Jeffery P, Costello J 1994 Anti-inflammatory effects of low-dose oral theophylline in atopic asthma. *Lancet* 343:1006-1008
386. Rennard SI 2004 Treatment of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364:791-802
387. Doghman M, Cazareth J, Lalli E 2008 The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:3222-3225
388. Horvath A, Mathyakina L, Vong Q, Baxendale V, Pang AL, Chan WY, Stratakis CA 2006 Serial analysis of gene expression in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:584-596
389. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, Kirschner LS, Matyakhina L, Lorang D, Libutti SK, Stratakis CA 2004 Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia

## Références bibliographiques

- confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 23:1575-1585
390. Iliopoulos D, Bimpaki EI, Nesterova M, Stratakis CA 2009 MicroRNA signature of primary pigmented nodular adrenocortical disease: clinical correlations and regulation of Wnt signaling. *Cancer Res* 69:3278-3282
391. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, Rene-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J 2005 Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* 65:7622-7627
392. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Horvath A, Stratakis CA, Bourdeau I 2008 Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). *Clin Endocrinol (Oxf)* 69:367-373
393. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I 2008 Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:264-270
394. Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, Libe R, Ragazzon B, Launay P, Audebourg A, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J 2008 Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:4135-4140
395. Mazzuco TL, Chabre O, Feige JJ, Thomas M 2006 Aberrant expression of human luteinizing hormone receptor by adrenocortical cells is sufficient to provoke both hyperplasia and Cushing's syndrome features. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:196-203
396. Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N, Feige JJ, Thomas M 2006 Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology* 147:782-790
397. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Robinson-White A, Lenherr SM, Weinberg FD, Claflin ES, Batista D, Bourdeau I, Voutetakis A, Sandrini F, Meoli EM, Bauer AJ, Cho-Chung YS, Bornstein SR, Carney JA, Stratakis CA 2004 A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other PRKAR1A induced lesions. *J Med Genet* 41:923-931
398. Sahut-Barnola I, De Joussineau C, Val P, Lambert-Langlais S, Damon C, Lefrancois-Martinez AM, Pointud JC, Marceau G, Sapin V, Tissier F, Ragazzon B, Bertherat J, Kirschner LS, Stratakis CA, Martinez A 2010 Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific Prkar1a knockout mice. *PLoS Genet* 6:e1000980
399. Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, Stein E, Kamvissi V, Soni P, Bossis I, De Herder W, Carney JA, Bertherat J, Gregersen PK, Remmers EF, Stratakis CA 2006 Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 66:11571-11575
400. Choi M, Scholl UI, Yue P, Bjorklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, Ji W, Cho Y, Patel A, Men CJ, Lolis E, Wisgerhof MV, Geller DS, Mane S, Hellman P, Westin G, Akerstrom G, Wang W, Carling T, Lifton RP 2011 K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* 331:768-772

## Références bibliographiques

401. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, Stewart PM, Bujalska I, Rainey WE 2005 Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:5446-5455
402. Suzuki H, Shibata H, Maruyama T, Ishimura Y, Saruta T 1995 Significance of steroidogenic enzymes in the pathogenesis of hyperfunctioning and non-hyperfunctioning adrenal tumor. *Steroids* 60:42-47
403. Vezzosi D, Bertherat J, Groussin L 2010 Pathogenesis of benign adrenocortical tumors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24:893-905
404. De Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J 2009 Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* 27:1108-1115
405. Vincent-Dejean C, Cazabat L, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Tissier F, Bertagna X, Bertherat J 2008 Identification of a clinically homogenous subgroup of benign cortisol-secreting adrenocortical tumors characterized by alterations of the protein kinase A (PKA) subunits and high PKA activity. *Eur J Endocrinol* 158:829-839
406. Team RC 2012 R: A Language and Environment for tatistical Computing. Vienna, Austria.
407. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP 2003 Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31:e15
408. Hanukoglu I 2006 Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metab Rev* 38:171-196
409. Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, Arlt W, Vay S, Sassone-Corsi P, Allolio B 1998 DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83:2597-2600
410. Assie G, Giordano TJ, Bertherat J 2012 Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. *Mol Cell Endocrinol* 351:111-117
411. Cherradi N, Brandenburger Y, Capponi AM 1998 Mitochondrial regulation of mineralocorticoid biosynthesis by calcium and the StAR protein. *Eur J Endocrinol* 139:249-256
412. Streuli C 1999 Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:634-640
413. Crickard K, Ill CR, Jaffe RB 1981 Control of proliferation of human fetal adrenal cells in vitro. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 53:790-796
414. Chamoux E, Narcy A, Lehoux JG, Gallo-Payet N 2002 Fibronectin, laminin, and collagen IV interact with ACTH and angiotensin II to dictate specific cell behavior and secretion in human fetal adrenal cells in culture. *Endocr Res* 28:637-640
415. Enberg U, Farnebo LO, Wedell A, Grondal S, Thoren M, Grimelius L, Kjellman M, Backdahl M, Hamberger B 2001 In vitro release of aldosterone and cortisol in human adrenal adenomas correlates to mRNA expression of steroidogenic enzymes for genes CYP11B2 and CYP17. *World J Surg* 25:957-966
416. Ogo A, Haji M, Ohashi M, Nawata H 1991 Markedly increased expression of cytochrome P-450 17 alpha-hydroxylase (P-450c17) mRNA in adrenocortical adenomas from patients with Cushing's syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 80:83-89



## Références bibliographiques

417. Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC 2004 Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. *Antioxid Redox Signal* 6:289-300
418. Kil IS, Lee SK, Ryu KW, Woo HA, Hu MC, Bae SH, Rhee SG 2012 Feedback control of adrenal steroidogenesis via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent, reversible inactivation of peroxiredoxin III in mitochondria. *Mol Cell* 46:584-594
419. Stark T, Mankowitz L, Depierre JW 2002 Expression of glutathione transferase isoenzymes in the human H295R adrenal cell line and the effect of forskolin. *J Biochem Mol Toxicol* 16:169-173
420. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, Heikinheimo M 2002 Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology* 143:3136-3143
421. Parviainen H, Kiiveri S, Bielinska M, Rahman N, Huhtaniemi IT, Wilson DB, Heikinheimo M 2007 GATA transcription factors in adrenal development and tumors. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:17-22
422. Jimenez P, Saner K, Mayhew B, Rainey WE 2003 GATA-6 is expressed in the human adrenal and regulates transcription of genes required for adrenal androgen biosynthesis. *Endocrinology* 144:4285-4288
423. Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ 2004 Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord* 4:3
424. Kiiveri S, Siltanen S, Rahman N, Bielinska M, Lehto VP, Huhtaniemi IT, Muglia LJ, Wilson DB, Heikinheimo M 1999 Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans. *Mol Med* 5:490-501
425. Kempna P, Fluck CE 2008 Adrenal gland development and defects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22:77-93
426. Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I, Saruta T 2001 Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab* 74:206-216
427. Shibata H, Kurihara I, Kobayashi S, Yokota K, Suda N, Saito I, Saruta T 2003 Regulation of differential COUP-TF-coregulator interactions in adrenal cortical steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:449-456
428. Kelly SN, Mckenna TJ, Young LS 2004 Modulation of steroidogenic enzymes by orphan nuclear transcriptional regulation may control diverse production of cortisol and androgens in the human adrenal. *J Endocrinol* 181:355-365
429. Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H 2004 Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:4113-4118
430. Almeida MQ, Stratakis CA 2011 How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? *Mol Cell Endocrinol* 336:162-168
431. Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y 2007 Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development,

## Références bibliographiques

- steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18205-18210
432. Assie G, Louiset E, Sturm N, Rene-Corail F, Groussin L, Bertherat J, Thomas M, Lefebvre H, Feige JJ, Clauser E, Chabre O, Cherradi N 2010 Systematic analysis of G protein-coupled receptor gene expression in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia identifies novel targets for pharmacological control of adrenal Cushing's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95:E253-262
433. Dorn GW, 2nd, Oswald KJ, Mccluskey TS, Kuhel DG, Liggett SB 1997 Alpha 2A-adrenergic receptor stimulated calcium release is transduced by Gi-associated G(beta gamma)-mediated activation of phospholipase C. *Biochemistry* 36:6415-6423
434. Yu B, Ragazzon B, Rizk-Rabin M, Bertherat J 2012 Protein kinase a alterations in endocrine tumors. *Horm Metab Res* 44:741-748
435. Lacroix A 2009 ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23:245-259
436. Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC, Aron DC 1993 Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 76:189-191
437. Vezzosi D, Cartier D, Regnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H, Caron P 2007 Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. *Eur J Endocrinol* 156:21-31
438. Lee S, Hwang R, Lee J, Rhee Y, Kim DJ, Chung UI, Lim SK 2005 Ectopic expression of vasopressin V1b and V2 receptors in the adrenal glands of familial ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 63:625-630
439. Miyamura N, Taguchi T, Murata Y, Taketa K, Iwashita S, Matsumoto K, Nishikawa T, Toyonaga T, Sakakida M, Araki E 2002 Inherited adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with abnormal cortisol secretion by vasopressin and catecholamines: detection of the aberrant hormone receptors on adrenal gland. *Endocrine* 19:319-326
440. Nies C, Bartsch DK, Ehlenz K, Wild A, Langer P, Fleischhacker S, Rothmund M 2002 Familial ACTH-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia clinically affecting only female family members. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110:277-283
441. Minami S, Sugihara H, Sato J, Tatsukuchi A, Sugisaki Y, Sasano H, Wakabayashi I 1996 ACTH independent Cushing's syndrome occurring in siblings. *Clin Endocrinol (Oxf)* 44:483-488
442. Majnik J, Patocs A, Balogh K, Toth M, Gergics P, Szappanos A, Mondok A, Borgulya G, Panczel P, Prohaszka Z, Racz K 2006 Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:2796-2799
443. Fatemi SH, King DP, Reutiman TJ, Folsom TD, Laurence JA, Lee S, Fan YT, Paciga SA, Conti M, Menniti FS 2008 PDE4B polymorphisms and decreased PDE4B expression are associated with schizophrenia. *Schizophr Res* 101:36-49
444. Nakayama T, Asai S, Sato N, Soma M 2007 PDE4D gene in the STRK1 region on 5q12: susceptibility gene for ischemic stroke. *Curr Med Chem* 14:3171-3178
445. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP 2006 Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368:1795-1809

## Références bibliographiques

446. Peiro AM, Tang CM, Murray F, Zhang L, Brown LM, Chou D, Rassenti L, Kipps TA, Insel PA 2011 Genetic variation in phosphodiesterase (PDE) 7B in chronic lymphocytic leukemia: overview of genetic variants of cyclic nucleotide PDEs in human disease. *J Hum Genet* 56:676-681
447. Wong ML, Whelan F, Deloukas P, Whittaker P, Delgado M, Cantor RM, Mccann SM, Licinio J 2006 Phosphodiesterase genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant treatment response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:15124-15129
448. Liao YC, Lin HF, Guo YC, Yu ML, Liu CK, Juo SH 2010 Sex-differential genetic effect of phosphodiesterase 4D (PDE4D) on carotid atherosclerosis. *BMC Med Genet* 11:93
449. Dewan AT, Triche EW, Xu X, Hsu LI, Zhao C, Belanger K, Hellenbrand K, Willis-Owen SA, Moffatt M, Cookson WO, Himes BE, Weiss ST, Gauderman WJ, Baurley JW, Gilliland F, Wilk JB, O'connor GT, Strachan DP, Hoh J, Bracken MB 2010 PDE11A associations with asthma: results of a genome-wide association scan. *J Allergy Clin Immunol* 126:871-873 e879
450. Ceyhan O, Birsoy K, Hoffman CS 2012 Identification of biologically active PDE11-selective inhibitors using a yeast-based high-throughput screen. *Chem Biol* 19:155-163
451. Lynch DC, Dymont DA, Huang L, Nikkel SM, Lacombe D, Campeau PM, Lee B, Bacino CA, Michaud JL, Bernier FP, Parboosingh JS, Innes AM 2012 Identification of novel mutations confirms PDE4D as a major gene causing acrodysostosis. *Hum Mutat*
452. Grau T, Artemyev NO, Rosenberg T, Dollfus H, Haugen OH, Cumhuri Sener E, Jurklics B, Andreasson S, Kernstock C, Larsen M, Zrenner E, Wissinger B, Kohl S 2011 Decreased catalytic activity and altered activation properties of PDE6C mutants associated with autosomal recessive achromatopsia. *Hum Mol Genet* 20:719-730
453. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S 2002 Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30:3894-3900
454. Stratakis CA, Kirschner LS 1998 Clinical and genetic analysis of primary bilateral adrenal diseases (micro- and macronodular disease) leading to Cushing syndrome. *Horm Metab Res* 30:456-463
455. Doppman JL, Nieman LK, Travis WD, Miller DL, Cutler GB, Jr., Chrousos GP, Norton JA 1991 CT and MR imaging of massive macronodular adrenocortical disease: a rare cause of autonomous primary adrenal hypercortisolism. *J Comput Assist Tomogr* 15:773-779
456. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, Grossman AB, Reznick RH 2004 CT and MR imaging of the adrenal glands in ACTH-independent Cushing syndrome. *Radiographics* 24:435-452
457. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL 1985 The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)* 64:270-283
458. Nadeau JH 2001 Modifier genes in mice and humans. *Nat Rev Genet* 2:165-174
459. Nadeau JH 2003 Modifier genes and protective alleles in humans and mice. *Curr Opin Genet Dev* 13:290-295
460. Haston CK, Hudson TJ 2005 Finding genetic modifiers of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353:1509-1511

## Références bibliographiques

461. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR 2005 Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 353:1443-1453
462. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, Strauss KA, Shneider BL, Lim WA, Salen G, Morton DH, Bull LN 2003 Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet* 34:91-96
463. Ragazzon B, Libe R, Gaujoux S, Assie G, Fratticci A, Launay P, Clouser E, Bertagna X, Tissier F, De Reynies A, Bertherat J 2010 Transcriptome analysis reveals that p53 and  $\beta$ -catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res* 70:8276-8281
464. De Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ 2005 Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:1819-1829
465. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM 2003 Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 162:521-531
466. Allolio B, Fassnacht M 2006 Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:2027-2037
467. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF, Proye C 2001 Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg* 25:891-897
468. Wang T, Satoh F, Morimoto R, Nakamura Y, Sasano H, Auchus RJ, Edwards MA, Rainey WE 2011 Gene expression profiles in aldosterone-producing adenomas and adjacent adrenal glands. *Eur J Endocrinol* 164:613-619
469. Chiodini I 2011 Clinical review: Diagnosis and treatment of subclinical hypercortisolism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96:1223-1236
470. Adams JC, Watt FM 1993 Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117:1183-1198
471. Wight TN, Potter-Perigo S 2011 The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G950-955
472. Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I 1980 Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:4094-4098
473. Chamoux E, Otis M, Gallo-Payet N 2005 A connection between extracellular matrix and hormonal signals during the development of the human fetal adrenal gland. *Braz J Med Biol Res* 38:1495-1503
474. Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, Reincke M 1998 Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83:2585-2588

## Références bibliographiques

475. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J, Dupre J, Poitras P, Fournier H, Garon J, Garrel D, Bayard F, Taillefer R, Et Al. 1992 Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion--a new cause of Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 327:974-980
476. Groussin L, Perlemoine K, Contesse V, Lefebvre H, Tabarin A, Thieblot P, Schlienger JL, Luton JP, Bertagna X, Bertherat J 2002 The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:1980-1985
477. Laufer E, Kesper D, Vortkamp A, King P 2012 Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol Cell Endocrinol* 351:19-27
478. Ching S, Vilain E 2009 Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis* 47:628-637
479. Huang CC, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH 2010 Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology* 151:1119-1128
480. Hall JG, Pallister PD, Clarren SK, Beckwith JB, Wiglesworth FW, Fraser FC, Cho S, Benke PJ, Reed SD 1980 Congenital hypothalamic hamartoblastoma, hypopituitarism, imperforate anus and postaxial polydactyly--a new syndrome? Part I: clinical, causal, and pathogenetic considerations. *Am J Med Genet* 7:47-74
481. Kang S, Graham JM, Jr., Olney AH, Biesecker LG 1997 GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. *Nat Genet* 15:266-268
482. Wang B, Fallon JF, Beachy PA 2000 Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423-434
483. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G 2009 Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res* 15:668-676
484. Tremblay JJ, Viger RS 2003 Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:291-298
485. Clark BJ, Soo SC, Caron KM, Ikeda Y, Parker KL, Stocco DM 1995 Hormonal and developmental regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. *Mol Endocrinol* 9:1346-1355
486. Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkila P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, Voutilainen R, Heikinheimo M 2005 Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 233:47-56
487. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE 2004 The orphan nuclear receptors NURR1 and NGFIB regulate adrenal aldosterone production. *Mol Endocrinol* 18:279-290
488. Lefrancois-Martinez AM, Blondet-Trichard A, Binart N, Val P, Chambon C, Sahut-Barnola I, Pointud JC, Martinez A 2011 Transcriptional control of adrenal steroidogenesis: novel connection between Janus kinase (JAK) 2 protein and protein kinase A (PKA) through stabilization of cAMP response element-binding protein (CREB) transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 286:32976-32985
489. Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD 2002 Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology* 143:665-673

## Références bibliographiques

490. Park SY, Meeks JJ, Raverot G, Pfaff LE, Weiss J, Hammer GD, Jameson JL 2005 Nuclear receptors Sfl and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132:2415-2423
491. Ikeda Y 1996 SF-1: a key regulator of development and function in the mammalian reproductive system. *Acta Paediatr Jpn* 38:412-419
492. Morohashi K, Mukai T, Kawabe K, Suzuki, Mizusaki H, Ishiharal S, Umesono K, Kawajiri K 2000 Adrenocortical and gonadal differentiation regulated by transcription factors, Ad4BP/SF-1 (NR5A1) and Dax-I (NROB1). *Endocr Res* 26:953
493. Bakke M, Zhao L, Hanley NA, Parker KL 2001 SF-1: a critical mediator of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 171:5-7
494. Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, Jameson JL 2002 Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 87:1829-1833
495. Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490
496. Mallet D, Bretones P, Michel-Calemard L, Dijoud F, David M, Morel Y 2004 Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89:4829-4832
497. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, Et Al. 1994 Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372:672-676
498. Guo W, Burris TP, McCabe ER 1995 Expression of DAX-1, the gene responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, in the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis. *Biochem Mol Med* 56:8-13
499. Lalli E, Bardoni B, Zazopoulos E, Wurtz JM, Strom TM, Moras D, Sassone-Corsi P 1997 A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 11:1950-1960
500. Saez JM, Dazard A, Gallet D 1975 ACTH and prostaglandin receptors in human adrenocortical tumors. Apparent modification of a specific component of the ACTH-binding site. *J Clin Invest* 56:536-547
501. Riou JP, Evain D, Perrin F, Saez JM 1977 Adenosine 3'5'-cyclic monophosphate dependent protein kinase in human adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 44:413-419
502. Bimpaki EI, Nesterova M, Stratakis CA 2009 Abnormalities of cAMP signaling are present in adrenocortical lesions associated with ACTH-independent Cushing syndrome despite the absence of mutations in known genes. *Eur J Endocrinol* 161:153-161
503. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA 2003 Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res* 63:5308-5319
504. Mantovani G, Lania AG, Bondioni S, Peverelli E, Pedroni C, Ferrero S, Pellegrini C, Vicentini L, Arnaldi G, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A 2008 Different expression

## Références bibliographiques

- of protein kinase A (PKA) regulatory subunits in cortisol-secreting adrenocortical tumors: relationship with cell proliferation. *Exp Cell Res* 314:123-130
505. Rothenbuhler A, Horvath A, Libe R, Faucz FR, Fratticci A, Raffin Sanson ML, Vezzosi D, Azevedo M, Levy I, Almeida MQ, Lodish M, Nesterova M, Bertherat J, Stratakis CA 2012 Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (PDE8B), a cAMP-specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in a cohort of patients with adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 77:195-199
506. Mantovani G, Bondioni S, Ferrero S, Gamba B, Ferrante E, Peverelli E, Corbetta S, Locatelli M, Rampini P, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania AG 2005 Effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/protein kinase a pathway on markers of cell proliferation in nonfunctioning pituitary adenomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:6721-6724

# **Annexes**

## **1 Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease.**

Vezzosi D, Bertherat J. European Journal of Endocrinology. 2011, 165(2), 177-188



## REVIEW

## Phosphodiesterases in endocrine physiology and disease

Delphine Vezzosi<sup>1,2,3</sup> and Jérôme Bertherat<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Institut Cochin, 75014 Paris, France, <sup>2</sup>Faculté de Médecine Paris 5, Université Paris Descartes, 75005 Paris, France, <sup>3</sup>Department of Endocrinology, Hôpital Larrey, 31480 Toulouse, France and <sup>4</sup>Department of Endocrinology, Reference Center for Rare Adrenal Diseases, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, APHP, 75014 Paris, France

(Correspondence should be addressed to D Vezzosi; Email: delphine.vezzosi@gmail.com)

### Abstract

The cAMP–protein kinase A pathway plays a central role in the development and physiology of endocrine tissues. cAMP mediates the intracellular effects of numerous peptide hormones. Various cellular and molecular alterations of the cAMP-signaling pathway have been observed in endocrine diseases.

Phosphodiesterases (PDEs) are key regulatory enzymes of intracellular cAMP levels. Indeed, PDEs are the only known mechanism for inactivation of cAMP by catalysis to 5'-AMP. It has been suggested that disruption of PDEs could also have a role in the pathogenesis of many endocrine diseases. This review summarizes the most recent advances concerning the role of the PDEs in the physiopathology of endocrine diseases. The potential significance of this knowledge can be easily envisaged by the development of drugs targeting specific PDEs.

*European Journal of Endocrinology* 165 177–188

### Introduction

The cAMP pathway plays an important role in the development and function of endocrine tissues. It is also altered in various endocrine disorders. Indeed, numerous genetic alterations of the cAMP-signaling pathway have been observed (1). First, abnormalities of the hormone receptor of a given endocrine pathway have been reported, for example, activating mutations of the gene encoding for the TSH receptor (TSHR) in thyroid toxic adenomas (2), for the LH receptor in Leydig cell tumors (3), for the calcium sensing receptor in familial hypocalcaemia (4), and aberrant expression of G-protein-coupled receptors in bilateral macronodular adrenal hyperplasia (5–7). Secondly, somatic activating mutations of the stimulatory subunit  $\alpha$  of the Gs protein have been found in McCune–Albright syndrome or in sporadic pituitary GH adenomas (8, 9). Finally, germ line inactivating mutations of the protein kinase A regulatory subunit type 1 (PRKAR1A) have been demonstrated in primary pigmented nodular adrenocortical diseases (PPNAD) and Carney complex (CNC) (10–12).

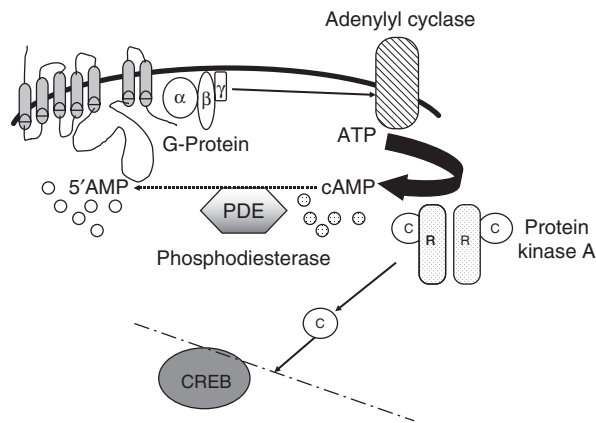
Phosphodiesterases (PDEs) have a key regulatory role in the cAMP pathway, as they are the only known mechanism for inactivating cAMP by its catalysis to 5'-AMP (Fig. 1). During the last several years, various attempts have been made to identify diseases associated with disruption of PDEs. Gene knockout, gene inactivation, and genetic association studies have implicated

PDEs in numerous diseases such as asthma (13), depression (14), schizophrenia (15), and stroke (16). Moreover, in daily clinical practice, PDE inhibitors are able to effectively and safely treat diseases such as erectile dysfunction (17), heart failure (18), severe forms of Raynaud's phenomenon (19), pulmonary arterial hypertension (20), and chronic obstructive pulmonary disease or asthma (21, 22).

In this review, a brief overview of the PDE family will be presented, followed by a description of their role in endocrine physiology. Finally, the known and potential roles of PDEs in endocrine diseases will be discussed.

### The PDE superfamily

Adenylyl and guanylyl cyclases are the effector enzymes accounting for cyclic nucleotide production by converting ATP to cAMP or GTP to cGMP respectively. By contrast, PDEs cause the cyclic nucleotide degradation by hydrolyzing cAMP into 5'-AMP or, depending on the type of PDE, cGMP into 5'-GMP. Thus, PDEs play a critical role in the intracellular cAMP and cGMP homeostasis. Moreover, in combination with A-kinase anchoring proteins (AKAPs), PDEs contribute to compartmentalizing the cyclic nucleotides. It has been shown that cAMP does not have a uniform intracellular distribution but accumulates at specific sites within a cell. AKAPs, PDEs, and protein kinase A (PKA) form



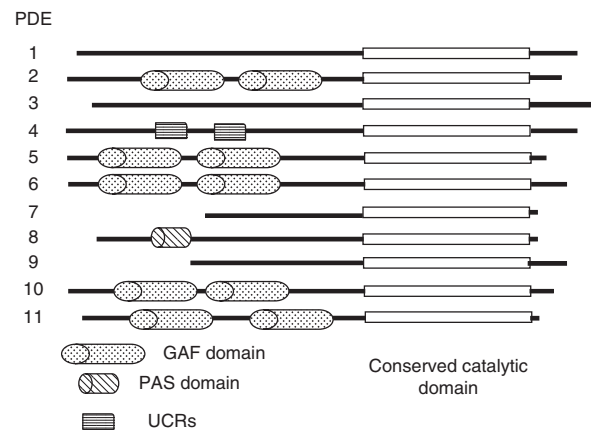
**Figure 1** Phosphodiesterases in the cAMP pathway. The cAMP pathway mediates key cellular processes. When the G-protein-coupled receptor is activated by an extracellular ligand, a conformational change occurs. The  $G_{\alpha}$  subunit is released from the complex and binds to adenylyl cyclase, which then catalyzes the conversion of ATP into cAMP. Elevation in intra-cellular cAMP levels leads to dissociation of the catalytic subunit from the regulatory subunit of the protein kinase A. The activated protein kinase A can then phosphorylate a series of targets that regulate downstream effector enzymes, ion channels, and activates the transcription of specific genes mediating cell growth and differentiation. Phosphodiesterases are key regulators of the cAMP pathway, as they are able to hydrolyze the cAMP to inactive 5'-AMP leading to inactivation cAMP pathway. Abbreviations used: CREB, cAMP response element-binding protein; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; 5'-AMP, 5'-adenosine monophosphate.

complexes that act to create these simultaneous, multiple cAMP gradients. A cell without these complexes and PDEs would be swamped with cAMP after activation of adenylyl cyclase. Thus, PDEs have a major role in ensuring the proper intensity and spatio-temporal distribution of cyclic nucleotides (14, 23).

Human PDEs comprise a complex superfamily of enzymes derived from 21 genes separated into 11 PDE gene families (*PDE 1-11*; Fig. 2). Transcription from different initiation sites in these genes and differential splicing of their mRNAs results in the generation of about 100 isoforms of PDE proteins found in all cells and in almost all subcellular compartments. These isoforms can have different substrate selectivity (cAMP versus cGMP), kinetics, allosteric regulation, tissue distribution, and susceptibility to pharmacological inhibition. Although PDEs are structurally, biochemically, and pharmacologically different, they share some common structural features. They contain a conserved catalytic domain with ~300 amino acids located near the C-terminal regions and a variable regulatory domain located in the N-terminal regions. In mammals, three of the 11 PDE families selectively hydrolyze cAMP (*PDEs 4, 7, and 8*), three families are selective for cGMP (*PDEs 5, 6, and 9*), and five families present a dual specificity for both cyclic nucleotides but with variable efficiency (*PDEs 1, 2, 3, 10, and 11*).

Nowadays, it has been demonstrated that six PDE families could have a role in endocrine physiology and endocrine diseases: *PDE1*, *PDE2* (*PDE2A*), *PDE3* (*PDE3A*), *PDE4* (*PDE4B* and *PDE4D*), *PDE8* (*PDE8A* and *PDE8B*), and *PDE11* (*PDE11A*). The major properties and localization of PDEs are summarized in Table 1. However, it is important to underline that understanding PDE functions can be difficult due to the lack of selective pharmacological inhibitors and to the fact that the catalytic properties of many PDEs overlap, so that assignation of a specific role to a particular PDE family or to variants within a family is typically challenging.

Moreover, expression pattern of PDEs isoforms frequently varies with the developmental, proliferative status and with the hormonal stimuli of the cell. In addition, these PDE isoforms are subjected to different regulations or are targeted to different subcellular compartments that account at least in part for creation of microdomains that spatially restrict cyclic nucleotides diffusion. This phenomenon could take part in a tissue specificity of the consequences of PDE mutations.



**Figure 2** Schematic representation of the human phosphodiesterases. Adapted from (76, 77). Phosphodiesterases are isoenzymes encoded by at least 21 different genes and organized into 11 families. Transcription from different initiation sites in these genes and differential splicing of their mRNAs results in the generation of about 100 isoforms of PDE proteins. GAF domains are one of the largest families of small molecule binding units. They regulate the catalytic activity of phosphodiesterases by allosteric binding of cyclic nucleotides. The GAF acronym arises from the names of the first three different classes of proteins identified to contain them: cGMP-specific and cGMP-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase, adenylyl cyclase, and the bacterial transcription factor FhIA. PAS domains, named for Per, ARNT, and Sim, are a ubiquitous class of transduction domains. There is a considerable overlap between the function of GAF and PAS domains. Of the 11 PDE families, *PDEs 2, 5, 6, 10, and 11* contain GAF domains in their N-terminal regulatory regions and one, *PDE8*, contains a PAS domain. The *PDE4* family contains a unique structural feature, two domains in the N-terminal region called upstream conserved region 1 and 2 (UCR1 and UCR2). These domains have been shown to form a module necessary for the activation of *PDE4* upon phosphorylation by protein kinase A.

**Table 1** Major properties and localization of the phosphodiesterases.

PDE family	Isoforms	Substrate preference	Major localization	Major known functions	References
<i>PDE1</i>	<i>PDE1A</i> <i>PDE1B</i> <i>PDE1C</i>	cAMP < cGMP for <i>PDE1A</i> and <i>PDE1B</i> cAMP = cGMP for <i>PDE1C</i>	Testis, thyroid, pituitary, kidney, liver, pancreas, brain, heart, aorta, bladder, thymus, vascular smooth muscle cells, and vascular endothelial cells	Regulate vascular smooth muscle contraction Play a role in sperm function Contribute to neuronal functions	(26, 78–80)
<i>PDE2</i>	<i>PDE2A</i>	cAMP = cGMP	Brain, heart, liver, lung, kidney, platelets, adrenal cortex and glomerulosa, pituitary, endothelial cells	Regulate aldosterone secretion Regulate ACTH secretion Mediate the cAMP signal in cardiac myocytes Play a role in long-term memory and in barrier function of endothelial cells under inflammatory conditions	(26, 29, 36, 81–83)
<i>PDE3</i>	<i>PDE3A</i> <i>PDE3B</i>	cAMP > cGMP	Platelets, smooth muscle cells, cardiac myocytes, oocytes, kid- ney, hepatocytes, brain, devel- oping spermatocytes, thymus, colon	Regulate cardiac contractility, pla- telet aggregation, vascular smooth muscle contraction, oocyte maturation and regulation of renin release Have an important impact on lipo- lysis, glycogenolysis, insulin secretion, and cardiac function	(84–89)
<i>PDE4</i>	<i>PDE4B</i> <i>PDE4D</i>	cAMP	Brain (frontal cortex and hypo- thalamus), skeletal muscle, spleen, liver, white and brown adipose tissue, pancreatic $\beta$ -cells, cardiac myocytes, smooth muscles, inflammatory cells, ovary, pituitary	Play a role in brain function, monocyte and macrophage activation, neutrophil infiltration, vascular smooth muscle proliferation, fertility Regulate $\beta$ -adrenergic signaling and excitation–contrac- tion coupling in the heart and thus play a role in vasodilatation and cardiac contractility	(26, 37, 84, 90–92)
<i>PDE5</i>	<i>PDE5A</i>	cGMP >> cAMP	Corpus cavernosum, aorta, pla- centa, colon, bladder, platelets	Modulate NO/cGMP effects in vascular smooth muscles, pla- telets, and lower urinary tract organs Regulate cardiac stress responses	(26, 93–96)
<i>PDE6</i>	<i>PDE6A</i> <i>PDE6B</i> <i>PDE6C</i>	cGMP >> cAMP	Photoreceptors cells, pancreas, liver, prostate, fallopian tubes, aorta, ovary, and skeletal muscle	Primary effector enzyme in the phototransduction cascade. Regulate cGMP concentration in rod and cone photoreceptors	(26, 97)
<i>PDE7</i>	<i>PDE7A</i> <i>PDE7B</i>	cAMP	Heart, skeletal muscle, spleen, thyroid, placenta, ovary, bladder, thymus, T cell, brain	Play a critical role in the regulation of the human T cells function	(26, 98)
<i>PDE8</i>	<i>PDE8A</i> <i>PDE8B</i>	cAMP	Brain, thyroid, testis, adrenal cortex, colon, liver, thymus, placenta, vena cava, aorta, fallopian tube	Play a role in T cell activation Regulate adrenal steroidogenesis Regulate TSH levels Control of LH signaling and steroidogenesis in Leydig cells	(26, 28, 34, 79)
<i>PDE9</i>	<i>PDE9A</i>	cGMP >> cAMP	Colon, prostate, kidney, brain, small intestine, lung, thymus, spleen, lymph nodes, T cells	Not well known. Candidate gene in regulation of energy balance	(26, 99–101)
<i>PDE10</i>	<i>PDE10A</i>	cAMP > cGMP	Stomach, skeletal muscle, small intestine, testis, kidney, heart, and brain	Play a role in striatal activation and behavioral activity	(26, 102)
<i>PDE11</i>	<i>PDE11A</i>	cAMP = cGMP	Prostate, heart, liver, skeletal muscle, salivary gland, thyroid, adrenal cortex, testis, pituitary, thymus	Play a role in sperm production	(24, 26, 35, 44, 103, 104)

PDE, Phosphodiesterases

## PDEs in endocrine physiology

### Adrenals

*PDE2A*, *PDE8A*, *PDE8B*, and *PDE11A* are the major PDEs that are expressed in the adrenal cortex (24–26). Recently, it has been demonstrated that *PDE2A*, *PDE8B*, and *PDE11A* have a role in the adrenal physiology.

**PDE2A** *PDE2A* is the predominant PDE in the adrenal cortex and may be implicated in adrenal physiology (25, 27, 28). To date, the regulation of intracellular cAMP accumulation after ACTH stimulation is not fully elucidated. *PDE2A* may be implicated in the regulation of the ACTH-induced increase in intracellular cAMP. In rat and human cell models, three sequential phases of the effect of ACTH leading to cAMP stimulation have

been described. First, a rapid and sustained activation of adenylyl cyclase was shown followed with a biphasic effect of ACTH on *PDE2* activity with an initial and rapid inhibition of *PDE2* activity followed with a delayed activation of *PDE2A* (29). Thus, *PDE2A* seems to be strongly involved in the regulation of cAMP levels as its activity controls the production of cAMP induced by ACTH.

***PDE8B*** Recently, it was demonstrated that *PDE8B* is a major regulator of adrenal steroidogenesis by both acute and chronic mechanisms (28). Indeed, *PDE8B* knockout mouse have elevated levels of corticosterone due to adrenal hypersensitivity to ACTH. In cell culture models, pharmacological inhibition of *PDE8* has the same effects. This suggests that in normal adrenal cortex, *PDE8B* acts as a negative regulator of adrenal steroidogenesis.

***PDE11A4*** The role of *PDE11A4* in adrenal physiology has been poorly investigated. Mice deficient in *PDE11A4* have been generated but no effects on the adrenal have been reported (30). Even if selective *PDE11* inhibitors have not yet been discovered, inhibitors that can partially inhibit *PDE11* have been used in murine models and in humans. Tadalafil, a *PDE5* inhibitor that can partially inhibit *PDE11*, is widely used without reports of adrenal dysfunction. Tadalafil was used to study glucocorticoid secretion after a maximal exercise-related stress in healthy humans (31). Conversely, it was shown that tadalafil administration is able, compared to placebo, to amplify mean salivary cortisol. The sites of action and the mechanisms involved in the observed effect of tadalafil on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis response to physical stress are not known. However, these results suggest that *PDE5* and/or *PDE11A4* could have a role in the regulation of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis.

### Thyroid

*PDE1A*, *PDE7A*, and *PDE8B* are the PDEs most highly expressed in the thyroid (25, 26).

TSH regulates thyroid function through stimulation of the cAMP pathway. Its serum level is a sensitive indicator of thyroid function even within the normal range. It has been suggested that up to 65% of baseline TSH levels are genetically determined and could vary within the limit of the normal range in healthy people (32, 33).

Recently, a genome-wide association study was performed to identify genes associated with TSH levels in normal subjects (34). The strongest association was shown at the *PDE8B* locus. Indeed, an association between a single nucleotide polymorphism rs4704397 in the *PDE8B* gene and circulating TSH levels was observed. This suggests that *PDE8B* is one of the major genetic determinants of TSH levels. Each additional

copy of the minor *PDE8B* A allele was associated with a TSH increase of 0.13 mUI/l (thyroxine ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ) levels were not assessed in this study). This finding in the Sardinian population was confirmed by a meta-analysis that included multiple populations (34). The proposed mechanism by which *PDE8B* may influence TSH levels is through control of cAMP signaling. *PDE8B* acts in the thyroid to catalyze the hydrolysis and inactivation of cAMP after TSH signaling. Thus, *PDE8B* polymorphisms may reduce cAMP in the thyroid, leading to a decreased thyroid stimulatory response to TSH and hence lower subsequent thyroid hormone production. This is likely to result via feedback in a higher TSH levels required to maintain  $T_4$  and  $T_3$  in the normal range. However, the consequence of this *PDE8B* polymorphism has not yet been shown *in vitro*.

Thus, it is possible that *PDE8B* genetic variants might be involved in regulation of TSH levels.

### Pituitary

*PDE1*, *PDE2*, *PDE4*, and *PDE11A* are the PDEs most highly expressed in the pituitary (35–40).

The physiological role of these PDEs in human pituitary has not been extensively investigated. Nonetheless, few studies conducted in rodents' adenohypophysis demonstrated that PDEs have a role in the release of prolactin and ACTH.

First, it was shown that the addition of 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), a common inhibitor of PDE subtypes, increased cyclic nucleotides in primary culture of rats anterior pituitary cells (41). Moreover, application of IBMX caused a dose-dependent increase in basal prolactin release. In addition, *PDE4* inhibitors are known to activate the hypothalamic–pituitary–adrenocortical system at the pituitary level, implicating *PDE4* in the control of corticotroph cell function (42, 43). Recently, it was demonstrated that *PDE1* and *PDE4* are key cAMP metabolizing enzymes in rat corticotrophs cells (38). In the normal human pituitary gland and similarly to that reported in rodent pituitary, *PDE* activity was almost completely inhibited by IBMX treatment with major and similar contributions of the *PDE1* and the *PDE4* (37).

### Gonads

**Testis** PDEs *1A*, *1C*, *3B*, *5A*, *8A*, *10A*, *11A* are those most highly expressed in the testis (26, 44, 45).

The role of two of these PDEs has been investigated and demonstrated in the testis: *PDE11A* in spermatozoa physiology and *PDE8A* in the regulation of hormone production.

*PDE11A*. *PDE11A* plays a role in spermatozoa physiology. However, data are conflicting. *PDE11A*-deficient

mice present with alterations of spermatogenesis and sperm function. A significant reduction in sperm progression rate, sperm concentration, and percentage of alive ejaculated sperm compared with wild-type mice were shown in *Pde11a*<sup>-/-</sup> mice (30). However, despite these alterations, the fertility of *PDE11*-null mice and the viability, histological features, and anatomical abnormalities of offspring were comparable to that of wild-type mice.

Another way to demonstrate the role of *PDE11A* in spermatozoa physiology is to use *PDE11A* inhibitors. Tadalafil, a *PDE5* inhibitor, has been tested, as it is the most effective available *PDE11A* inhibitor. There are conflicting reports about the inhibition of *PDE11A* using this medication. In a clinical trial, daily intake of tadalafil at doses of 10 and 20 mg for 6 months produced no change in spermatogenesis or reproductive hormones in men (46). Another study demonstrated that tadalafil causes a statistically significant decrease in sperm motility (47). In mice, it was shown that chronic overexposure to tadalafil causes testicular tissue alterations with decreased testis weight, degeneration, and atrophy of the seminiferous epithelium and decrease in sperm production.

As tadalafil inhibits *PDE11* activity with a 40-fold weaker potency than for *PDE5* activity, these effects should be carefully assessed before concluding that they are simply attributable to *PDE11A* inhibition in the testis (48).

These findings could be consistent with the involvement of the cAMP signaling pathway, and particularly *PDE11A*, in testis functions. However, studies with a potent and selective *PDE11A* inhibitor and more extensive clinical studies should be pursued to investigate the effects of *PDE11A* inhibition in testicular and sperm function.

***PDE8A*.** Leydig cells are interstitial cells located adjacent to the seminiferous tubules in the testis and produce testosterone under the control of LH. cAMP is the major intracellular messenger for LH action on steroidogenesis, as stimulation of testosterone production by LH in Leydig cells is known to be mediated by an increase in the levels of cAMP (49).

*PDE8A* plays a key role in the control of LH signaling and steroidogenesis in Leydig cells. Using *PDE8A*-deficient mice, it was shown that LH-induced testosterone basal release was increased compared with controls (50). Leydig cells from deficient mice are sensitized to the effects of LH on testosterone synthesis. Thus, pharmacological manipulation of *PDE8A* could be used to modulate testosterone synthesis and represents a potential pharmacological target for modulation of testosterone synthesis.

**Ovary** The PDEs, *PDE3A* and *PDE4D* are highly expressed in human ovary (26, 51, 52).

***PDE3A*.** *PDE3* is the predominant functional PDE family expressed in human oocytes (52). In addition, it has

been demonstrated that inhibition of *PDE3A* blocks oocyte maturation *in vitro* and *in vivo* (53). Similarly, *PDE3A*-deficient mice are viable and ovulate a normal number of oocytes but are completely infertile as their oocytes contain higher levels of cAMP and fail to undergo spontaneous maturation (54).

***PDE4D*.** *PDE4D* also plays a critical role in the ovarian follicle. It was shown in follicle culture that *PDE4* inhibitors cause oocyte maturation in the absence of gonadotropin stimulation (55). In addition, s.c. injection of *PDE4* inhibitors alone or in combination with low doses of human chorionic gonadotropin could induce ovulation in rats (56). Moreover, mice deficient in *Pde4d* exhibit impaired ovulation with reduced female fertility (57). This decrease in fertility is caused by impaired follicular function and development. Although inactivation of *Pde4d* does not cause a complete arrest of follicular development, the reduced viability of the oocytes in *Pde4d*<sup>-/-</sup> mice resulted in a consequent reduced number of ovulated oocytes. Furthermore, a diminished sensitivity of the granulosa cells to gonadotropins at the level of receptor-G-protein coupling might also take part in the decreased fertility of these mice. Gonadotropin responses at the level of cAMP accumulation in granulosa cells, estrogen production, and ovulation rate were decreased, suggesting that granulosa cell differentiation is disrupted after the inactivation of *Pde4d*.

## PDEs and endocrine diseases

Table 2 summarizes the major implications of PDEs in endocrine diseases.

### Adrenals

Primary PPNAD is a bilateral form of micronodular adrenal hyperplasia causing ACTH-independent Cushing syndrome. Most patients with PPNAD suffer from CNC. This is an autosomal dominant multiple neoplasia syndrome responsible for skin pigmented lesions, cardiac myxomas, and other endocrine and non-endocrine tumors. The CNC gene 1 encodes the *PRKAR1A* (58). However, over the last several years, it has become apparent that PPNAD, when isolated without other clinical signs of CNC, was less frequently explained by *PRKAR1A* mutations. Germ-line mutations in two PDEs, *PDE11A* and *PDE8B*, have been identified in such patients. Figure 3 summarizes the implications of these PDEs in adrenal Cushing syndrome.

***PDE11A*** A genome-wide scan associated with the study of allelic losses in the adrenal tumors of PPNAD patients using DNA chips have identified a region in 2q31–2q35 that encompasses the *PDE11A* gene (24). Further sequencing of the *PDE11A* gene in 16 patients

**Table 2** Major implications of the phosphodiesterases in endocrine disease.

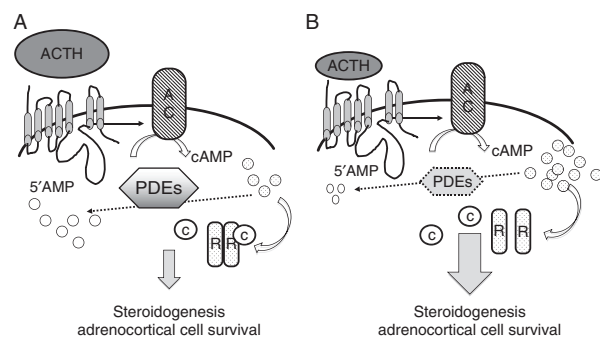
PDE family	Organs	Implication	References
<i>PDE2A</i>	Pituitary	Could have a role in the pathogenesis of GH-secreting adenomas because of protein interaction between AIP and <i>PDE2A</i>	(72)
<i>PDE4</i>	Thyroid	Could have a role in the autonomous thyroid adenomas bearing a TSHR or Gs $\alpha$ mutation	(65)
	Pituitary	Could have a role in the pathogenesis of GH-secreting adenomas because of protein interaction between AIP and <i>PDE4A5</i>	(37, 67, 69–71)
<i>PDE8B</i>	Adrenals	Predisposition gene to PPAD (inactivating point mutations)	(62, 63)
	Thyroid	Association of the <i>PDE8B</i> rs4704397 snp and circulating TSH levels. This association may be responsible for the increased TSH in patients with no evidence of thyroid autoimmunity and for subclinical hypothyroidism during pregnancy	(34, 64)
<i>PDE11A</i>	Pituitary	Altered expression in GH-secreting adenomas	(37)
	Adrenals	Predisposition gene to PPAD (inactivating point mutations, leading mainly to premature stop codon). Missense variants of <i>PDE11A</i> were found with increased frequency among patients with macronodular adrenocortical hyperplasia, adrenocortical adenomas, and adrenal cancer compared with control patients. <i>PDE11A</i> is a modifier of the phenotype in patients with CNC due to <i>PRKAR1A</i> mutations	(24, 59–61)
	Testis	Association between non-synonymous substitutions of <i>PDE11A</i> and familial testicular germ cell tumors	(74)

PDE, Phosphodiesterases

with PPAD but with no *PRKAR1A* mutation has uncovered five germ-line sequence variations, two producing a frameshift mutation disrupting the *PDE11A4* adrenal-specific isoform protein, two missense substitutions, and one substitution that led to a premature stop codon. A decreased expression of *PDE11A4* within the adrenal tumors of these patients was observed, together with increased cAMP and cGMP levels (24, 59). Subsequently, missense variants of *PDE11A* that are rare in the general population were found with increased frequency among patients with macronodular adrenocortical hyperplasia, adrenocortical adenomas, and adrenal cancer (60). This association of *PDE11A4* variants and adrenocortical tumors suggests a role in the susceptibility to develop these tumors. Moreover, consistent with the hypothesis that *PDE11A* may play a role as a tumor suppressor gene, it has been reported that adrenal tumors expressing *PDE11A* variants present a loss of the wild-type allele, thus resulting in a significant reduction of enzyme levels in the affected tissue.

In addition, in patients with CNC and *PRKAR1A* inactivating mutations, an association of these *PDE11A* variants with the development of PPAD and testicular tumors has been demonstrated. This suggests that *PDE11A* could be a modifier gene of the phenotype in patients with CNC due to *PRKAR1A* mutation (61). *In vitro* studies have shown that the simultaneous inactivation of *PRKAR1A* and *PDE11A* by siRNA leads to a stimulation of the PKA-dependent transcription (61). These observations are compatible with the hypothesis of a synergistic effect of *PRKAR1A* mutations and *PDE11A4* variants in the tissues expressing *PDE11A4* and in which tumorigenesis is sensitive to the dysregulation of the cAMP/PKA pathway.

***PDE8B*** During the genome-wide search for genes conferring a predisposition to PPAD, a second chromosomal locus located at 5q13 was identified (62, 63). This locus contains the gene encoding *PDE8B*. The *PDE8B* coding region was then sequenced in 22 patients with isolated micronodular adrenal disease and Cushing syndrome and a single base substitution



**Figure 3** Phosphodiesterases in adrenal Cushing syndrome. (A) The left part of the figure shows the control of the cAMP pathway in the normal adrenal cortex. The pituitary hormone ACTH (adrenocorticotropin) stimulates its specific seven-transmembrane receptor, leading to activation of adenylyl cyclase (AC) and cAMP synthesis. cAMP activate the protein kinase A made of two regulatory subunits (R) and two catalytic subunits (C). Activation of the phosphodiesterases (PDEs) stimulates degradation of cAMP to 5'-AMP leading to cAMP levels decrease. ACTH stimulates steroid synthesis and secretion and is required for adrenocortical cells survival. (B) The right part of the figure illustrates the dysregulation caused by *PDE8B* or *PDE11A* inactivating mutations. The reduced PDE activity leads to increased cAMP levels and PKA stimulation. This potentiates or mimics the effects of ACTH and takes part in the steroid oversecretion and/or adrenal nodular hyperplasia observed in animal models and/or human diseases. In adrenal Cushing syndrome, the negative feedback of cortisol on the hypothalamic and pituitary adrenal axis lead to reduced ACTH circulating levels.

(c.914A → C, p.His305Pro) was found in one patient. This substitution was not found in any of the 1030 unrelated control subjects studied (62).

*In vitro* studies performed in HEK 293 cells significantly showed higher cAMP levels after transfection with the mutant *PDE8B*, indicating an impaired ability of the protein to degrade cAMP (62, 63).

### Thyroid

***PDE8B*** As previously described, *PDE8B* genetic variants may be involved in regulation of TSH levels and could be responsible for the increased serum TSH occasionally observed in individuals with no evidence of thyroid autoimmunity or loss of function mutations in the thyroid hormone or TSHR genes (34).

*PDE8B* could also have a role in the regulation of thyroid function during pregnancy (64). Serum TSH, Free T<sub>4</sub>, and Free T<sub>3</sub> were measured in 970 pregnant women at 28 weeks of gestation. The single nucleotide polymorphism rs4704397 genotype was available in 877 subjects. It was shown that TSH varied with genotype and was highest in patients with the AA genotype. These results suggested that a single nucleotide polymorphism in *PDE8B* leads to serum TSH concentration in the upper limit of the reference range and could even be associated with subclinical hypothyroidism during pregnancy.

***PDE4*** In autonomous thyroid adenomas, cAMP signaling can be constitutively activated by mutations affecting two elements, the TSHR and the Gs $\alpha$  protein. Although somatic mutations in the TSHR gene are a frequent finding in autonomous thyroid adenomas, somatic mutations of the Gs $\alpha$  gene are rare. It was also shown that some PDEs could have a role in the pathogenesis of these adenomas. A study demonstrated a *PDE4* induction in the autonomous thyroid adenomas bearing a *TSHR* or Gs $\alpha$  mutation (65). In these tumors, a two to threefold increase in total PDE activity was observed. The authors demonstrated that this increase was due to the increase of *PDE4* activity, with a tenfold higher activity than measured in the surrounding normal tissue. These results indicate that the constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas is associated with the upregulation of *PDE4*. This suggests that in these adenomas, the induction of specific PDE expression constitutes a mechanism opposing the chronic cAMP increase.

### Pituitary

It is well established that somatotroph cells represent a cell type in which the activation of the cAMP-dependant pathway leads to cell proliferation and differentiation. As a consequence, alterations of the cAMP pathway appear to be molecular hallmarks of most GH-secreting

adenomas (9, 66). As PDEs catalyze cAMP, some authors hypothesize the role of these enzymes in the pathogenesis of GH-secreting adenoma.

***PDE4*** It was initially shown that PDE activity was dramatically increased in human GH-secreting adenomas with activating Gs $\alpha$  mutations compared with wild-type Gs $\alpha$  adenomas and normal pituitary (37, 67). This high PDE activity was caused largely by *PDE4*. Indeed, a selective *PDE4* inhibitor, rolipram, is nearly as effective as IBMX, a non-selective PDE inhibitor, in stimulating cAMP accumulation in intact cells and blocking the enzyme activity in membrane preparations.

The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) is a co-chaperon protein involved in the functional maturation of aryl hydrocarbon receptor. It has previously been shown that germ-line mutations in the gene encoding AIP cause pituitary adenomas predisposition (68). Close interactions were demonstrated between AIP and *PDE4A5* (69). Indeed, AIP mutations disrupt protein interaction between AIP and *PDE4A5* (70, 71). Another PDE, *PDE2A*, is also a known partner of AIP (72).

***PDE8B*** The induction of PDE isoforms by gsp mutations was not limited to *PDE4*, but also involved *PDE8B*. Indeed, it was shown that expression of *PDE8B* was absent in the normal pituitary but was detectable in almost all GH-secreting adenomas and higher in adenomas with activating mutations of the Gs $\alpha$  gene (37).

***PDE11A*** Recently, one study screened 78 acromegalic patients and 110 controls for the presence of variants of the *PDE11A* gene (73). The frequency of *PDE11A* missense variants in acromegalic patients was found to be only slightly increased compared with controls. In addition, the presence of the wild-type allele resulting in the normal expression of the enzyme in the majority of tumor tissues together with the lack of significant clinical phenotype suggests that these variants might only marginally contribute to the development of GH-secreting adenomas.

### Gonads

**Testis *PDE11A***. The *PDE11A* gene coding region was sequenced in 95 patients with testicular germ cell tumors from 64 unrelated multiple-case kindreds (74). Non-synonymous substitutions of *PDE11A* have been detected with a frequency significantly higher in patients with familial and bilateral testicular germ cell tumors compared with controls. Moreover, functional studies showed that these mutations reduce PDE activity and increase cAMP levels. Thus, *PDE11A*-inactivating sequence variants may contribute to inherited testicular germ line tumor susceptibility.

**Ovary** As it was shown that *PDE8A* is a key regulator of LH signaling and testosterone production in Leydig cells, one study evaluated the human *PDE8A* gene as a polycystic ovary syndrome (PCOS) candidate gene (75). This was based on the hypothesis that reduced *PDE8* activity or expression would contribute to excessive ovarian androgen production. However, these authors showed that the more common of these *PDE8A* variants were not associated with PCOS, excluding a significant role of *PDE8A* as PCOS candidate gene.

## Conclusion

Significant progress has been made toward the elucidation of the role of PDE in endocrine physiology. This is not surprising, considering the important role of the cAMP signaling pathway in endocrine glands. However, as is often seen in the progress of cell biology, the mechanisms that inactivate a cellular function are studied later than the activating mechanisms. Over the last decade, several observations have shown a dysregulation of PDEs in endocrine diseases. As the development of specific drugs to target PDEs have been successful in non-endocrine diseases, and the development of new drugs is conceivable, this could lead to new therapeutic approaches in endocrine disorders. However, despite the recent progress summarized in this review, it is clear that the field needs to be investigated more deeply. There is no doubt that future studies of PDEs will reveal new aspects of the endocrine physiology and pathophysiology helping to progress toward new treatments.

## Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## Funding

Our work is supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (ANR08-GENOPAT-002; and ANR-10-Blan-1136). D Vezzosi is the recipient of a fellowship from the Institut National du Cancer (INCa).

## References

- Rosenberg D, Groussin L, Bertagna X & Bertherat J. cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors. *Endocrine Research* 2002 **28** 765–775. (doi:10.1081/ERC-120017071)
- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont J & Vassart G. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* 1993 **365** 649–651. (doi:10.1038/365649a0)
- Liu G, Duranteau L, Carel JC, Monroe J, Doyle DA & Shenker A. Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. *New England Journal of Medicine* 1999 **341** 1731–1736. (doi:10.1056/NEJM199912023412304)
- Mancilla EE, De Luca F & Baron J. Activating mutations of the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Molecular Genetics and Metabolism* 1998 **64** 198–204. (doi:10.1006/mgme.1998.2716)
- Lacroix A, N'Diaye N, Tremblay J & Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews* 2001 **22** 75–110. (doi:10.1210/er.22.1.75)
- Vezzosi D, Cartier D, Regnier C, Otal P, Bennet A, Parmentier F, Plantavid M, Lacroix A, Lefebvre H & Caron P. Familial adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia with aberrant serotonin and vasopressin adrenal receptors. *European Journal of Endocrinology* 2007 **156** 21–31. (doi:10.1530/eje.1.02324)
- Groussin L, Perlemoine K, Contesse V, Lefebvre J, Tabarin A, Thieblot P, Schlienger JL, Luton JP, Bertagna X & Bertherat J. The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** 1980–1985. (doi:10.1210/jc.87.5.1980)
- Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E & Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune–Albright syndrome. *New England Journal of Medicine* 1991 **325** 1688–1695. (doi:10.1056/NEJM199112123252403)
- Vallar L, Spada A & Giannattasio G. Altered Gs and adenylate cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature* 1987 **330** 566–568. (doi:10.1038/330566a0)
- Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA & Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKARIA gene in patients with the Carney complex. *Human Molecular Genetics* 2000 **9** 3037–3046. (doi:10.1093/hmg/9.20.3037)
- Veugelers M, Wilkes D, Burton K, McDermott DA, Song Y, Goldstein MM, La Perle K, Vaughan CJ, O'Hagan A, Bennett KR, Meyer BJ, Legius E, Karttunen M, Norio R, Kaariainen H, Lavigne M, Neau JP, Richter G, Kirali K, Farnsworth A, Stapleton K, Morelli P, Takanashi Y, Bamforth JS, Eitelberger F, Noszian I, Manfroi W, Powers J, Mochizuki Y, Imai T, Ko GT, Driscoll DA, Goldmuntz E, Edelberg JM, Collins A, Eccles D, Irvine AD, McKnight GS & Basson CT. Comparative PRKARIA genotype–phenotype analyses in humans with Carney complex and *prkar1a* haploinsufficient mice. *PNAS* 2004 **101** 14222–14227. (doi:10.1073/pnas.0405535101)
- Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, Zacharieva S, Pignatelli D, Carney JA, Luton JP, Bertagna X, Stratakis CA & Bertherat J. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKARIA) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *American Journal of Human Genetics* 2002 **71** 1433–1442. (doi:10.1086/344579)
- Hansen G, Jin S, Umetsu DT & Conti M. Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *PNAS* 2000 **97** 6751–6756. (doi:10.1073/pnas.97.12.6751)
- Zhang HT, Huang Y, Jin SL, Frith SA, Suvarna N, Conti M & O'Donnell JM. Antidepressant-like profile and reduced sensitivity to rolipram in mice deficient in the PDE4D phosphodiesterase enzyme. *Neuropsychopharmacology* 2002 **27** 587–595. (doi:10.1016/S0893-133X(02)00344-5)
- Millar JK, Pickard BS, Mackie S, James R, Christie S, Buchanan SR, Malloy MP, Chubb JE, Huston E, Baillie GS, Thomson PA, Hill EV, Brandon NJ, Rain JC, Camargo LM, Whiting PJ, Houslay MD, Blackwood DH, Muir WJ & Porteous DJ.



- DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. *Science* 2005 **310** 1187–1191. (doi:10.1126/science.1112915)
- 16 Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Reynisdottir ST, Manolescu A, Jonsdottir S, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Bjarnadottir SM, Einarsson OB, Gudjonsdottir HM, Hawkins M, Gudmundsson G, Gudmundsdottir H, Andrason H, Gudmundsdottir AS, Sigurdardottir M, Chou TT, Nahmias J, Goss S, Sveinbjornsdottir S, Valdimarsson EM, Jakobsson F, Agnarsson U, Gudnason V, Thorgeirsson G, Fingerle J, Gurney M, Gudbjartsson D, Frigge ML, Kong A, Stefansson K & Gulcher JR. The gene encoding phosphodiesterase 4D confers risk of ischemic stroke. *Nature Genetics* 2003 **35** 131–138. (doi:10.1038/ng1245)
  - 17 McVary KT. Clinical practice. Erectile dysfunction. *New England Journal of Medicine* 2007 **357** 2472–2481. (doi:10.1056/NEJMcp067261)
  - 18 Kumar P, Francis GS & Tang WH. Phosphodiesterase 5 inhibition in heart failure: mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews. Cardiology* 2009 **6** 349–355. (doi:10.1038/nrcardio.2009.32)
  - 19 De LaVega AJ & Derk CT. Phosphodiesterase-5 inhibitors for the treatment of Raynaud's: a novel indication. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2009 **18** 23–29. (doi:10.1517/13543780802525100)
  - 20 Archer SL & Michelakis ED. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine* 2009 **361** 1864–1871. (doi:10.1056/NEJMct0904473)
  - 21 Lipworth BJ. Phosphodiesterase-4 inhibitors for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2005 **365** 167–175. (doi:10.1016/S0140-6736(05)17708-3)
  - 22 Hertz AL, Bender AT, Smith KC, Gilchrist M, Amieux PS, Aderem A & Beavo JA. Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages. *PNAS* 2009 **106** 21978–21983. (doi:10.1073/pnas.0911684106)
  - 23 Zaccolo M. Phosphodiesterases and compartmentalized cAMP signalling in the heart. *European Journal of Cell Biology* 2006 **85** 693–697. (doi:10.1016/j.ejcb.2006.01.002)
  - 24 Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, Stein E, Levine E, Delimpasi G, Hsiao HP, Keil M, Heyerdahl S, Matyakhina L, Libe R, Fratticci A, Kirschner LS, Cramer K, Gaillard RC, Bertagna X, Carney JA, Bertherat J, Bossis I & Stratakis CA. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nature Genetics* 2006 **38** 794–800. (doi:10.1038/ng1809)
  - 25 Lakics V, Karran EH & Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 2010 **59** 367–374. (doi:10.1016/j.neuropharm.2010.05.004)
  - 26 Bingham J, Sudarshanam S & Srinivasan S. Profiling human phosphodiesterase genes and splice isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006 **350** 25–32. (doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.180)
  - 27 Sonnenburg WK, Mullaney PJ & Beavo JA. Molecular cloning of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase cDNA. Identification and distribution of isozyme variants. *Journal of Biological Chemistry* 1991 **266** 17655–17661.
  - 28 Tsai LC, Shimizu-Albergine M & Beavo JA. The high affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B (PDE8B) controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland. *Molecular Pharmacology* 2011 **79** 639–648. (doi:10.1124/mol.110.069104)
  - 29 Cote M, Payet MD, Rousseau E, Guillon G & Gallo-Payet N. Comparative involvement of cyclic nucleotide phosphodiesterases and adenylyl cyclase on adrenocorticotropin-induced increase of cyclic adenosine monophosphate in rat and human glomerulosa cells. *Endocrinology* 1999 **140** 3594–3601. (doi:10.1210/en.140.8.3594)
  - 30 Wayman C, Phillips S, Lunny C, Webb T, Fawcett L, Baxendale R & Burgess G. Phosphodiesterase 11 (PDE11) regulation of spermatozoa physiology. *International Journal of Impotence Research* 2005 **17** 216–223. (doi:10.1038/sj.ijir.3901307)
  - 31 Di Luigi L, Baldari C, Sgro P, Emerenziani GP, Gallotta MC, Bianchini S, Romanelli F, Pigozzi F, Lenzi A & Guidetti L. The type 5 phosphodiesterase inhibitor tadalafil influences salivary cortisol, testosterone, and dehydroepiandrosterone sulphate responses to maximal exercise in healthy men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 3510–3514. (doi:10.1210/jc.2008-0847)
  - 32 Hansen PS, Brix TH, Sorensen TI, Kyvik KO & Hegedus L. Major genetic influence on the regulation of the pituitary–thyroid axis: a study of healthy Danish twins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2004 **89** 1181–1187. (doi:10.1210/jc.2003-031641)
  - 33 Panicker V, Wilson SG, Spector TD, Brown SJ, Falchi M, Richards JB, Surdulescu GL, Lim EM, Fletcher SJ & Walsh JP. Heritability of serum TSH, free T<sub>4</sub> and free T<sub>3</sub> concentrations: a study of a large UK twin cohort. *Clinical Endocrinology* 2008 **68** 652–659. (doi:10.1111/j.1365-2265.2007.03079.x)
  - 34 Arnaud-Lopez L, Usala G, Ceresini G, Mitchell BD, Pilia MG, Piras MG, Sestu N, Maschio A, Busonero F, Albai G, Dei M, Lai S, Mulas A, Crisponi L, Tanaka T, Bandinelli S, Guralnik JM, Loi A, Balaci L, Sole G, Prinzis A, Mariotti S, Shuldiner AR, Cao A, Schlessinger D, Uda M, Abecasis GR, Nagaraja R, Sanna S & Naitza S. Phosphodiesterase 8B gene variants are associated with serum TSH levels and thyroid function. *American Journal of Human Genetics* 2008 **82** 1270–1280. (doi:10.1016/j.ajhg.2008.04.019)
  - 35 Loughney K, Taylor J & Florio VA. 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase 11A: localization in human tissues. *International Journal of Impotence Research* 2005 **17** 320–325. (doi:10.1038/sj.ijir.3901317)
  - 36 Stephenson DT, Coskran TM, Wilhelms MB, Adamowicz WO, O'Donnell MM, Muravnick KB, Menniti FS, Kleiman RJ & Morton D. Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 2A in multiple mammalian species. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2009 **57** 933–949. (doi:10.1369/jhc.2009.953471)
  - 37 Persani L, Borgato S, Lania A, Filopanti M, Mantovani G, Conti M & Spada A. Relevant cAMP-specific phosphodiesterase isoforms in human pituitary: effect of Gs(alpha) mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 **86** 3795–3800. (doi:10.1210/jc.86.8.3795)
  - 38 Ang KL & Antoni FA. Functional plasticity of cyclic AMP hydrolysis in rat adenylyl cyclase corticotroph cells. *Cell Signalling* 2002 **14** 445–452. (doi:10.1016/S0898-6568(01)00267-4)
  - 39 Azhar S & Menon KM. Cyclic nucleotide phosphodiesterases from rat anterior pituitary. Characterization of multiple forms and regulation by protein activator and Ca<sup>+</sup>. *European Journal of Biochemistry* 1977 **73** 73–82. (doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11292.x)
  - 40 Nagasaka A, Ohkubo S & Hidaka H. 3':5'-cyclic-nucleotide phosphodiesterase in the bovine pituitary gland. *Biochimica et Biophysica Acta* 1983 **755** 481–487.
  - 41 Gonzalez-Iglesias AE, Jiang Y, Tomic M, Kretschmannova K, Andric SA, Zemkova H & Stojilkovic SS. Dependence of electrical activity and calcium influx-controlled prolactin release on adenylyl cyclase signaling pathway in pituitary lactotrophs. *Molecular Endocrinology* 2006 **20** 2231–2246. (doi:10.1210/me.2005-0363)
  - 42 Kumari M, Cover PO, Poyser RH & Buckingham JC. Stimulation of the hypothalamo-pituitary–adrenal axis in the rat by three selective type-4 phosphodiesterase inhibitors: *in vitro* and *in vivo* studies. *British Journal of Pharmacology* 1997 **121** 459–468. (doi:10.1038/sj.bjp.0701158)
  - 43 Hadley AJ, Kumari M, Cover PO, Osborne J, Poyser R, Flack JD & Buckingham JC. Stimulation of the hypothalamo-pituitary–

- adrenal axis in the rat by the type 4 phosphodiesterase (PDE-4) inhibitor, denbufylline. *British Journal of Pharmacology* 1996 **119** 463–470.
- 44 D'Andrea MR, Qiu Y, Haynes-Johnson D, Bhattacharjee S, Kraft P & Lundeen S. Expression of PDE11A in normal and malignant human tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005 **53** 895–903. (doi:10.1369/jhc.5A6625.2005)
  - 45 Wang P, Wu P, Egan RW & Billah MM. Human phosphodiesterase 8A splice variants: cloning, gene organization, and tissue distribution. *Gene* 2001 **280** 183–194. (doi:10.1016/S0378-1119(01)00783-1)
  - 46 Hellstrom WJ, Overstreet JW, Yu A, Saikali K, Shen W, Beasley CM Jr & Watkins VS. Tadalafil has no detrimental effect on human spermatogenesis or reproductive hormones. *Journal of Urology* 2003 **170** 887–891. (doi:10.1097/O1.ju.0000081053.97792.da)
  - 47 Pomara G, Morelli G, Canale D, Turchi P, Caglieresi C, Moschini C, Liguori G, Selli C, Macchia E, Martino E & Francesca F. Alterations in sperm motility after acute oral administration of sildenafil or tadalafil in young, infertile men. *Fertility and Sterility* 2007 **88** 860–865. (doi:10.1016/j.fertnstert.2006.12.019)
  - 48 Bischoff E. Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. *International Journal of Impotence Research* 2004 **16** (Suppl 1) S11–S14. (doi:10.1038/sj.ijir.3901208)
  - 49 Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 1994 **15** 574–626. (doi:10.1210/edrv-15-5-574)
  - 50 Vasta V, Shimizu-Albergine M & Beavo JA. Modulation of Leydig cell function by cyclic nucleotide phosphodiesterase 8A. *PNAS* 2006 **103** 19925–19930. (doi:10.1073/pnas.0609483103)
  - 51 Sasseville M, Albuz FK, Cote N, Guillemette C, Gilchrist RB & Richard FJ. Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biology of Reproduction* 2009 **81** 415–425. (doi:10.1095/biolreprod.108.074450)
  - 52 Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, Cortvrindt R, Bourgain C, Devroey P & Smits J. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor *in vitro*. *Biology of Reproduction* 2003 **69** 1042–1052. (doi:10.1095/biolreprod.103.015982)
  - 53 Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Jin C & Tsafiri A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002 **187** 153–159. (doi:10.1016/S0303-7207(01)00686-4)
  - 54 Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M & Manganiello V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *Journal of Clinical Investigation* 2004 **114** 196–205. (doi:10.1172/JCI21804)
  - 55 Tsafiri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ & Conti M. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Developmental Biology* 1996 **178** 393–402. (doi:10.1006/dbio.1996.0226)
  - 56 McKenna SD, Pietropaolo M, Tos EG, Clark A, Fischer D, Kagan D, Bao B, Chedrese PJ & Palmer S. Pharmacological inhibition of phosphodiesterase 4 triggers ovulation in follicle-stimulating hormone-primed rats. *Endocrinology* 2005 **146** 208–214. (doi:10.1210/en.2004-0562)
  - 57 Jin SL, Richard FJ, Kuo WP, D'Ercole AJ & Conti C. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *PNAS* 1999 **96** 11998–12003. (doi:10.1073/pnas.96.21.11998)
  - 58 Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS & Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics* 2000 **26** 89–92. (doi:10.1038/79238)
  - 59 Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, Stein E, Kamvissi V, Soni P, Bossis I, de Herder W, Carney JA, Bertherat J, Gregersen PK, Remmers EF & Stratakis CA. Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Research* 2006 **66** 11571–11575. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2914)
  - 60 Libe R, Fratticci A, Coste J, Tissier F, Horvath A, Ragazzon B, Rene-Corail F, Groussin L, Bertagna X, Raffin-Sanson ML, Stratakis CA & Bertherat J. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clinical Cancer Research* 2008 **14** 4016–4024. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0106)
  - 61 Libe R, Horvath A, Vezzosi D, Fratticci A, Coste J, Perlemoine K, Ragazzon B, Guillaud-Bataille M, Groussin L, Clauser E, Raffin-Sanson ML, Siegel J, Moran J, Drori-Herishanu L, Faucz FR, Lodish M, Nesterova M, Bertagna X, Bertherat J & Stratakis CA. Frequent phosphodiesterase 11A gene (PDE11A) defects in patients with Carney complex (CNC) caused by PRKAR1A mutations: PDE11A may contribute to adrenal and testicular tumors in CNC as a modifier of the phenotype. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011 **96** E208–E214. (doi:10.1210/jc.2010-1704)
  - 62 Horvath A, Giatzakis C, Tsang K, Greene E, Osorio P, Boikos S, Libe R, Patronas Y, Robinson-White A, Remmers E, Bertherat J, Nesterova M & Stratakis CA. A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *European Journal of Human Genetics* 2008 **16** 1245–1253. (doi:10.1038/ejhg.2008.85)
  - 63 Horvath A, Mericq V & Stratakis CA. Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *New England Journal of Medicine* 2008 **358** 750–752. (doi:10.1056/NEJMc0706182)
  - 64 Shields BM, Freathy RM, Knight BA, Hill A, Weedon MN, Frayling TM, Hattersley AT & Vaidya B. Phosphodiesterase 8B gene polymorphism is associated with subclinical hypothyroidism in pregnancy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 **94** 4608–4612. (doi:10.1210/jc.2009-1298)
  - 65 Persani L, Lania A, Alberti L, Romoli R, Mantovani G, Filetti S, Spada A & Conti M. Induction of specific phosphodiesterase isoforms by constitutive activation of the cAMP pathway in autonomous thyroid adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2000 **85** 2872–2878. (doi:10.1210/jc.85.8.2872)
  - 66 Lania AG, Mantovani G, Ferrero S, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Braidotti P, Locatelli M, Zavanone ML, Ferrante E, Bosari S, Beck-Peccoz P & Spada A. Proliferation of transformed somatotroph cells related to low or absent expression of protein kinase a regulatory subunit 1A protein. *Cancer Research* 2004 **64** 9193–9198. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1847)
  - 67 Lania A, Persani L, Ballare E, Mantovani S, Losa M & Spada A. Constitutively active Gs alpha is associated with an increased phosphodiesterase activity in human growth hormone-secreting adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998 **83** 1624–1628. (doi:10.1210/jc.83.5.1624)
  - 68 Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A & Aaltonen LA. Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science* 2006 **312** 1228–1230. (doi:10.1126/science.1126100)
  - 69 Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB & Korbonits M. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 2390–2401. (doi:10.1210/jc.2007-2611)

- 70 Bolger GB, Peden AH, Steele MR, MacKenzie C, McEwan DG, Wallace DA, Huston E, Baillie GS & Houslay MD. Attenuation of the activity of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4A5 by interaction with the immunophilin XAP2. *Journal of Biological Chemistry* 2003 **278** 33351–33363. (doi:10.1074/jbc.M303269200)
- 71 Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellin G, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB & Korbonits M. Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Human Mutation* 2010 **31** 950–960. (doi:10.1002/humu.21292)
- 72 de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Muller-Esterl W, Guimaraes JA & Smolenski AP. Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2007 **282** 13656–13663. (doi:10.1074/jbc.M610942200)
- 73 Peverelli E, Ermetici E, Filopanti M, Elli FM, Ronchi CL, Mantovani G, Ferrero S, Bosari S, Beck-Peccoz P, Lania A & Spada A. Analysis of genetic variants of phosphodiesterase 11A in acromegalic patients. *European Journal of Endocrinology* 2009 **161** 687–694. (doi:10.1530/EJE-09-0677)
- 74 Horvath A, Korde L, Greene MH, Libe R, Osorio P, Faucz FR, Raffin-Sanson ML, Tsang KM, Drori-Herishanu L, Patronas Y, Remmers EF, Nikita ME, Moran J, Greene J, Nesterova M, Merino M, Bertherat J & Stratakis CA. Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Research* 2009 **69** 5301–5306. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0884)
- 75 Chen C, Wickenheisser J, Ewens KG, Ankener W, Legro RS, Dunaif A, McAllister JM, Spielman RS & Strauss J III. PDE8A genetic variation, polycystic ovary syndrome and androgen levels in women. *Molecular Human Reproduction* 2009 **15** 459–469. (doi:10.1093/molehr/gap035)
- 76 Omori K & Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circulation Research* 2007 **100** 309–327. (doi:10.1161/01.RES.0000256354.95791.f1)
- 77 Conti M & Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual Review of Biochemistry* 2007 **76** 481–511. (doi:10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444)
- 78 Michibata H, Yanaka N, Kanoh Y, Okumura K & Omori K. Human Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphodiesterase PDE1A: novel splice variants, their specific expression, genomic organization, and chromosomal localization. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001 **1517** 278–287. (doi:10.1016/S0167-4781(00)00293-1)
- 79 Bender AT & Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews* 2006 **58** 488–520. (doi:10.1124/pr.58.3.5)
- 80 Jeon KI, Jono H, Miller CL, Cai Y, Lim S, Liu X, Gao P, Abe J, Li JD & Yan C. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated PDE1 regulates the beta-catenin/TCF signaling through PP2A B56 gamma subunit in proliferating vascular smooth muscle cells. *FEBS Journal* 2010 **277** 5026–5039. (doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07908.x)
- 81 Sadhu K, Hensley K, Florio VA & Wolda SL. Differential expression of the cyclic GMP-stimulated phosphodiesterase PDE2A in human venous and capillary endothelial cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1999 **47** 895–906. (doi:10.1177/002215549904700707)
- 82 Dongillo M, Tocchetti CG, Terrin A, Lissandron V, Cheung YF, Postmann WR, Pozzan T, Kass DA, Paolucci N, Houslay MD & Zaccolo M. Compartmentalized phosphodiesterase-2 activity blunts beta-adrenergic cardiac inotropy via an NO/cGMP-dependent pathway. *Circulation Research* 2006 **98** 226–234. (doi:10.1161/01.RES.0000200178.34179.93)
- 83 MacFarland RT, Zelus BD & Beavo JA. High concentrations of a cGMP-stimulated phosphodiesterase mediate ANP-induced decreases in cAMP and steroidogenesis in adrenal glomerulosa cells. *Journal of Biological Chemistry* 1991 **266** 136–142.
- 84 Pyne NJ & Furman BL. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in pancreatic islets. *Diabetologia* 2003 **46** 1179–1189. (doi:10.1007/s00125-003-1176-7)
- 85 Degerman E & Manganiello VC. Phosphodiesterase 3B: an important regulator of energy homeostasis. In *Cyclic Phosphodiesterases in Health and Disease*, pp 79–99. Eds JA Beavo, MD Houslay & SH Frances, Broca Raton, FL, USA: CRC Press, 2007.
- 86 Waddleton D, Wu W, Feng Y, Thompson C, Wu M, Zhou YP, Howard A, Thornberry N, Li J & Mancini JA. Phosphodiesterase 3 and 4 comprise the major cAMP metabolizing enzymes responsible for insulin secretion in INS-1 (832/13) cells and rat islets. *Biochemical Pharmacology* 2008 **76** 884–893. (doi:10.1016/j.bcp.2008.07.025)
- 87 Shakur Y, Holst LS, Landstrom TR, Movsesian M, Degerman E & Manganiello V. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2001 **66** 241–277. (doi:10.1016/S0079-6603(00)66031-2)
- 88 Reinhardt RR, Chin E, Zhou J, Taira M, Murata T, Manganiello VC & Bondy CA. Distinctive anatomical patterns of gene expression for cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Journal of Clinical Investigation* 1995 **95** 1528–1538. (doi:10.1172/JCI117825)
- 89 Degerman E, Belfrage P & Manganiello VC. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *Journal of Biological Chemistry* 1997 **272** 6823–6826. (doi:10.1074/jbc.272.11.6823)
- 90 Zhang R, Maratos-Flier E & Flier JS. Reduced adiposity and high-fat diet-induced adipose inflammation in mice deficient for phosphodiesterase 4B. *Endocrinology* 2009 **150** 3076–3082. (doi:10.1210/en.2009-0108)
- 91 Bolger G, Michaeli T, Martins T, St John T, Steiner B, Rodgers L, Riggs M, Wigler M & Ferguson K. A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Molecular and Cellular Biology* 1993 **13** 6558–6571.
- 92 Houslay MD & Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochemical Journal* 2003 **370** 1–18. (doi:10.1042/BJ20021698)
- 93 Wang P, Wu P, Myers JG, Stamford A, Egan RW & Billah MM. Characterization of human, dog and rabbit corpus cavernosum type 5 phosphodiesterases. *Life Sciences* 2001 **68** 1977–1987. (doi:10.1016/S0024-3205(01)00989-4)
- 94 Qiu Y, Kraft P, Lombardi E & Clancy J. Rabbit corpus cavernosum smooth muscle shows a different phosphodiesterase profile than human corpus cavernosum. *Journal of Urology* 2000 **164** 882–886. (doi:10.1016/S0022-5347(05)67331-4)
- 95 Ito M, Nishikawa M, Fujioka M, Miyahara M, Isaka N, Shiku H & Nakano T. Characterization of the isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in human platelets and the effects of E4021. *Cellular Signalling* 1996 **8** 575–581. (doi:10.1016/S0898-6568(96)00112-X)
- 96 Kass DA, Champion HC & Beavo JA. Phosphodiesterase type 5: expanding roles in cardiovascular regulation. *Circulation Research* 2007 **101** 1084–1095. (doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.162511)
- 97 Ionita MA & Pittler SJ. Focus on molecules: rod cGMP phosphodiesterase type 6. *Experimental Eye Research* 2007 **84** 1–2. (doi:10.1016/j.exer.2005.12.012)
- 98 Giembycz MA & Smith SJ. Phosphodiesterase 7A: a new therapeutic target for alleviating chronic inflammation? *Current Pharmaceutical Design* 2006 **12** 3207–3220. (doi:10.2174/138161206778194123)

- 99 Rentero C, Monfort A & Puigdomenech P. Identification and distribution of different mRNA variants produced by differential splicing in the human phosphodiesterase 9A gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003 **301** 686–692. (doi:10.1016/S0006-291X(03)00021-4)
- 100 Wang P, Wu P, Egan RW & Billah MM. Identification and characterization of a new human type 9 cGMP-specific phosphodiesterase splice variant (PDE9A5). Differential tissue distribution and subcellular localization of PDE9A variants. *Gene* 2003 **314** 15–27. (doi:10.1016/S0378-1119(03)00733-9)
- 101 Kumar KG, DiCarlo LM, Volaufova J, Zuberi AR & Richards BK. Increased physical activity cosegregates with higher intake of carbohydrate and total calories in a subcongenic mouse strain. *Mammalian Genome* 2010 **21** 52–63. (doi:10.1007/s00335-009-9243-0)
- 102 Kleiman RJ, Kimmel LH, Bove SE, Lanz TA, Harms JE, Romegialli A, Miller KS, Willis A, des Etages S, Kuhn M & Schmidt CJ. Chronic suppression of phosphodiesterase 10A alters striatal expression of genes responsible for neurotransmitter synthesis, neurotransmission, and signaling pathways implicated in Huntington's disease. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2011 **336** 64–76. (doi:10.1124/jpet.110.173294)
- 103 Yuasa K, Kotera J, Fujishige K, Michibata H, Sasaki T & Omori K. Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *Journal of Biological Chemistry* 2000 **275** 31469–31479. (doi:10.1074/jbc.M003041200)
- 104 Fawcett L, Baxendale R, Stacey P, McGrouther C, Harrow I, Soderling S, Hetman J, Beavo JA & Phillips SC. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *PNAS* 2000 **97** 3702–3707. (doi:10.1073/pnas.050585197)

---

Received 20 April 2011

Accepted 16 May 2011

## **2 Pathogenesis of benign adrenocortical tumors.**

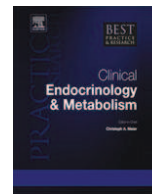
Vezzosi D, Bertherat J, Groussin L. Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism. 2010, 24(6):893-905



Contents lists available at ScienceDirect

## Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/beem](http://www.elsevier.com/locate/beem)



5

### Pathogenesis of benign adrenocortical tumors

Delphine Vezzosi, MD, Assistant Professor, Jérôme Bertherat, MD, PhD, Professor\*, Lionel Groussin, MD, PhD, Professor

*Endocrinology, Metabolism & Cancer Department, INSERM U 1016, CNRS UMR8104, Institut Cochin, Hôpital Cochin, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, INCa-COMETE Centre for Adrenal Cancer, Université Paris-Descartes, Paris, France*

**Keywords:**

Adrenocortical tumors  
β-catenin  
cAMP  
Cushing syndrome  
Primary pigmented nodular adrenocortical disease  
Carney complex

Most adrenocortical tumors (ACT) are benign unilateral adrenocortical adenomas, often discovered incidentally. Exceptionally, ACT are bilateral. However bilateral ACT have been very helpful to progress in the pathophysiology of ACT. Although most ACT are of sporadic origin, they may also be part of syndromic and/or hereditary disorders. The identification of the genetics of familial diseases associated with benign ACT has been helpful to define somatic alterations in sporadic ACT: for example, identification of *PRKAR1A* mutations in Carney complex or alterations of the Wnt/β-catenin pathway in Familial Adenomatous Polyposis Coli. Components of the cAMP signaling pathway—for example, adrenocorticotropic-hormone receptors and other membrane receptors, Gs protein, phosphodiesterases and protein kinase A—can be altered to various degrees in benign cortisol-secreting ACT.

These progress have been important for the understanding of the pathogenesis of benign ACT, but already have profound implications for clinical management, for example in unraveling the genetic origin of disease in some patients with ACT. They also have therapeutic consequences, and should help to develop new therapeutic options.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. Jérôme Bertherat, Service des Maladies Endocriniennes et Métaboliques, Hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014, Paris, France, Tel.: +33 1 58 41 18 95; fax: +33 1 46 33 80 60.

*E-mail address:* [jerome.bertherat@cch.aphp.fr](mailto:jerome.bertherat@cch.aphp.fr) (L. Bertherat).

## Introduction

Adrenal masses are most often discovered as adrenal incidentalomas that are present in 1–7% of the general population and are, by definition, discovered incidentally during general investigations.<sup>1</sup> Most turn out to be benign adrenocortical adenomas (ACA), that can cause hypersecretion (hypercortisolism in Cushing's syndrome, mineralocorticoid excess in Conn's adenoma) or be non-functional. Bilateral ACT (adrenocortical tumors) are less frequent but have been very useful to progress in the understanding of the pathogenesis of ACT.<sup>2</sup> They are observed in two rare situations, either of which can induce steroid oversecretion: primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) and adrenocorticotrophic-hormone (ACTH)-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH).<sup>3,4</sup>

Progress in this field has been slower than that for most other tumors, mainly because of the limited number of ACT treated surgically. However, considerable advances toward understanding the pathogenesis of ACT development have been made the last 15 years. This progress is the result of a combination of various strategies: identification of responsible genes in some rare familial diseases; investigation of signaling pathways that have proved important in other endocrine (or non-endocrine) tumors; and also close clinical observation. Initially, the study of rare genetic syndromes associated with ACT has greatly facilitated progress and has increased our understanding of the genetics of sporadic benign and malignant ACT.<sup>5</sup>

Here we discuss these advances in the genetics and the signaling alterations observed in benign unilateral and bilateral ACT. We will first describe genetic alterations observed initially as germline defects in genetic syndromes predisposing to benign ACT and found out later to be also altered at the somatic level, therefore limited to the tumor tissue, in sporadic ACT. Some of these genetic alterations occur on key component of signaling pathways, and we will then describe the signaling alterations observed in benign ACT, focusing mainly on the cAMP and the Wnt signaling pathways.

## The genetics of benign adrenocortical tumors

The study of familial syndromes associated with ACT has led to the identification of genes involved in the development of these tumors (Table 1). In turn, these genes occasionally show somatic defects in sporadic ACT, the clinical and biological phenotypes of which may mimic those observed in their "familial counterparts". This notion may be of great practical help for the development of molecular tools for the diagnosis and management of ACT. At present most of the genetic alterations known in ACT have been discovered by this approach.

### *Carney complex, PRKAR1A, and the 17q22-24 locus*

Carney complex ([CNC]; MIM 160980) is a dominantly inherited disorder with a variety of clinical and pathological manifestations.<sup>6–8</sup> The main characteristics of CNC are spotty skin-pigmentation (lentiginosis), endocrine overactivity and cardiac myxomas. ACTH-independent Cushing syndrome due to PPNAD is the main endocrine manifestation of CNC. PPNAD can be also isolated in some patients without other CNC manifestations or familial history.

CNC seems a genetically heterogeneous disease and linkage analysis has shown that at least two loci are involved: 2p16 and 17q22-24. The gene located on 17q22-24 has been identified as that encoding the protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (*PRKAR1A*).<sup>9,10</sup> *PRKAR1A* is a key component of the cAMP signaling pathway, which has been implicated in endocrine tumorigenesis (see below). Heterozygous inactivating mutations of *PRKAR1A* are found in about two third of families with CNC.<sup>11</sup> In CNC tumors allelic losses (LOH) at 17q22-24 have been demonstrated, suggesting that *PRKAR1A* is normally a tumor suppressor gene. Interestingly, patients with isolated PPNAD and apparently no or little evidence for a family history of CNC can also present a germline mutation of *PRKAR1A*.<sup>12,13</sup> Interestingly a hot spot *PRKAR1A* mutations seems to predispose to isolated PPNAD.<sup>14</sup>

In sporadic ACT, somatic *PRKAR1A* mutations have been found in a subset of hormone-secreting ACA; these ACA present with clinical, biological, and pathological features similar to those in PPNAD.<sup>15</sup> LOH at 17q22-24 has also been observed in sporadic ACT.

**Table 1**  
Genes associated with benign adrenocortical tumors.

Genes, chromosomal localization and type of defect	Associated genetic disease and MIM reference number	Tumors and nontumoral manifestations associated with germline defect	Somatic genetic defect observed in apparently sporadic benign adrenocortical tumors
<i>Menin</i> (11q13)	Multiple endocrine neoplasia type 1 MIM 131100	Parathyroid, pituitary, pancreas tumors, adrenal cortex (25–40%), among which are ACA and hyperplasia, rare ACC	Very rare somatic <i>menin</i> gene mutations in sporadic adrenocortical tumors
<i>PRKAR1A</i> (17q22–24)	Carney complex MIM 160980	Lentiginosis, PPNAD (60%), cardiac myxomas, testicular tumors (LCCSCT), thyroid tumors, ovarian cysts, growth-hormone- or prolactin-secreting tumors	Secreting ACA: somatic <i>PRKAR1A</i> mutation Sporadic ACA: 17q22–24 LOH
<i>Phosphodiesterase 11A</i> (2q31–35)	Bilateral micronodular adrenal hyperplasia MIM 604961	PPNAD, ACA, AIMAH, testicular germ cell tumors	2q31–25 LOH
<i>Phosphodiesterase 8B</i> (5q13)	Bilateral micronodular adrenal hyperplasia MIM 603390	PPNAD	
<i>APC</i> (5q12–22)	Familial adenomatous polyposis coli MIM 175100	Multiple adenomatous polyps and cancer of the colon and rectum. Possible extracolonic manifestations include periampullary cancer, thyroid tumors, hepatoblastoma, multiples or bilateral ACA. Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium also occurs	Transcriptome analysis shows Wnt signaling activation in AIMAH and PPNAD $\beta$ -catenin somatic mutations in ACA
<i>Gas</i> ( <i>GNAS1</i> )(20q13)	McCune–Albright syndrome MIM 174800	Polyostotic fibrous dysplasia, café-au-lait spots, precocious puberty, acromegaly, toxic goiter, AIMAH (5%)	Rare <i>GNAS1</i> somatic mutations in sporadic ACA <i>GNAS1</i> somatic mutations in AIMAH without features of McCune–Albright syndrome

This table describes genetic diseases associated with adrenocortical tumors and the other associated tumoral and nontumoral manifestations. The first three columns show the genetics of various familial syndromes. In the third column, manifestations are listed in order of prevalence, with adrenal disorders highlighted in bold. The last column describes somatic alterations of the same genes or loci observed in apparently sporadic adrenocortical tumors. ACA, adrenocortical adenoma; ACC: Adrenocortical Cancer, AIMAH, adrenocorticotrophic-hormone-independent macronodular adrenal hyperplasia; APC, adenomatous polyposis coli; *GNAS1*, the [alpha] subunit of the Gs protein; LCCSCT, large-cell calcifying Sertoli cell tumors; LOH, loss of heterozygosity; *PRKAR1A*, protein kinase A R1A subunit; PPNAD, primary pigmented nodular adrenocortical disease.

#### *Phosphodiesterases and Cushing syndrome due to bilateral micronodular adrenocortical hyperplasia*

Isolated micronodular adrenocortical hyperplasia can be observed in patients without others manifestations of Carney Complex.<sup>16</sup> The micronodules can be pigmented (PPNAD) or not. As explained above, in case of isolated PPNAD a germline mutation of *PRKAR1A* can be found. However some patients with pigmented and most patients with non-pigmented micronodular adrenocortical hyperplasia and ACTH-independent Cushing's syndrome do not have a germline *PRKAR1A* mutations. In these rare situations, a genome-wide search using SNP DNA chips have identified loci of potential tumor suppressor genes. A region in 2q31–2q35 that encompasses the *PDE11A* gene in patients with PPNAD was identified.<sup>17</sup> Further sequencing of the *PDE11A* gene in 17 patients with isolated primary nodular adrenocortical hyperplasia responsible for ACTH-independent Cushing syndrome has uncovered five germline sequence variations, two producing a frameshift mutation disrupting the PDE11A4 adrenal-specific isoform protein, two missense substitutions and one substitution that led to a premature stop of translation associated with the disease. The inactivation of this dual phosphodiesterase, acting both on cAMP and cGMP, leads to increased cAMP levels in the adrenal cortex.

More recently, an increased frequency of missense mutations of *PDE11A* was observed among patients with macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH), ACA and adrenal cancer (ACC) raising



the possibility that *PDE11A* gene variants might predispose to a broader range of ACT that goes beyond micronodular adrenocortical hyperplasia.<sup>18</sup> Moreover consistent with the hypothesis that *PDE11A* may play a role as a suppressor gene, it has been reported that ACT from patients with a germline *PDE11A4* variant present with LOH of the wild-type *PDE11A4* allele, thus resulting in a significant reduction of the enzyme levels in the affected tissue. Interestingly, an increased frequency of genetic variants of this phosphodiesterase seems also to predispose testicular tumors.<sup>19</sup>

During the genome-wide search for genes conferring a predisposition to PPAD, a second chromosomal locus potentially linked with predisposition to PPAD was identified.<sup>20</sup> This genetic locus contains the gene encoding PDE8B. The *PDE8B* coding region was then sequenced in 20 patients with PPAD or micronodular adrenocortical hyperplasia and a single base substitution was found in one patient. This substitution was not found in any of the 1030 unrelated control subjects studied. In vitro studies performed in HEK 293 cells showed significantly higher cAMP levels after transfection with the mutant *PDE8B* indicating an impaired ability of the protein to degrade cAMP.<sup>20</sup>

#### *Multiple endocrine neoplasia type 1, MEN1, and the 11q13 locus*

The *menin* gene, located at the 11q13 locus, is thought to be a tumour suppressor gene. A heterozygous inactivating germline mutation of *menin* is found in about 90% of families affected by multiple endocrine neoplasia type 1 ([MEN 1], MIM 131100). This is an autosomal dominant syndrome with high penetrance and an equal sex distribution. The principal clinical features include parathyroid (95%), endocrine pancreas (45%) and pituitary (45%) tumours, thymic carcinoids and thyroid adenomas. Adrenocortical tumours and/or hyperplasia are observed in 25–40% of MEN 1 patients.<sup>21,22</sup> In most cases, they are non-functional ACA that can be managed conservatively with radiological/hormonal follow-up. Hyperplasia is typically found in MEN 1 patients presenting ACTH hypersecretion (Cushing's disease), whereas malignant ACT have rarely been reported in MEN 1 patients. Somatic mutation of the *menin* gene is very rare: one mutation was identified in a series of 41 ACA in one study<sup>23</sup> and one mutation in a series of adrenocortical cancer (ACC) was found in another.<sup>22</sup> By contrast, allelic losses at 11q13 was identified in more than 90% of informative ACC in three different series whereas it has been reported in less than 20% of informative ACA.<sup>21–23</sup> However, LOH in ACT involves almost all of the 11q domain, suggesting that an as yet unidentified tumour suppressor gene located on the long arm of the chromosome is involved in ACT formation.

#### *GNAS1 gene*

The trimeric G-protein ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit) is responsible for transmembrane signal transduction following ligand activation of a G-protein-coupled seven-transmembrane domain receptor (ACTH-R). Somatic activating mutations of the *GNAS1* gene (mutant Gs protein, termed *gsp*) responsible for excess activity of the cyclic AMP (cAMP) signalling pathway have been reported in McCune–Albright syndrome ([MAS], MIM 174800).<sup>24</sup> This disease is characterised by polyostotic fibrous dysplasia, café-au-lait spots, precocious puberty and hyperfunction of multiple endocrine glands (thyroid, adrenal cortex, pituitary). Hypercortisolism occurs in 5% of patients and is due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH). In MAS, the *gsp* mutation occurs during embryonic development, as demonstrated by its mosaic pattern of distribution in various tissues. Few somatic *GNAS1* mutations have been found in adrenocortical tumours: one mutation in one sporadic aldosterone-secreting tumour and in one cortisol-secreting tumour has been reported.<sup>25,26</sup>

Two different *gsp* mutations have been reported in three patients with Cushing's syndrome due to AIMAH without MAS features.<sup>27</sup> The authors speculated as to whether these patients presented a disease in the spectrum of MAS, with a late somatic mutation leading to a single defect, or whether they were the first reported cases of isolated AIMAH with a *gsp* mutation localized only in the adrenal gland.

#### *The ACTH-receptor (ACTH-R) gene*

ACTH-R belongs to a subgroup of five receptors of the G-protein-coupled receptors superfamily. This subgroup consists of ACTH-R (or MCR-2), MSH-R (MCR-1) and three other receptors (MCR3 to 5). It is encoded by an intron-less gene on chromosome 18p11.2. Inactivating mutations in *ACTH-R* have been

identified in several families with hereditary isolated glucocorticoid deficiency. A screening for *ACTH-R* mutations in a variety of adrenal tumours did not identify somatic activating mutations.<sup>5</sup> One potential activating germline mutation of *ACTH-R* has been described in a patient with bilateral adrenal hyperplasia and Cushing's syndrome. The functional characterisation of this mutant receptor has demonstrated that it displays high levels of basal activity due to a defect in receptor desensitisation.<sup>28</sup> A case of a woman with two germline mutations in *ACTH-R*, leading to a previously undescribed syndrome, "ACTH hypersensitivity syndrome" has been reported.<sup>29</sup> However, no functional studies were reported to confirm this. On the other hand *ACTH-R* inactivation by allelic loss has also been investigated in ACT: it was observed in two of four informative cancers, but not in 15 hyperfunctioning ACA, suggesting a role for *ACTH-R* in cellular differentiation.<sup>30,31</sup>

#### *Congenital adrenal hyperplasia (CAH)*

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most frequent genetic endocrine diseases, inherited as an autosomal recessive trait. It is caused by the loss of or severe decrease in activity of one of the steroidogenic enzymes involved in cortisol biosynthesis (mostly 21-hydroxylase (21-OH), 11 $\beta$ -hydroxylase (11 $\beta$ -OH), and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase). Deficiencies in 21-hydroxylase (*CYP21*) are the most common causes of CAH, accounting for 90–95% of cases. All the known biochemical defects impair cortisol secretion, resulting in the stimulation of pituitary corticotrophs, leading to compensatory hypersecretion of ACTH resulting in hyperplasia of the adrenal cortex. This effect is ACTH-dependent, whereas extrinsic factors, such as growth factors or mitogens, may be involved in adrenal hyperplasia. These two different mechanisms may account for the heterogeneous clonal pattern of CAH.

In the past, both homozygous and heterozygous patients with CAH have been reported to have substantially enlarged adrenal glands and a prevalence of adrenal incidentalomas.<sup>32</sup> Beuschlein et al.<sup>33</sup> investigated the mutational spectrum and mRNA levels for the *CYP21* gene in six aldosterone-producing adenomas, four adrenal carcinomas and two adrenocortical incidentalomas. They found that neither of the two adrenocortical incidentalomas had homozygous or heterozygous *CYP21* mutations, although the mRNA contents of the two tumours were markedly lower than those of aldosterone-producing adenomas. No mutation in *CYP21* was detected in a study of leukocyte DNA from a series of 27 patients, whereas two heterozygous *CYP21* mutations were found in adrenal tumour DNA.<sup>34</sup> By contrast, in another series, a higher frequency of classic CAH carriers (16%) and of manifest CAH (2%) was reported among patients with adrenal adenomas than in the general population.<sup>35</sup> Few data concerning *CYP11B* gene mutations in adrenocortical tumours have been reported: 11 $\beta$ -OH deficiency may be involved in adrenal tumorigenesis, but no *CYP11B* gene mutation has been reported.

#### *Glucocorticoid-remediable aldosteronism (GRA)*

Glucocorticoid-remediable aldosteronism (GRA) was the first described familial form of hyperaldosteronism. This disorder is characterised by the chronic regulation of aldosterone secretory function by ACTH. Aldosterone hypersecretion can therefore be chronically blocked by exogenous glucocorticoids, such as dexamethasone. This autosomal dominant disorder has been shown to be caused by a hybrid gene formed by crossover between the ACTH-responsive regulatory portion of the 11 $\beta$ -hydroxylase (*CYP11B1*) gene and the coding region of the aldosterone synthase gene (*CYP11B2*). Adrenal tumours, together with micronodular and homogeneous hyperplasia of the adrenal cortex, have been observed in familial cases.<sup>36,37</sup>

### **Signaling pathways alterations in benign adrenocortical tumors**

The various components of signaling pathways used by extracellular ligands to control cell function can be described from the membrane receptor at the cell surface to transcription factors in the nucleus. Two such pathways involve cAMP and Wnt.

The important role of the cAMP pathway in the development and function of the normal adrenal cortex and its known pathophysiological involvement in hypersecretory tumors of other endocrine tissues (e.g. pituitary and thyroid) have naturally pinpointed it as a major source of candidates among

which to search for molecular culprits in ACT development.<sup>38</sup> The discovery of the role of *PRKAR1A* in CNC (see above) is one illustration.

The role of the Wnt signaling pathway in various tumors is now well established. Recently reported gene-profiling studies of ACT suggest that the Wnt signaling pathway is activated in different types of ACT (see below).

#### *Alteration of the cAMP pathway from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors (Fig. 1)*

As detailed previously, several key elements of the cAMP signaling pathway presenting genetic alterations are observed in ACT: the ACTH receptor (ACTH-R); the alpha-subunit of the Gs protein (GNAS1); phosphodiesterases and *PRKAR1A*.

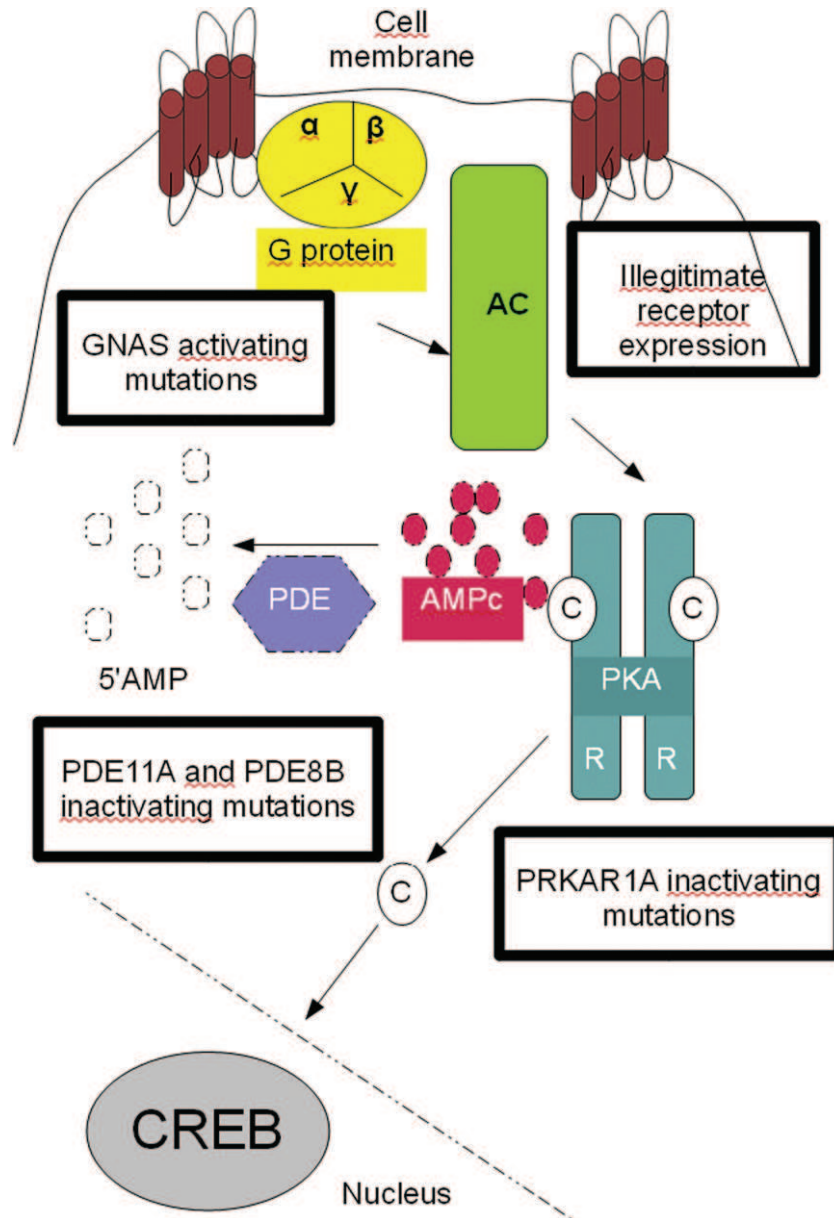
Some elegant clinical observations of dysregulated cortisol secretion in cases of AIMAH and ACA have led to the concept of “illegitimate” membrane receptor expression in adrenal Cushing syndrome. The best example is the food-dependent Cushing’s syndrome. It was first identified in a male patient with a unilateral ACA.<sup>39</sup> Yet the final evidence of an abnormal adrenocortical response to Gastric Inhibitory Polypeptide (GIP) in food-dependent Cushing’s syndrome was first demonstrated in two patients with AIMAH, both with low fasting cortisol levels that increased after food intake<sup>40,41</sup> (Fig. 2). To date, several cases of food-dependent Cushing’s syndrome have been published, mostly in patients with AIMAH and more rarely in patients with ACA.<sup>4,42</sup> In patients with this rare condition, cortisol secretion is abnormally stimulated by gastric inhibitory polypeptide (GIP). This is explained by illegitimate expression of the GIP receptor in the tumoral adrenal cortex of these patients. The GIP receptor stimulates increased intracellular levels of cAMP. This expression of a functional GIP receptor might not only take part in cortisol dysregulation but also stimulate tumor growth.<sup>43</sup> The same concept of illegitimate membrane receptor in adrenal Cushing syndrome has been observed for other G-protein-coupled receptors controlling the cAMP pathway, for example the receptors for luteinizing hormone or human chorionic gonadotrophic hormone and the  $\beta$ -adrenergic receptors.<sup>44–46</sup>

PKA is a central component of the cAMP pathway. Its dysregulation by inactivating mutations of the regulatory subunit R1A (*PRKAR1A*) is of course another example of the importance of this pathway in ACT, first demonstrated by the genetic study of a familial disease. Transcriptome analysis by the serial analysis of gene expression method has shown that PKA-regulated genes as well as genes controlled by the transcription factor cAMP-response element binding protein (CREB, a nuclear target of PKA) are stimulated in PPNAD tissue from patients presenting a *PRKAR1A* germline mutation.<sup>47</sup> In PPNAD tissues from CNC patients, as well as in a mouse transgenic model of *PRKAR1A* inactivation, an increased type II versus type I PKA activity is observed.<sup>48,49</sup> It is possible that *PRKAR1A* inactivation exerts some effects on other signaling pathways more classically involved in tumorigenesis. For instance, extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) is activated in lymphocytes from CNC patients with *PRKAR1A* germline mutation.<sup>50</sup> Similarly, inactivation of the Carney complex gene (*PRKAR1A*) in adrenal cortical cells in culture lead to inhibition of a main mediator of TGF $\beta$  action, SMAD 3.<sup>51</sup>

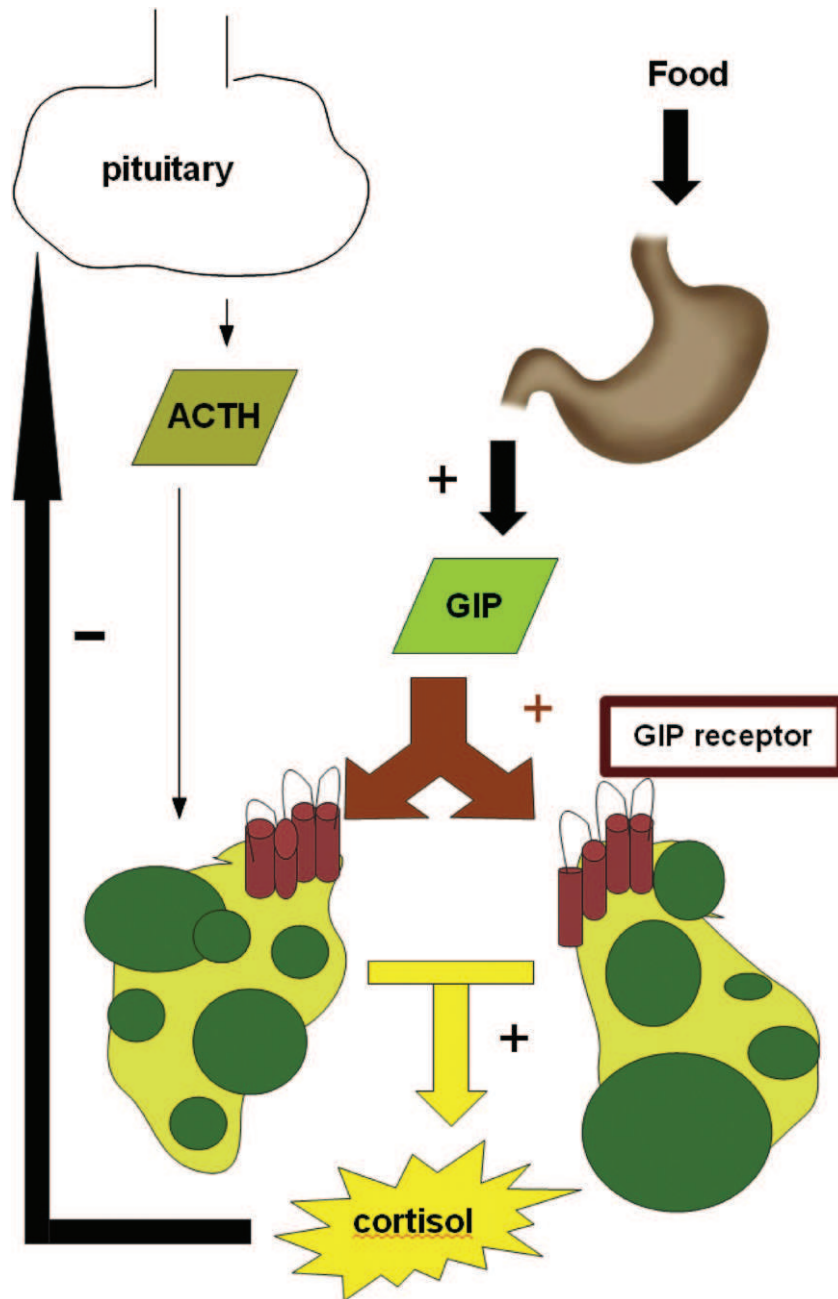
#### *The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in adrenocortical tumors (Fig. 3)*

Genetic alterations of the Wnt signaling pathway were initially identified in familial adenomatous polyposis coli ([FAP]; MIM 175100) and the findings have been extended to a variety of cancers (Table 1). Patients who have FAP and who have germline mutations of the *APC* (adenomatous polyposis coli) gene that lead to an activation of the Wnt signaling pathway may develop ACT.<sup>52</sup> Molecular studies have suggested that somatic mutations of *APC* could occur in these tumors in patients who already have a germline defect.

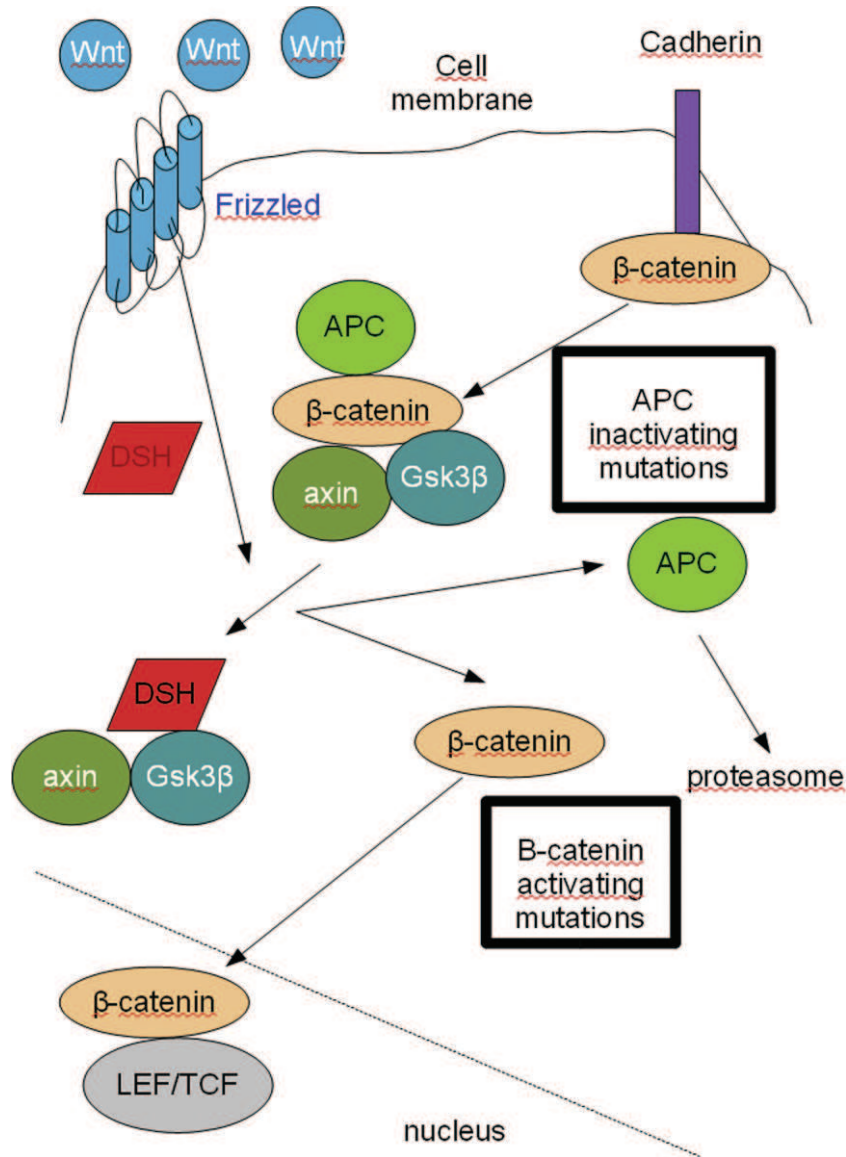
The Wnt signaling pathway is normally activated during embryonic development, and  $\beta$ -catenin is a key component of this pathway. It has a structural role in cell–cell adhesion, and is a transcription cofactor with T cell factor/lymphoid enhancer factor mediating transcriptional activation of target genes of the Wnt signaling pathway. GSK3- $\beta$  is implicated in the regulation of  $\beta$ -catenin. In the absence of Wnt signaling, the level of  $\beta$ -catenin is low:  $\beta$ -catenin is phosphorylated at critical NH2-terminal residues by the GSK3- $\beta$  bound to a scaffolding complex of axin and adenomatous polyposis coli protein (APC) and subsequently the phosphorylated protein is degraded by the ubiquitin-proteasome system. Wnt stimulation leads to the inactivation of GSK3- $\beta$  and thereby the stabilization of  $\beta$ -catenin in the cytoplasm.



**Fig. 1.** Alterations of the cAMP signaling pathway in benign adrenocortical tumors. ACTH bind to specific a cell surface G-protein-coupled receptor (GPCR) resulting in a conformational change of the GPCR that activate adenylyl cyclase. Adenylyl cyclase catalyses the conversion of ATP to cAMP. Elevation in the cellular cAMP level lead to the activation of the PKA, a tetrameric enzyme, composed of 2 regulatory and 2 catalytic subunits. When PKA is activated, the catalytic subunits of the PKA are free and can phosphorylate a series of targets that regulate downstream effectors enzymes, ion channels, and activate the transcription of specific genes, in particular the transcription factor CREB. Various molecules that trigger the cAMP pathway are involved in benign adrenocortical tumors: illegitimate expression of membrane receptors, for example gastric inhibitory polypeptide receptor,  $\beta$ -adrenergic receptor and luteinizing hormone receptor; activating mutations of *GNAS1* in McCune–Albright syndrome; inactivating germline mutation of the *PRKAR1A* gene in Carney complex; inactivating germline mutation of *PDE8B* and *PDE11A4* genes in adrenocortical adenoma, primary pigmented nodular adrenocortical adenoma or macronodular bilateral adrenal hyperplasia. Abbreviations: AC: adenylyl cyclase; ACTH: adrenocorticotrophic-hormone; C: the catalytic subunits of protein kinase; cAMP: cyclic AMP; CREB: cyclic AMP response element binding protein; PDE: phosphodiesterase; PKA: proteine kinase A; R: the regulatory subunits of protein kinase.



**Fig. 2.** Adrenal ectopic expression of Gastric Inhibitory Peptide (GIP) receptor in adrenocorticotropic-independent macronodular adrenal hyperplasia causing food-dependent Cushing syndrome. Aberrant stimulation of steroidogenesis in ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia (AIMAH) or in some unilateral adrenal adenomas (ACA) can be driven by ectopic receptors such as the GIP receptor. In this situation, GIP is released in physiological concentrations by the small intestine after meals. However, because of the binding to the ectopic adrenal GIP receptor that stimulates adenylyl cyclase and cAMP production this results in a post-prandial increase in plasma cortisol. Cortisol exerts its negative feedback on ACTH synthesis and leads to suppressed levels of plasma ACTH, explaining the low level of cortisol during fasting.



**Fig. 3.** Alterations of the Wnt/β-catenin signaling pathway in benign adrenocortical tumors. The membrane β-catenin binds to the E-cadherin cytoplasmic domain. In the absence of Wnt ligand, β-catenin binds a complex comprising the product of the tumor suppressor gene APC (Adenomatosis Polyposis Coli), axin and two serine threonin kinases Glycogen Synthetase Kinase 3β (GSK-3β). Wnt signaling is initiated after Wnt ligand binding to a member of a seven-transmembrane Frizzled family receptor. Wnt stimulation leads to hyperphosphorylation of Dishevelled (Dsh) and to the dissociation of the complex APC/axin/ GSK-3β, allowing a cytoplasmic accumulation of β-catenin. Then, β-catenin will be targeted in the nucleus leading to stimulation of target gene expression after interaction between β-catenin and TCF/LEF (T Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor) family of transcription factor. Abbreviations: APC: adenomatous polyposis coli; DSH: dishevelled; GSK3β: glycogen synthase kinase 3β; LEF: Lymphoid enhancer-binding factor; TCF: T cell factor.

Interestingly, gene-profiling studies in various types of ACT have shown the frequent activation of genes that are targets of the Wnt signaling: in AIMAH transcriptome analysis has shown overexpression of the *Wnt-inducible signaling pathway protein 2 (Wisp2)* gene.<sup>53</sup> More recently, gene-profiling by serial analysis of gene expression and miRNA study has obtained similar results in PPNAD.<sup>47,54</sup>

Immunohistochemistry can be used to study  $\beta$ -catenin protein localization as a marker of activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. When the pathway is not activated  $\beta$ -catenin is localized at the cell membrane. After activation by an extracellular ligand or a genetic alteration,  $\beta$ -catenin is visible in the cytoplasm and/or the nucleus. In both ACA and ACC as well as PPNAD,  $\beta$ -catenin cytoplasmic and/or nuclear accumulation can be observed by immunohistochemistry.<sup>55–58</sup> This  $\beta$ -catenin extra-membranous localization suggests activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. The initial study reported by immunohistochemistry an abnormal localization of  $\beta$ -catenin in 10 of 26 ACA.<sup>55</sup> In ACA, according to Tissier et al.<sup>55</sup>,  $\beta$ -catenin alterations seem more frequent in non-oversecreting tumors, suggesting that  $\beta$ -catenin pathway activation might be mostly involved in the development of non-secreting ACA. Nevertheless this observation is not confirmed by Tadjine et al.<sup>56</sup>

Activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in ACT can be explained by the occurrence of activating somatic mutations in a subset of these tumors. At present  $\beta$ -catenin activating mutations are the most frequent genetic defects identified both in sporadic ACA and ACC.<sup>55,56</sup> An activating somatic mutation of the  $\beta$ -catenin gene was first reported in about a quarter of ACA (7/26) and ACC (4/13); and were observed only in ACT with abnormal  $\beta$ -catenin accumulation. Both point mutation and long deletions causing part or entire loss of exon 3 were found in ACT. All these mutations in exon 3 of the  $\beta$ -catenin gene affect specific serine and threonine residues, and amino acids adjacent to them, which are essential for the targeted degradation of  $\beta$ -catenin.

In PPNAD,  $\beta$ -catenin somatic activating mutations can be observed, and interestingly, these mutations were only found in macronodules, defined as nodule larger than 10 mm, whereas micronodules and contralateral adrenals did not harbor any mutation.<sup>57,58</sup> This suggests that this molecular alteration might be linked to the appearance of these unusually big nodules in PPNAD, and that progressive accumulation of genetic alterations would favor the development of macronodules in PPNAD. The frequent observation of  $\beta$ -catenin accumulation in PPNAD without  $\beta$ -catenin mutation<sup>57,58</sup> suggest a cross talks between the cAMP and the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways. A control of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by PKA has been suggested by *in vitro* studies (for review see Ref.<sup>57</sup>). This is also supported by the observation of  $\beta$ -catenin accumulation in ACA with *PRKARIA* somatic mutations.<sup>57</sup>

In mouse models of adrenal gland tumors, activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway has been observed.<sup>59</sup> It was recently demonstrated that adrenal expression of an activated transgene of  $\beta$ -catenin causes adrenal hyperplasia that can in older animals lead to malignant transformation of the adrenal cortex with aldosterone excess.<sup>60</sup>

Only two pathways have been discussed herein as being very illustrative for the pathophysiology of benign unilateral and bilateral ACT. However, other pathways, like the IGF2 signaling cascade, transforming growth factor  $\beta$  or angiogenic growth factor pathways have been previously discussed in ACT. Some pathway, like the IGF2 one might be more important for malignant tumors development.<sup>61</sup> Cross talk between these pathways, as discussed previously for the cAMP and the  $\beta$ -catenin pathways or the TGF $\beta$  signaling, are likely to be important for ACT pathogenesis. For instance, since TGF $\beta$  exerts an inhibitory role on the adrenal cortex,<sup>62</sup> the demonstration of a decreased expression of SMAD3 following *PRKARIA* inactivation offers a molecular explanation for the development of cortisol-secreting tumors by cAMP pathway dysregulation.

## Conclusion

The recognition that a signaling pathway may be altered in ACT has several implications. It unravels a list of actors among which the investigator can logically look for other molecular defects. It is conceivable, for example, that along the cAMP pathway other defects will explain a subset of ACT.

A given signaling pathway may be associated with a (more or less) specific phenotype: interestingly, ACT with an activated cAMP pathway are most often benign, well-differentiated tumors, with cortisol oversecretion. This is in keeping with observations made in pituitary and thyroid tumors; mutations that activate membrane receptors or Gs protein are also observed in benign hypersecreting tumors (i.e. somatotroph adenomas and thyroid toxic adenomas responsible for hyperthyroidism).

Along a given signaling pathway, one has more possibilities to design targeted therapeutic strategies. The unraveling of numerous molecular actors and signaling pathways that are involved in ACT has provided new potential targets for treatment. In AIMAH, illegitimate expression of a given receptor may direct a specific, nonconventional, pharmacologic approach: examples include the use of somatostatin analogs in tumors that express the GIP receptor, gonadotropin-releasing hormone agonists in tumors that express the luteinizing hormone receptors, or the use of  $\beta$ -adrenergic antagonists in tumors that express catecholamine receptors. In the future development of drugs that target the enzymes phosphodiesterases or PKA might also be interesting to treat secreting ACT and others causes of adrenal steroid oversecretion. Similarly the development of drug targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is envisaged for the treatment of ACT.<sup>63</sup>

#### Practice point

Most benign adrenocortical tumors are unilateral and sporadic.  
Some genetic disorders associated with adrenocortical tumors, often bilateral, are important to recognize in some rare but very illustrative disorders.  
Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN 1) is due to inactivating mutation of the menin tumor suppressor gene, and causes benign adrenocortical tumor or hyperplasia in about a third of the cases, and rarely adrenocortical cancer.  
Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Dysplasia (PPNAD) is a bilateral micronodular adrenocortical hyperplasia responsible for adrenal Cushing's syndrome and most often associated with Carney complex and germline *PRKAR1A* inactivating mutation.  
Benign and malignant adrenocortical tumors can be observed in Familial Adenomatous Polyposis Coli due to APC germline inactivating mutations.  
Illegitimate membrane receptors expression is frequent in ACTH-independent Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (AIMAH) and can lead in a subset of patients to the use of novel medical therapy to control adrenal Cushing's syndrome.

#### Research agenda

To identify the molecular mechanisms associated with the development of benign cortisol-secreting tumors due to molecular alterations of the cAMP pathway.  
To identify the molecular targets of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in adrenocortical tumors.  
To progress in the genetic of some rare familial forms of micro- and macronodular adrenocortical tumors.  
Development of drugs inhibiting the activation of the cAMP and Wnt/ $\beta$ -catenin pathways.  
Development of new medical approaches and drugs to target illegitimate membrane receptors expression.

#### Grants or fellowships supports

Our work is supported in part by the Agence Nationale de la Recherche (ANR08-GENOPAT-002), the Plan Hospitalier de Recherche Clinique to the COMETE network (AOM06179), and the European Science Foundation to the ENSAT network. D.V. is the recipient of a fellowship from the Institut National du Cancer (INCa).

#### References

1. Bertherat J, Mosnier-Pudar H & Bertagna X. Adrenal incidentalomas. *Current Opinion in Oncology* 2002; **14**: 58–63.
2. Bertherat J, Groussin L & Bertagna X. Mechanisms of disease: adrenocortical tumors—molecular advances and clinical perspectives. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2006; **2**: 632–641.



3. Carney JA & Young WF. Primary pigmented nodular adrenocortical disease and its associated conditions. *The Endocrinologist* 1992; **2**: 6–21.
4. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J & Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocrine Reviews* 2001; **22**: 75–110.
5. Libe R & Bertherat J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *European Journal of Endocrinology* 2005; **153**: 477–487.
- \*6. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC et al. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)* 1985; **64**: 270–283.
7. Stratakis CA, Kirschner LS & Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001; **86**: 4041–4046.
8. Bertherat J. Carney complex (CNC). *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; **1**: 21.
- \*9. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics* 2000; **26**: 89–92.
10. Casey M, Vaughan CJ, He J et al. Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *Journal of Clinical Investigation* 2000; **106**: R31–R38.
- \*11. Bertherat J, Horvath A, Groussin L et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKAR1A): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009; **94**: 2085–2091.
12. Groussin L, Jullian E, Perlemoine K et al. Mutations of the PRKAR1A gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; **87**: 4324–4329.
13. Groussin L, Kirschner L, Vincent-Dejean C et al. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and Primary Pigmented Nodular Adrenocortical Disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology. *American Journal of Human Genetics* 2002; **71**: 1432–1442.
14. Groussin L, Horvath A, Jullian E et al. A PRKAR1A mutation associated with primary pigmented nodular adrenocortical disease in 12 kindreds. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; **91**: 1943–1949.
15. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22–24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Research* 2003; **63**: 5308–5319.
16. Horvath A & Stratakis CA. Unraveling the molecular basis of micronodular adrenal hyperplasia. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 2008; **15**: 227–233.
- \*17. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C et al. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nature Genetics* 2006; **38**: 794–800.
18. Libe R, Fratticci A, Coste J et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clinical Cancer Research* 2008; **14**: 4016–4024.
19. Horvath A, Korde L, Greene MH et al. Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Research* 2009; **69**: 5301–5306.
20. Horvath A, Giatzakis C, Tsang K et al. A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *European Journal of Human Genetics* 2008; **16**(10): 1245–1253.
21. Kjellman M, Roshani L, Teh BT et al. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; **84**: 730–735.
22. Schulte KM, Mengel M, Heinze M et al. Complete sequencing and messenger ribonucleic acid expression analysis of the MEN1 gene in adrenal cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000; **85**: 441–448.
23. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK et al. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999; **84**: 216–219.
- \*24. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV et al. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *The New England Journal of Medicine* 1991; **325**: 1688–1695.
25. Dall'Asta C, Ballare E, Mantovani G et al. Assessing the presence of abnormal regulation of cortisol secretion by membrane hormone receptors: in vivo and in vitro studies in patients with functioning and non-functioning adrenal adenoma. *Hormone and Metabolic Research* 2004; **36**: 578–583.
26. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A et al. Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. *Cancer* 1993; **72**: 1386–1393.
27. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003; **88**: 2147–2151.
28. Swords FM, Baig A, Malchoff DM et al. Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Molecular Endocrinology* 2002; **16**: 2746–2753.
29. Hiroi N, Yakushiji F, Shimojo M et al. Human ACTH hypersensitivity syndrome associated with abnormalities of the ACTH receptor gene. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1998; **48**: 129–134.
30. Reincke M, Mora P, Beuschlein F et al. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997; **82**: 3054–3058.
31. Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A et al. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *European Journal of Endocrinology* 2001; **144**: 199–206.
32. Ravichandran R, Lafferty F, McGinniss MJ & Taylor HC. Congenital adrenal hyperplasia presenting as massive adrenal incidentalomas in the sixth decade of life: report of two patients with 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996; **81**: 1776–1779.
33. Beuschlein F, Schulze E, Mora P et al. Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1998; **83**: 2585–2588.
34. Kjellman M, Holst M, Backdahl M et al. No overrepresentation of congenital adrenal hyperplasia in patients with adrenocortical tumours. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 1999; **50**: 343–346.


35. Baumgartner-Parzer SM, Pauschenwein S, Waldhausl W et al. Increased prevalence of heterozygous 21-OH germline mutations in patients with adrenal incidentalomas. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2002; **56**: 811–816.
36. Jeunemaitre X, Charru A, Pascoe L et al. Hyperaldosteronism sensitive to dexamethasone with adrenal adenoma. Clinical, biological and genetic study. *Presse médicale* 1995; **24**: 1243–1248.
37. Jackson RV, Lafferty A, Torpy DJ & Stratakis C. New genetic insights in familial hyperaldosteronism. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002; **970**: 77–88.
38. Rosenberg D, Groussin L, Bertagna X & Bertherat J. cAMP pathway alterations from the cell surface to the nucleus in adrenocortical tumors. *Endocrine Research* 2002; **28**: 765–775.
39. Hamet P, Larochelle P, Franks DJ et al. Cushing syndrome with food-dependent periodic hormonogenesis. *Clinical and Investigative Medicine* 1987; **10**: 530–533.
40. Lacroix A, Bolte E, Tremblay J et al. Gastric inhibitory polypeptide-dependent cortisol hypersecretion—a new cause of Cushing's syndrome. *The New England Journal of Medicine* 1992; **327**: 974–980.
- \*41. Reznik Y, Allali-Zerah V, Chayvialle JA et al. Food-dependent Cushing's syndrome mediated by aberrant adrenal sensitivity to gastric inhibitory polypeptide. *The New England Journal of Medicine* 1992; **327**: 981–986.
42. Groussin L, Perlemoine K, Contesse V et al. The ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor is frequent in adrenocorticotropin-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia, but rare in unilateral tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; **87**: 1980–1985.
43. Mazzuco TL, Chabre O, Sturm N et al. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. *Endocrinology* 2006; **147**: 782–790.
44. Lacroix A, Hamet P & Boutin JM. Leuprolide acetate therapy in luteinizing hormone–dependent Cushing's syndrome. *The New England Journal of Medicine* 1999; **341**: 1577–1581.
- \*45. Lacroix A, Tremblay J, Rousseau G et al. Propranolol therapy for ectopic beta-adrenergic receptors in adrenal Cushing's syndrome. *The New England Journal of Medicine* 1997; **337**: 1429–1434.
46. Bertherat J, Contesse V, Louiset E et al. In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; **90**: 1302–1310.
47. Horvath A, Mathyakina L, Vong Q et al. Serial analysis of gene expression (SAGE) in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006; **91**: 584–596.
48. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakina L et al. Down-regulation of regulatory subunit type 1A of protein kinase A leads to endocrine and other tumors. *Cancer Research* 2004; **64**: 8811–8815.
49. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakina L et al. A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other PRKAR1A induced lesions. *Journal of Medical Genetics* 2004; **41**: 923–931.
50. Robinson-White A, Hundley TR, Shiferaw M et al. Protein kinase-A activity in PRKAR1A-mutant cells, and regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *Human Molecular Genetics* 2003; **12**: 1475–1484.
51. Ragazzon B, Cazabat L, Rizk-Rabin M et al. Inactivation of the Carney complex gene 1 (protein kinase A regulatory subunit 1A) inhibits SMAD3 expression and TGF beta-stimulated apoptosis in adrenocortical cells. *Cancer Research* 2009; **69**: 7278–7284.
52. Naylor EW & Gardner EJ. Adrenal adenomas in a patient with Gardner's syndrome. *Clinical Genetics* 1981; **20**: 67–73.
53. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A et al. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 2004; **23**: 1575–1585.
54. Iliopoulos D, Bimpaki EI, Nesterova M & Stratakis CA. MicroRNA signature of primary pigmented nodular adrenocortical disease: clinical correlations and regulation of Wnt signaling. *Cancer Research* 2009; **69**: 3278–3282.
- \*55. Tissier F, Cavard C, Groussin L et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Research* 2005; **65**: 7622–7627.
56. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L & Bourdeau I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2008; **68**: 264–270.
57. Gaujoux S, Tissier F, Groussin L et al. Wnt/ss-catenin and cAMP/PKA signaling pathways alterations and somatic ss-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; **93**: 4135–4140.
58. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L et al. Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Clinical Endocrinology (Oxford)* 2008; **69**: 367–373.
59. Bielinska M, Genova E, Boime I et al. Gonadotropin-induced adrenocortical neoplasia in NU/J nude mice. *Endocrinology* 2005; **146**: 3975–3984.
60. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S et al. Constitutive (beta)-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Human Molecular Genetics* 2010; **19**: 1561–1576.
61. Bertherat J & Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009; **23**: 261–271.
62. Feige JJ, Vilgrain I, Brand C et al. Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. *Journal of Endocrinology* 1998; **158**: 7–19.
63. Doghman M, Cazareth J & Lalli E. The Tcf/(beta)-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; **93**: 3222–3255.

### **3 Carney complex. Clinical and genetic 2010 update.**

Vezzosi D, Vignaux O, Dupin N, Bertherat J. Annales d'Endocrinologie (Paris). 2010, 71(6):486-93.



ELSEVIER  
MASSON

Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
 EM|consulte  
 www.em-consulte.com

Annales  
 d'Endocrinologie  
 Annals of Endocrinology

Annales d'Endocrinologie 71 (2010) 486–493

Revue générale

## Carney complex: Clinical and genetic 2010 update

### *Le complexe de Carney en 2010*

D. Vezzosi<sup>a,b,1</sup>, O. Vignaux<sup>b,c</sup>, N. Dupin<sup>b,d</sup>, J. Bertherat<sup>a,b,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm U1016, CNRS UMR 8104, institut Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

<sup>b</sup> Université René-Descartes, France

<sup>c</sup> Department of Radiology A, hôpital Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

<sup>d</sup> Department of Dermatology, hôpital Cochin, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

<sup>e</sup> Department of Endocrinology, service des maladies endocriniennes et métaboliques,

National Reference Center for Rare Adrenal Disorders, hôpital Cochin, 27, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France

Available online 17 September 2010

#### Résumé

Le complexe de Carney est une forme rare de néoplasie endocrine multiple familiale décrite pour la première fois au milieu des années 1980, responsable non seulement de tumeurs endocrines (corticosurrénale, hypophyse et thyroïde) mais également de multiples lésions non endocrines telles que des myxomes cardiaques, des tumeurs testiculaires, des schwannomes mélanocytiques, des myxomes mammaires et cutanés ainsi que des lésions cutanées pigmentées. Le gène responsable du complexe de Carney codant pour la sous-unité régulatrice 1A de la protéine kinase A (*PRKARIA*), situé sur le chromosome 17q22-24 a été identifié il y a dix ans. Une mutation germinale inactivatrice du gène de la *PRKARIA* est retrouvée chez près de 60 % des patients. De nombreux progrès ont été réalisés depuis une décennie dans la connaissance de cette maladie rare. L'objectif de cette revue est de réaliser un état des lieux des connaissances sur les manifestations cliniques et la génétique de cette maladie.

© 2010 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Complexe de Carney ; Mutation du gène de *PRKARIA* ; Hyperplasie micronodulaire pigmentée des surrénales ; Myxome cardiaque ; Lentiginose

#### Abstract

First described in the mid 1980s, Carney complex is a rare dominantly heritable multiple endocrine neoplasia syndrome that affects endocrine glands as the adrenal cortex, the pituitary and the thyroid. It is associated with many other nonendocrine tumors, including cardiac myxomas, testicular tumors, melanotic schwannoma, breast myxomatosis, and abnormal pigmentation or myxomas of the skin. The Carney complex gene 1 was identified 10 years ago as the regulatory subunit 1A of protein kinase A (*PRKARIA*) located at 17q22-24. An inactivating heterozygous germ line mutation of *PRKARIA* is observed in about two-thirds of Carney complex patients. This last decade many progresses have been done in the knowledge of this rare disease and its genetics. This review outlines the current state of this knowledge on Carney complex.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Carney complex; *PRKARIA* gene mutation; Primary pigmented nodular adrenocortical disease; Cardiac myxoma; Cutaneous lentiginosis

#### 1. Abbreviations

CNC	Carney complex
LCCSCT	large-cell calcifying Sertoli cell tumor
NMD	nonsense mediated mRNA decay
PPNAD	Primary-pigmented nodular adrenocortical disease
PKA	protein kinase A

cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CT	computed tomography
GH	growth hormone
oGTT	oral glucose tolerance test
TRH	thyrotropin-releasing hormone
<i>PRKARIA</i>	type 1A of protein kinase A
IgF-1	Insulin-like growth factor 1

#### 2. Introduction

CNC was described for the first time in 1985 as “the complex of myxomas, spotty pigmentation and endocrine overactivity”

\* Corresponding author.

E-mail address: jerome.bertherat@cch.aphp.fr (J. Bertherat).

<sup>1</sup> Delphine Vezzosi has a fellowship from Institut National du Cancer.

by Carney et al. [1]. It is an autosomal dominant multiple endocrine neoplasia although sporadic cases may account for up to one-third of affected individuals. The exact prevalence of CNC is difficult to establish but this is clearly a rare disease with no more than 750 cases from many ethnicities reported worldwide since 1985, when the disease was first described. However, this prevalence can be underestimated because the diagnosis can be challenging and the awareness of this rare and complex disorder is limited among the medical community.

The endocrine and nonendocrine manifestations of CNC can be numerous and vary between patients. These include myxomas of the heart, skin and breast, testicular, adrenocortical and GH secreting pituitary tumors, schwannomas. In general, families with CNC tend to have similar groupings of manifestations, although some families exhibit variability. Also, CNC families can exhibit only one tumor type, as isolated PPNAD or isolated cardiac myxomas [2]. The estimated frequency of these manifestations is listed in Table 1.

The diagnosis criteria for CNC were reviewed in 2001 and are provided in Table 2 [3]. Diagnosis is based on the presence of two or more cardinal manifestations confirmed by histology,

Table 1

Main features of Carney complex. Frequency of the lesions of Carney complex according to [2].

*Principales caractéristiques du complexe de Carney. Fréquence des lésions du complexe de Carney selon [2].*

Organ system	Finding	Frequency (%)
Skin	Lentiginosis	70
	Other nevi or skin lesions	50
Myxoma	Cardiac	32
	Extracardiac	20
Endocrine tumor	PPNAD	60
	Acromegaly	12
	Thyroid nodules	25
Gonadal tumors	Testicular tumor	41
	Ovarian cysts	14
Neural crest	Schwannoma	5
Breast	Breast ductal adenoma	20
Bone	Osteochondromyxoma	< 10

Table 2

Diagnostic criteria for Carney complex and findings suggestive of a possible association with Carney complex but not diagnostic for the disease.

*Critères diagnostiques du complexe de Carney et anomalies cliniques suggérant une possible association à ce complexe sans constituer un critère diagnostique de la maladie.*

*Major diagnostic criteria for CNC*

- Spotty skin pigmentation with typical distribution (lips, conjunctiva and inner or outer canthi, vaginal and penile mucosa)
- Myxoma (cutaneous and mucosa)<sup>a</sup>
- Cardiac myxoma<sup>a</sup>
- Breast myxomatosis<sup>a</sup> or fat-suppressed magnetic resonance imaging findings suggestive of this diagnosis
- Primary-pigmented adrenocortical disease<sup>a</sup> or paradoxical positive response of urinary glucocorticosteroid excretion to dexamethasone administration during Liddle's test
- Acromegaly due to GH-producing adenoma<sup>a</sup>
- Large-cell calcifying Sertoli cell tumor<sup>a</sup> or characteristic calcification on testicular ultrasound
- Thyroid carcinoma<sup>a</sup> or multiple, hypochoic nodules on thyroid ultrasound in a young patient
- Psammatous melanotic schwannomas<sup>a</sup>
- Blue nevus, epithelioid blue nevus<sup>a</sup>
- Breast ductal adenoma<sup>a</sup>
- Osteochondromyxoma<sup>a</sup>

*Supplementary criteria*

- Affected first-degree relative
- Inactivating mutation of the *PRKARIA* gene

*Findings suggestive of or possibly associated with CNC but not diagnosis for the disease*

- Intense freckling (without darkly pigmented spots or typical distribution)
- Blue nevus, common type (if multiple)
- Café au lait spots or other birthmarks
- Elevated IGF1 levels, abnormal oGTT or paradoxical GH response to TRH testing in the absence of clinical acromegaly
- Cardiomyopathy
- Pilonidal sinus
- History of Cushing syndrome, acromegaly or sudden death in extended family
- Multiple skin tags or other skin lesions; lipomas
- Colonic polyps (usually mild and almost always combined with clinical or subclinical acromegaly)
- Hyperprolactinemia (usually mild and almost always combined with clinical or subclinical acromegaly)
- Single, benign thyroid nodule in a young patient; multiple thyroid nodules in an older patient (detected on ultrasound)
- Family history of carcinoma, in particular of the thyroid, colon, pancreas and ovary; other multiple benign or malignant tumors

Adapted from [3] (*adapté de [3]*).

CNC: Carney complex; GH: growth hormone.

<sup>a</sup> After histological confirmation.

biochemical testing or imaging. If the patient has a demonstrated germ line *PRKARIA* mutation and/or a first-degree relative affected by CNC, a single manifestation is sufficient for the diagnosis.

Once the diagnosis is demonstrated, the patient will require life-long surveillance. Clinical work-up for all the manifestations of CNC should be performed at least once a year in all patients and should start in infancy for some manifestations.

This review intends to present the current knowledge about the clinical and genetic aspects of the disease and to discuss its management.

### 3. Molecular genetics of Carney complex

The first report of Carney complex in 1985 [1] suggested already its autosomal dominant inheritance. Then, the genes responsible have been mapped to 17q22-24. In tumors from CNC patients of families mapping to 17q, loss of heterozygosity was helpful to precise the location of the *CNC1* gene [4].

#### 3.1. *PRKARIA* and the 17q22-24 locus

The *CNC1* gene located at 17q22-24 has been reported 10 years ago as encoding the regulatory subunit *PRKARIA* [4,5].

PKA is a 3',5' cAMP-dependant protein kinase and a main mediator of cAMP signalling. It is therefore a key and ubiquitous enzyme controlling various cellular functions. For instance, it plays a major role in peptide hormone signalling and endocrine tissue activity. PKA is a heterotetrameric enzyme, composed of two regulatory and two catalytic subunits [6]. Elevation in the intracellular cAMP levels and, consequently, binding of cAMP to PKA lead to dissociation of the free catalytic subunits from the regulatory subunits. This leads to stimulation of PKA activity. Indeed, in its free active form, the catalytic subunits can phosphorylate a series of target that regulate downstream effectors enzymes, ion channels, and activate the transcription of specific genes mediating the cell growth and differentiation [7]. *PRKARIA*, one of the regulatory subunit, is the most widely and highly expressed of the four subunits and it has been shown that it may be able to compensate for the loss of other subunits [8].

Heterozygous inactivating mutations of *PRKARIA* were reported in 45 to 73% of CNC families [2,3,9,10]. Thus, genetic analysis should be proposed to all CNC index cases. Moreover, when a *PRKARIA* gene mutation is identified, a genetic analysis should be proposed to all first-degree relatives.

*PRKARIA* mutations could be located in all the coding exons and adjacent introns of the gene (Fig. 1). Most of the known *PRKARIA* mutations are point or small mutations involving up to 15 bp affecting the coding region of the gene, including nonsense, frameshift and splice site mutations [9]. However, larger gene deletions have been described in small number of cases [11].

Mutations that lead to the expression of an abnormal, defective *PRKARIA* protein are much less frequent [10–14] and tend to be associated with an aggressive phenotype [11,12]. NMD *PRKARIA* mutations are more frequent (80%) [2,3]. They result from the occurrence of a premature stop codon that lead to degra-

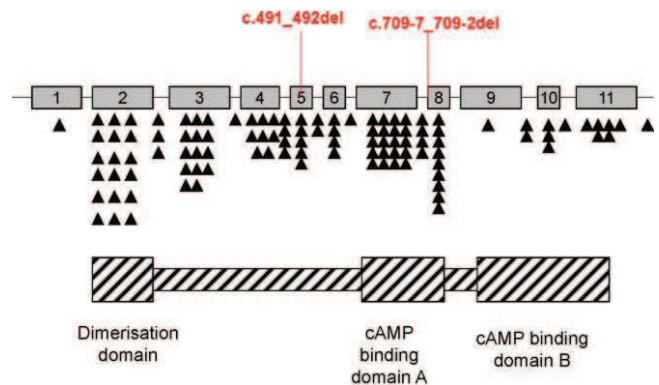


Fig. 1. *PRKARIA* mutations. Schematic presentation of the location of the 113 known germ line reported *PRKARIA* mutations. The two hot-spots are indicated. *Mutations de PRKARIA. Représentation schématique de la localisation des 113 mutations germinales connues du gène PRKARIA. Les deux sites de mutations les plus fréquentes (hot-spots) sont indiqués.*

Adapted from [56] (Adapté de [56]).

dation of the mutant mRNA by NMD. This leads to inactivation of one of the *PRKARIA* alleles.

Some phenotype-genotype correlations have been observed [2]. First, several features that distinguished *PRKARIA* mutation carriers from mutation-negative CNC were identified. Patients with *PRKARIA* mutations present more frequently and earlier in life with pigmented skin lesions, myxomas, thyroid and gonadal tumors than CNC patients without *PRKARIA* mutation. Expressed *PRKARIA* mutations seem to be associated with a more severe disease in terms of number, age at diagnosis or progression of the lesions.

Moreover, some correlations between certain mutations and the severity and type of CNC manifestations were found. Most of the patients with isolated PPNAD and mild Cushing syndrome were carriers of either the c.709-7del6 mutation in intron 7 or the c.1A > G/p.Met1Val substitution affecting the initiation codon of the protein [2,15].

Finally, lentiginos, schwannoma, acromegaly and cardiac myxomas were seen significantly more often in CNC patients with *PRKARIA* mutations located in exons, compared to those with intronic mutations. In addition, the occurrence of lentiginos, cardiac myxomas and thyroid tumors is significantly more frequent in patients with the hot-spot c.491-492delTG mutation in exon 5.

At the biochemical level, mutations of *PRKARIA* are associated with increased PKA activity in adrenal tumors from CNC patients. Mouse models of *PRKARIA* deficiency have been developed. Mice completely lacking *PRKARIA* died early during embryogenesis due to a generalized failure of the development of mesodermal structures [16,17]. In contrast, mice heterozygous for *PRKARIA* inactivation are born at expected frequencies and are tumor prone, developing neoplasms in cAMP-responsive cell types such as schwann cells, thyrocytes and osteoblasts [17]. However, no endocrine abnormalities were seen. Transgenic mice with heterogeneous expression of an antisense transgene for exon 2 of *PRKARIA* exhibit many of the phenotypic characteristics of CNC patients, including thyroid follicular hyperplasia and nondexamethasone suppressible

hypercortisolism [18,19]. Recently, mice lacking R1A specifically in the adrenal cortex have been generated. These mice develop autonomous adrenal hyperactivity and bilateral adrenal hyperplasia [20].

Initial data supported the role of *PRKARIA* as a tumor suppressor gene with tumors from CNC patients exhibiting germ line mutations and subsequent loss of heterozygosity at the *PRKARIA* locus 12. However, the precise mechanism of tumorigenesis remains controversial as it now appears that haploinsufficiency of *PRKARIA* may be sufficient for phenotypic expression of increased PKA activity [21] and the development of certain tumors such as eyelids myxomas [8].

### 3.2. *2p16 locus*

Somatic alterations of a second putative CNC locus at 2p16 have been reported in CNC tumors, even in patients with *PRKARIA* gene mutations [22]. These alterations are usually loss of heterozygosity and copy number gains, suggesting that this gene can be a potential oncogene. However, sequencing of candidate genes of the 2p16 region in the linked families did not reveal yet alterations [9,23].

### 3.3. *Phosphodiesterases genes*

*PDE8B* and *PDE11A* belong to the huge family of phosphodiesterases comprised by 21 so far identified genes that are classified in 11 different families. They are expressed in several endocrine tissues including adrenal cortex. Recently, inactivating mutations of *PDE11A* and more rarely *PDE8B* have been observed in patients with isolated micronodular pigmented (PPNAD) or nonpigmented hyperplasia [24–27]. These mutations resulted in premature stop codon generation or in single-base substitutions in the catalytic domain of the protein [28].

## 4. Carney complex manifestations

### 4.1. *Endocrine glands and gonads*

#### 4.1.1. *Cushing syndrome and primary pigmented nodular adrenocortical disease*

From an endocrine point of view, the most common manifestation of CNC is PPNAD, a cause of ACTH-independent Cushing syndrome. Although autopsies summaries report constant histological evidences for PPNAD, only 60 to 70% of CNC patients exhibit Cushing syndrome. The disease was named after the macroscopic appearance of the adrenal cortex that is characterized by the small-pigmented nodules less than 10 mm in their greatest diameter most often surrounded by atrophic cortex [29]. The disease is bilateral with primary involvement of both adrenals. Cushing syndrome due to PPNAD is more frequent in females and mostly observed in young adults, with a peak during the second and third decade of life. Clinical signs are similar to those observed in patients presenting with other causes of hypercortisolism. However, it needs to be kept under constant vigilance as clinical manifestation can sometimes be subtle and

can nonetheless lead to significant metabolic effects over time. In contrast, cyclic forms of hypercortisolism can be observed with large and rapid burst of cortisol excess, which might spontaneously regress [30–32]. Urinary cortisol is increased in most patients but its levels can be variable. The circadian rhythm of cortisol secretion is usually completely abolished. Dexamethasone fails to suppress cortisol secretion even after high dose administration. In addition, most of the patients respond to dexamethasone with a paradoxical rise of cortisol production [31]. This test may be used diagnostically for the identification of PPNAD, even in patients that have normal baseline cortisol levels and do not have clinical stigmata of Cushing syndrome. Plasma ACTH levels are low.

Adrenals appear normal on CT-scan in one out of three of the patients whereas the other patients present with micronodules (usually less than 6 mm) or more rarely macronodules larger than 10 mm [33]. Pathological investigation demonstrates that adrenal glands are usually normal in size and weight and are peppered with black or brown nodules set in a cortex that is often atrophic.

Cushing syndrome due to PPNAD requires treatment to control the consequences of cortisol oversecretion. Bilateral adrenalectomy is the most common treatment although under certain circumstances, ketoconazole or mitotane has been used as anticortisol treatment.

#### 4.1.2. *Pituitary*

Pituitary tumors typically involve the GH-producing cells and cause acromegaly. Acromegaly in CNC has usually a slow, progressive course. It does not appear until the third decade of life [34,35]. Clinical acromegaly is uncommon, being seen in approximately 10 to 15% of patients. However, prevalence of biochemical abnormalities of the GH axis as alterations in the rhythm of GH secretion may be higher if carefully screened, up to 80% of the patients [34]. These biochemical abnormalities develop before radiological evidence of a frank pituitary tumor and might be secondary to hyperplasia of GH cells, characterized at pathological examination by poorly delineated regions with increased cellularity [36].

Few Carney patients with acromegaly have an aggressively growing tumor that will require surgery followed or not with irradiation treatment [34]. Treatment of acromegaly with somatostatin analogs may also be used either as a primary treatment or as an adjuvant to surgery. Most of the remaining patients have abnormal responses to oGTT but normal IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) and normal pituitary imaging. These latter patients can be followed by magnetic resonance imaging and oGTT. If a tumor develops, it is treated surgically, whereas if IGF-1 levels increase without a visible tumor, somatostatin analogs or GH receptor antagonist treatment can be discussed.

Prolactinomas have also been reported in a small number of patients but they are most often not isolated but associated with GH adenomas [36]. Moreover, pathologic findings reveal that it is the same cellular population that demonstrated immunoreactivity for both GH and prolactin. Staining for  $\alpha$ -subunit was also present in most tumors in the same pattern as that of prolactin. TSH, LH, ACTH and FSH staining when obtained, is usually

been seen only in foci of normal pituitary cells entrapped within the tumors or the hyperplasia.

#### 4.1.3. Thyroid tumors

Thyroid nodules are fairly common in CNC patients. By sonographic examination, up to 75% of patients are found to have cystic or multinodular disease [37]. Thyroid nodules are most often benign, nontoxic adenomas, mostly of follicular type. Thyroid cancer is observed in about 3% of the patients. It is most often papillary carcinoma that can be multiple and sometimes quite aggressive indicating the need for chronic surveillance of the thyroid. Thus, for post-pubertal pediatric and adult patients, an annual clinical examination associated when required with a thyroid ultrasound is recommended. Fine needle investigation of the thyroid nodule can also be helpful.

#### 4.1.4. Gonadal tumors

Patients may exhibit ovarian tumor or testicular tumors [38]. They are rarely malignant but a small number of cancers have been reported. For post-pubertal pediatric and adult patients, an annual clinical examination associated with a gonad ultrasound is recommended.

#### 4.1.5. Testicular lesions

The testicular tumors can be of three types: Large-cell calcifying Sertoli cell tumor (LCCST), nodular adrenocortical rests and Leydig cell tumors [3,1]. Up to 20 to 50% of Carney patients have one or more of these masses.

As a sporadic neoplasm, LCCST, a stromal benign tumor, is among the rarest of lesion tumor whereas it occurs frequently in male patients with CNC [39]. LCCST may be bilateral and multifocal in about 50% of the patients [40]. They are easily detected by ultrasound investigation as bilateral microcalcifications. They progress gradually with age to replace the normal testicular tissue. As they can cause replacement and obstruction of seminiferous tubules, they can be the cause of reduced fertility observed in men with CNC. Malignant changes have been rarely described particularly when the primary tumor is large, above 6-cm diameter [41].

Nodular adrenocortical rests and Leydig cell tumors are less observed.

These three types of tumor are frequently asymptomatic. However, precocious puberty or male feminization have been rarely reported [39,41,42].

As these masses are often asymptomatic and not palpable, testicular ultrasound is routinely recommended in a patient diagnosed with CNC.

Apart from the tumoral aspects, recent data suggest that sperm abnormalities are present in CNC. Knockout male mice heterozygous for *PRKARIA* have severely reduced fertility, and these mice as well as CNC patients have morphologically abnormal sperm and reduced spermatozoid number [43,44].

**4.1.5.1. Ovarian tumors.** Women with CNC commonly develop ovarian cysts and tumors of the ovarian surface epithelium including serous cystadenomas and cystic teratomas. These lesions are easily found by sonographic examination as multiple

hypoechoic lesions [38]. They can grow and require in that case surgery. Ovarian lesions were described at autopsy in about 60% of the patients. Ultimately, they may progress occasionally to ovarian carcinoma (mucinous adenocarcinoma or endometrioid carcinoma) usually during their fifth decade of life.

Thus, although ovarian tumors do not seem to be a major manifestation of CNC, sonography of the ovaries may be part of the initial evaluation in women with CNC. Follow-up of any identified lesion is recommended because of the possible risk for malignancy.

#### 4.2. Cardiac myxomas

Cardiac myxomas are benign neoplasms almost equally distributed among the ages and the sexes. They are found in about 20 to 40% of Carney patients. Unlike sporadic tumor, CNC-associated myxomas can be located within any chamber of the heart and can be multiple. They can be the cause of stroke due to embolism and cardiac deficiency. They require surgical removal. However, they can recur despite seemingly adequate excision, thus rendering surgical cure problematic.

These tumors are the most frequent cause of death in CNC patients, either related to the tumors themselves or to surgical complications that occur during or after their removal. It may be the cause of the high rate of sudden death historically reported in CNC patients. As a consequence, early diagnosis of these tumors is important and should start in the first 6-months of life with annual screening by cardiac ultrasound. In patients with a history of cardiac myxomas, screening should be performed every 6 months. In difficult cases, transesophageal ultrasound and cardiac magnetic resonance imaging can be helpful (Fig. 4).

#### 4.3. Skin lesions

Skin manifestations are heterogeneous but are very frequent and their onset is early in patients with CNC facilitating the identification of the disease by the dermatologist. Patients with CNC do not appear to have a clear predisposition for skin cancers.

From a clinical point of view, the most commonly manifestation of CNC is lentiginosis as they are reported in about 50 to 80% of patients with CNC. Other skin lesions such as multiple blue nevi, café au lait spots and cutaneous tumors (myxomas or fibromas) are reported in about 50% of the CNC patients.

Lentiginosis are typically flat, poorly circumscribed, brownish to black macules located around the lips, on the eyelids, ears and the genital area (Fig. 2). They usually are small (<5 mm) and do not change with sun exposure. The density of pigmented spots can vary from a few lesions to profuse pigmentation. Lentiginosis is one of the manifestations of CNC that occur earlier. It may be observed at birth in some cases and often appears during childhood and the prepubertal period. Lentiginosis usually do not acquire their typical intensity and distribution until the peripubertal period [2,45,46]. CNC-lentiginosis were difficult to distinguish from solar lentiginosis in many cases. However, in contrast to the age-related skin lesions, CNC associated lentiginosis tend to fade after the fourth decade of life although they may





Fig. 2. Labial lentiginosis. Labial lentiginosis are typically small (< 5 mm), flat, poorly circumscribed, brownish to black macules.

*Lentiginose labiale. Les lentignes labiales sont typiquement des macules brunes ou noires mal circonscrites, plates, de petite taille (< 5 mm).*

be appreciable as late as the eighth decade [45,46]. Moreover, they are not found exclusively on sun exposed areas.

Blue nevi are, after lentigines, the second most frequent skin lesions in patients with CNC as they are observed in about 40% of patients [46]. They are small, blue to black-colored marks with circular or star-shaped appearance and their distribution are variable.

The third most common skin manifestation of CNC is cutaneous myxoma as they are reported in 20 to 55% of patients [2,46]. However, this percentage is likely to underestimate the true incidence of these lesions because not every skin lesions in every patient was biopsied. They typically appear before the age of 18 years and have a tendency to recur. The lesions vary between asymptomatic, sessile, small (rarely exceeding 1 cm in diameter), opalescent or dark pink papules and large, finger-like, pedunculated lesions (Fig. 3). They can occur anywhere but usually affect the eyelids, ears, nipples, external ear canal, trunk and perineum. Myxoma is the most specific dermatological criterion for CNC diagnosis. They can be used for the early detection of the disease and, thus, the prevention of life-



Fig. 3. Cutaneous myxoma. Cutaneous myxoma are typically asymptomatic, sessile, small (rarely exceeding 1 cm in diameter), opalescent or dark pink papules.

*Myxome cutané. Les myxomes cutanés sont habituellement des papules opalescentes ou roses foncées asymptomatiques, sensibles, de petite taille (excédant rarement 1 cm de diameter).*

threatening complications of CNC related to heart myxomas and endocrine abnormalities. For instance, it is estimated that approximately 80% of the CNC patients with cardiac myxomas presents with cutaneous myxomas earlier in life [2,46].

Finally, café au lait spots or other birthmarks (depigmented lesions) can also be observed. They are rarely present as an isolated skin manifestation of CNC and can be present at birth.

To date, the molecular causes underlying the formation of pigmented skin lesions in CNC are not fully understood. A possible mechanism involves the PKA-mediated activation of pathways downstream of the melanocortin receptors that form a subfamily of the G-protein-coupled receptors and regulate a wide variety of processes, including skin pigmentation [47–49].

#### 4.4. Breast lesions

Breast tissue characteristic lesions in CNC include lobular or nodular myxomatosis, myxoid fibroadenomas or ductal adenomas [50,51]. They are often bilateral and occur in 20% of the female patients [2]. However, this percentage is likely to underestimate the true incidence of these lesions because breast magnetic resonance imaging was performed in only a small number of the patients. Treatment and follow-up of these lesions are not well standardized.

#### 4.5. Psammomatous melanotic schwannoma

Pigmented melanotic schwannoma, derived from the schwann cells of the nervous system can be observed in about 5 to 10% of patients with CNC. These pigmented tumors which can be mistaken for malignant melanomas demonstrate spindle cell morphology but exhibit clinical characteristics of schwannomas. They presented with frequent calcifications and multicentricity. They can be observed anywhere in the central or peripheral system but their most frequent site are the gastrointestinal tract

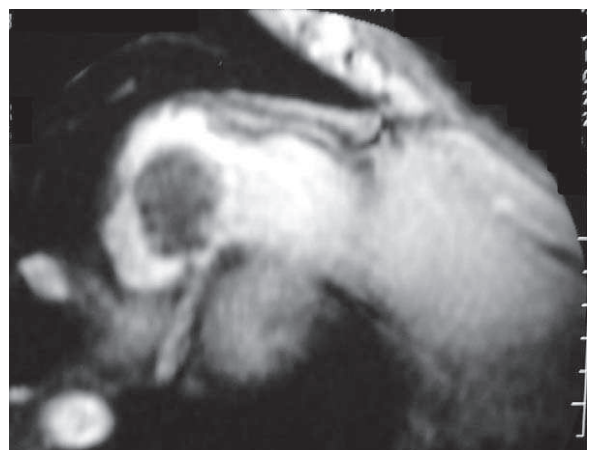


Fig. 4. Magnetic resonance imaging investigation of a cardiac myxoma in Carney complex. Steady state free precession cine sequence in right ventricular horizontal long axis exhibiting a right atrial myxoma.

*Imagerie en résonance magnétique nucléaire d'un myxome cardiaque, dans le complexe de Carney. Coupe dynamique du ventricule droit dans son grand axe horizontal montrant un myxome auriculaire droit.*

(esophagus, stomach and rectum) and the paraspinous sympathetic chain. In addition, malignancy may be observed in 10% of the cases with frequent metastasis to the lung, liver or brain. Medical or surgical treatment for metastatic schwannoma is difficult.

#### 4.6. Bone lesions: osteochondromyxoma

Osteochondromyxoma is a rare component of Carney complex that have been diagnosed in no more than 10% of the patients [52]. They occur early in life, usually before the age of 2, when sporadic bone tumors are rare. Clinically, the tumors are painless masses that occurred in distal long bones (diaphyseal) and small flat bones (nasal). Osteochondromyxoma are usually benign but local invasiveness has often been observed.

Complete excision of the lesion, when possible, should be curative. Incomplete removal is likely to be followed by local recurrence.

#### 4.7. Other lesions

Other lesions can be associated with Carney complex but are less frequent as hepatocellular carcinoma [53], intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas [54] or multiple fusiform myxomatous cerebral aneurysms [55].

### 5. Conclusion

Carney complex is a rare disease leading to numerous endocrine and nonendocrine lesions. During the last decade, numerous progresses have been done to improve diagnosis, treatment and follow up of Carney patients. However, because of the rarity and the various manifestation of CNC, Carney patients need to be followed in reference centers with a multidisciplinary approach. Moreover, prospective studies will be important to develop evidence-based recommendations for the screening schedule and therapeutic guidelines for better disease management.

#### Conflicts of interest statement

The authors have not declared any conflicts of interest.

#### References

- [1] Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine* 1985;64(4):270–83.
- [2] Bertherat J, Horvath A, Groussin L, Grabar S, Boikos S, Cazabat L, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (*PRKARIA*): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2085–91.
- [3] Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4041–6.
- [4] Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, et al. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 2000;26(1):89–92.
- [5] Casey M, Vaughan CJ, He J, Hatcher CJ, Winter JM, Weremowicz S, et al. Mutations in the protein kinase A R1alpha regulatory subunit cause familial cardiac myxomas and Carney complex. *J Clin Invest* 2000;106(5):R31–8.
- [6] Tasken K, Skalhegg BS, Tasken KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, et al. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1997;31:191–204.
- [7] Shabb JB. Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 2001;101(8):2381–411.
- [8] Amieux PS, Cummings DE, Motamed K, Brandon EP, Wailes LA, Le K, et al. Compensatory regulation of RI-alpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem* 1997;272(7):3993–8.
- [9] Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lin JP, Carney JA, Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the *PRKARIA* gene in patients with the Carney complex. *Hum Mol Genet* 2000;9(20):3037–46.
- [10] Veugelers M, Wilkes D, Burton K, McDermott DA, Song Y, Goldstein MM, et al. Comparative *PRKARIA* genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and *PRKARIA* haploinsufficient mice. *Proc National Acad Sci U S A* 2004;101(39):14222–7.
- [11] Horvath A, Bossis I, Giatzakis C, Levine E, Weinberg F, Meoli E, et al. Large deletions of the *PRKARIA* gene in Carney complex. *Clin Cancer Res* 2008;14(2):388–95.
- [12] Groussin L, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Jullian E, Delemer B, et al. Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (*PRKARIA*) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *Am J Hum Genet* 2002;71(6):1433–42.
- [13] Groussin L, Horvath A, Jullian E, Boikos S, Rene-Corail F, Lefebvre H, et al. A *PRKARIA* mutation associated with primary pigmented nodular adrenocortical disease in 12 kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(5):1943–9.
- [14] Meoli E, Bossis I, Cazabat L, Mavrakis M, Horvath A, Stergiopoulos S, et al. Protein kinase A effects of an expressed *PRKARIA* mutation associated with aggressive tumors. *Cancer Res* 2008;68(9):3133–41.
- [15] Pereira AM, Hes FJ, Horvath A, Woortman S, Greene E, Bimpaki E, et al. Association of the M1V *PRKARIA* mutation with primary pigmented nodular adrenocortical disease in two large families. *Clin Endocrinol Metab* 2010;95(1):338–42.
- [16] Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, Lee DC, Su T, Laszlo GS, et al. Increased basal cAMP-dependent protein kinase activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo. *J Biol Chem* 2002;277(30):27294–304.
- [17] Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns 2nd WH, Carney JA, Westphal H, et al. A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res* 2005;65(11):4506–14.
- [18] Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Robinson-White A, Lenherr S, et al. Down-regulation of regulatory subunit type 1A of protein kinase A leads to endocrine and other tumors. *Cancer Res* 2004;64(24):8811–5.
- [19] Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos SG, Robinson-White A, Lenherr SM, et al. A transgenic mouse bearing an antisense construct of regulatory subunit type 1A of protein kinase A develops endocrine and other tumours: comparison with Carney complex and other *PRKARIA* induced lesions. *J Med Genet* 2004;41(12):923–31.
- [20] Sahut-Barnola I, de Jousineau C, Val P, Lambert-Langlais S, Damon C, Lefrancois-Martinez AM, et al. Cushing's syndrome and fetal features resurgence in adrenal cortex-specific *PRKARIA* knockout mice. *PLoS Genet* 2010 Jun 10;6(6) (in press).
- [21] Robinson-White A, Hundley TR, Shiferaw M, Bertherat J, Sandrini F, Stratakis CA. Protein kinase A activity in *PRKARIA*-mutant cells, and regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2. *Hum Mol Genet* 2003;12(13):1475–84.
- [22] Matyakhina L, Pack S, Kirschner LS, Pak E, Mannan P, Jaikumar J, et al. Chromosome 2 (2p16) abnormalities in Carney complex tumours. *J Med Genet* 2003;40(4):268–77.

- [23] Stratakis CA, Carney JA, Lin JP, Papanicolaou DA, Karl M, Kastner DL, et al. Carney complex, a familial multiple neoplasia and lentiginosis syndrome. Analysis of 11 kindreds and linkage to the short arm of chromosome 2. *J Clin Invest* 1996;97(3):699–705.
- [24] Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, Robinson-White A, Groussin L, Griffin KJ, et al. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 2006;38(7):794–800.
- [25] Horvath A, Giatzakis C, Robinson-White A, Boikos S, Levine E, Griffin K, et al. Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Res* 2006;66(24):11571–5.
- [26] Horvath A, Mericq V, Stratakis CA. Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2008;358(7):750–2.
- [27] Horvath A, Giatzakis C, Tsang K, Greene E, Osorio P, Boikos S, et al. A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *Europ J Hum Genet* 2008;16(10):1245–53.
- [28] Libe R, Fratticci A, Coste J, Tissier F, Horvath A, Ragazzon B, et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(12):4016–24.
- [29] Shenoy BV, Carpenter PC, Carney JA. Bilateral primary pigmented nodular adrenocortical disease. Rare cause of the Cushing syndrome. *Am J Surg Pathol* 1984;8(5):335–44.
- [30] Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Louvel A, Leheup B, Luton JP, et al. Mutations of the *PRKARIA* gene in Cushing's syndrome due to sporadic primary pigmented nodular adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(9):4324–9.
- [31] Stratakis CA, Sarlis N, Kirschner LS, Carney JA, Doppman JL, Nieman LK, et al. Paradoxical response to dexamethasone in the diagnosis of primary pigmented nodular adrenocortical disease. *Ann Intern Med* 1999;131(8):585–91.
- [32] Gunther DF, Bourdeau I, Matyakhina L, Cassarino D, Kleiner DE, Griffin K, et al. Cyclical Cushing syndrome presenting in infancy: an early form of primary pigmented nodular adrenocortical disease, or a new entity? *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3173–82.
- [33] Courcousakis N, Prassopoulos P, Stratakis CA. CT findings of primary-pigmented nodular adrenocortical disease: rare cause of ACTH-independent Cushing syndrome. *AJR* 2010;194(6):W541.
- [34] Pack SD, Kirschner LS, Pak E, Zhuang Z, Carney JA, Stratakis CA. Genetic and histologic studies of somatomammotropic pituitary tumors in patients with the “complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity and schwannomas” (Carney complex). *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(10):3860–5.
- [35] Boikos SA, Stratakis CA. Pituitary pathology in patients with Carney complex: growth-hormone producing hyperplasia or tumors and their association with other abnormalities. *Pituitary* 2006;9(3):203–9.
- [36] Stergiopoulos SG, Abu-Asab MS, Tsokos M, Stratakis CA. Pituitary pathology in Carney complex patients. *Pituitary* 2004;7(2):73–82.
- [37] Stratakis CA, Courcousakis NA, Abati A, Filie A, Doppman JL, Carney JA, et al. Thyroid gland abnormalities in patients with the syndrome of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas (Carney complex). *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(7):2037–43.
- [38] Stratakis CA, Papageorgiou T, Premkumar A, Pack S, Kirschner LS, Taymans SE, et al. Ovarian lesions in Carney complex: clinical genetics and possible predisposition to malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(11):4359–66.
- [39] Premkumar A, Stratakis CA, Shawker TH, Papanicolaou DA, Chrousos GP. Testicular ultrasound in Carney complex: report of three cases. *J Clin Ultrasound* 1997;25(4):211–4.
- [40] Chang B, Borer JG, Tan PE, Diamond DA. Large-cell calcifying Sertoli cell tumor of the testis: case report and review of the literature. *Urology* 1998;52(3):520–2 [discussion 22–3].
- [41] Brown B, Ram A, Clayton P, Humphrey G. Conservative management of bilateral Sertoli cell tumors of the testicle in association with the Carney complex: a case report. *J Pediatr Surg* 2007;42(9):E13–5.
- [42] Lytras A, Tolis G. Reproductive disturbances in multiple neuroendocrine tumor syndromes. *Endocr Relat cancer* 2009;16(4):1125–38.
- [43] Burton KA, McDermott DA, Wilkes D, Poulsen MN, Nolan MA, Goldstein M, et al. Haploinsufficiency at the protein kinase A RI-alpha gene locus leads to fertility defects in male mice and men. *Mol Endocrinol (Baltimore)* 2006;20(10):2504–13.
- [44] Wieacker P, Stratakis CA, Horvath A, Klose S, Nickel I, Buhtz P, et al. Male infertility as a component of Carney complex. *Andrologia* 2007;39(5):196–7.
- [45] Young Jr WF, Carney JA, Musa BU, Wulffraat NM, Lens JW, Drexhage HA. Familial Cushing's syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease. Reinvestigation 50 years later. *N Engl J Med* 1989;321(24):1659–64.
- [46] Mateus C, Palangie A, Franck N, Groussin L, Bertagna X, Avril MF, et al. Heterogeneity of skin manifestations in patients with Carney complex. *J Am Acad Dermatol* 2008;59(5):801–10.
- [47] Abdel-Malek ZA. Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(3):434–41.
- [48] Butler AA, Cone RD. The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides* 2002;36(2–3):77–84.
- [49] Gantz I, Fong TM. The melanocortin system. *Am J Physiol* 2003;284(3):E468–74.
- [50] Carney JA, Toorkey BC. Ductal adenoma of the breast with tubular features. A probable component of the complex of myxomas, spotty pigmentation, endocrine overactivity, and schwannomas. *Am J Surg Pathol* 1991;15(8):722–31.
- [51] Carney JA, Toorkey BC. Myxoid fibroadenoma and allied conditions (myxomatosis) of the breast. A heritable disorder with special associations including cardiac and cutaneous myxomas. *Am J Surg Pathol* 1991;15(8):713–21.
- [52] Carney JA, Boccon-Gibod L, Jarka DE, Tanaka Y, Swee RG, Unni KK, et al. Osteochondromyxoma of bone: a congenital tumor associated with lentiginosis and other unusual disorders. *Am J Surg Pathol* 2001;25(2):164–76.
- [53] Gennari M, Stratakis CA, Hovarth A, Pirazzoli P, Cicognani A. A novel *PRKARIA* mutation associated with hepatocellular carcinoma in a young patient and a variable Carney complex phenotype in affected subjects in older generations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;69(5):751–5.
- [54] Pery Jr C, Avallone S, Regenet N, Coron E, Le Borgne J. Intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas in 2 twin brothers diagnosed as having the Carney complex. *Pancreas* 2009;38(2):237–9.
- [55] Ryou KS, Lee SH, Park SH, Park J, Hwang SK, Hamm IS. Multiple fusiform myxomatous cerebral aneurysms in a patient with Carney complex. *J Neurosurg* 2008;109(2):318–20.
- [56] Horvath A, Bertherat J, Groussin L, Guillaud-Bataille M, Tsang K, Cazabat L, et al. Mutations and polymorphisms in the gene encoding regulatory subunit type 1-alpha of protein kinase A (*PRKARIA*): an update. *Hum Mutat* 2008;31(4):369–79.

**4 Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (PDE8B), a cAMP-specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in a cohort of patients with adrenal tumours.**

Rothenbuhler A, Horvath A, Libé R, Faucz FR, Fratticci A, Raffin Sanson ML, Vezzosi D, Azevedo M, Levy I, Almeida MQ, Lodish M, Nesterova M, Bertherat J, Stratakis CA. Clin Endocrinol (Oxf). 2012, 77(2):195-9

Received: 19-Sep-2011  
Returned for Revision: 05-Oct-2011  
Finally Revised: 09-Feb-2012  
Accepted: 09-Feb-2012

**Identification of novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (*PDE8B*), a  
cAMP specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, in  
a cohort of patients with adrenal tumors**

*Anya Rothenbuhler*<sup>1\*</sup>, *Anelia Horvath*<sup>1\*</sup>, *Rossella Libé*<sup>2-5</sup>, *Fabio Rueda Faucz*<sup>1</sup>, *Amato Fratticci*<sup>2-3</sup>, *Marie Laure Raffin Sanson*<sup>2-3,6</sup>, *Delphine Vezzosi*<sup>2-3</sup>, *Monalisa Azevedo*<sup>1</sup>, *Isaak Levi*<sup>1</sup>, *Madson Q Almeida*<sup>1</sup>, *Maya Lodish*<sup>1</sup>, *Maria Nesterova*<sup>1</sup>, *Jérôme Bertherat*<sup>2-5</sup>  
and *Constantine A Stratakis*<sup>1</sup>.

\*A.R. and A.H. contributed equally to this work

- (1) Section on Endocrinology and Genetics and Pediatric Endocrinology Training Program, both at the Program on Developmental Endocrinology and Genetics, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892
- (2) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1016, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8104, Institut Cochin, Department of Endocrinology, Metabolism and Cancer, 75014 Paris, France
- (3) Université Paris Descartes, 75006 Paris, France
- (4) Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Cochin, Department of Endocrinology, Center for Rare Adrenal Diseases
- (5) INCa Comete Network for Adrenal cancers
- (6) Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Ambroise Paré, Department, Boulogne sur Seine and University of Versailles St Quentin, France

**Abbreviated title:** *PDE8B* variants in adrenal tumors

**Key terms:** *PDE8B* variants, adrenal tumors, cAMP signalling pathway

**Corresponding author and request for reprints:**

Dr Constantine A Stratakis  
Section on Endocrinology and Genetics and Pediatric Endocrinology Training Program, PDEGEN,  
NICHD, NIH, Building 10, CRC, Room I-1330, 10 Center Drive, MSC 1103, Bethesda, Maryland  
20892-1103, USA. Phone: +1 301 4964686; Fax: +1 301 4020574  
E-mail address: stratakac@mail.nih.gov

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04366.x  
© 2012 Blackwell Publishing Ltd

**Grants and fellowships:** This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR06-MRAR-007 and ANR08-GENOPAT-002) and supported, in part, by the *Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development intramural National Institutes of Health Project Z01-HD-000642-04 (to C.A.S.)

**Disclosure summary:** authors have no potential conflicts of interest

**Precis:** novel genetic variants in phosphodiesterase 8B (*PDE8B*), a cAMP specific phosphodiesterase highly expressed in the adrenal cortex, may contribute to predisposition of adrenocortical tumors.

## Summary

**Background:** Genetic aberrations in various components of cAMP signalling pathway predispose to endocrine tumors. Growing evidence has shown that mutations in the phosphodiesterases (PDEs) are involved in the predisposition to adrenocortical neoplastic conditions.

**Objective:** Screen for genetic variations in *PDE8B* among patients with different types of adrenocortical tumors.

**Design and Subjects:** Case-control study followed by functional analyses. 216 unrelated patients with different types of adrenocortical tumors and 192 healthy control individuals.

**Methods:** Bi-directional Sanger sequencing, *in vitro* cell line transfection, *in silico* modelling.

**Results:** Nine different *PDE8B* sequence changes, 6 novel and 3 previously reported, were identified in our patients and controls. Two of the variations, seen only in the patient group, showed significant potential to impair protein function, both *in vitro* and *in silico*.

**Conclusion:** *PDE8B* is another gene in which variations may contribute to predisposition of adrenocortical tumors.

## Introduction

Genetic aberrations in various components of the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) signalling pathway have been found to predispose to different types of adrenocortical tumors. By regulating cAMP degradation, phosphodiesterases (PDEs) play a critical role in maintaining its intracellular levels and thus control multiple instants of the signal transduction.

Among the numerous phosphodiesterases, PDE8B is known to hydrolyze cAMP with the highest affinity, and *PDE8B* mutations have been recently implicated in adrenal tumorigenesis.<sup>1-3</sup> Several lines of studies further support the essential role of PDE8B for normal adrenal functioning and suggest it as another key molecule in predisposition to adrenocortical neoplasms. First, *PDE8B* is highly expressed in the adrenal gland where it functions as a major regulator of steroidogenesis.<sup>2,3</sup> *Pde8b* knockout mouse models have demonstrated significantly higher corticosterone levels; shRNA silencing of the *Pde8b* leads to increased corticosterone synthesis in an adrenal cell line.<sup>3</sup> Next, another cAMP-hydrolyzing phosphodiesterase, PDE11A, has been recently found mutant in adrenocortical and other endocrine tumors, including testicular germ cell tumors (TGCT) and prostate cancer (PCa).<sup>4-7</sup> The *PDE8B* locus had the second highest linkage score (after the *PDE11A* locus) in a genome-wide association (WGA) study of patients with early onset bilateral adrenocortical hyperplasia and Cushing syndrome.<sup>4</sup> Finally, a severe case of adrenocortical hyperplasia and cortisol hypersecretion leading to Cushing syndrome due to inactivating *PDE8B* mutation has been reported.<sup>1</sup> Herein, we report two novel damaging *PDE8B* genetic variations in patients with adrenocortical tumors. Our data support the notion that PDE8B, a key cAMP-specific PDE, may play a role in predisposition to adrenocortical tumors.

## Subjects and methods

### Subjects' selection

The institutional review boards of the participating research centres - NIH, Bethesda, MD, USA and Hôpital Cochin, Paris, France - have approved the genetic and clinical analyses of all the patients and controls included in the study. All study participants signed informed consent for genetic testing and for the analysis of the collected data. 216 patients with adrenocortical tumors were included in our study: 84 patients with bilateral primary pigmented adrenal disease (PPNAD), 54 patients with ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH), 50 patients with secreting adrenocortical adenomas (40 cortisol producing and 10 aldosteron producing), 10 patients with non secreting tumors and 18 with adrenocortical carcinoma (ACC). Prior to the study, all patients or tumor tissue were tested and found negative for mutations in *PRKARIA*, *PDE11A* and *GNAS* - the three genes from the cAMP signalling pathway that have been associated with adrenocortical tumors.

A control group of 192 healthy individuals with no personal or family history of endocrine tumor were recruited by Cochin Hospital, Paris, France, as part of a clinical protocol that studies the genetic predisposition to endocrine tumors. These individuals were specifically examined by a senior endocrinologist to exclude any clinical signs suggestive of a genetic syndrome or endocrine tumor.

### Sequencing analysis

The *PDE8B* coding regions and the exon-intron junctions of the above described patients and controls were analyzed by classical bi-directional Sanger sequencing on germline DNA. In the *PDE8B* mutation carriers, tumor DNA, when available, was sequenced to look for possible Loss of heterozygosity in the locus of identified genetic change, as previously described.<sup>2</sup> All the identified variations were confirmed on a second independent DNA aliquot.



### **RNA extraction**

The total RNA extracted from tumor was treated with DNase and further purified with the RNeasy Mini kit and RNase-free DNase Set (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

### **Functional studies**

For transfection experiments, the *PDE8B* open reading frame was cloned into pCR3.1, and the missense mutations (R121H, H391A, P660L, V697I and D755N) were introduced by overlapping PCR, as described previously.<sup>5</sup> The human embryonic kidney (HEK) 293 cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. Cells were transfected with 6 µg of plasmid DNA expressing either the wild-type (WT) or the mutated form of PDE8B, harvested 48 hours after the transfection, and subjected to cAMP level and PDE activity assays as previously described.<sup>6</sup> All functional studies were done in triplicates, and an average was calculated for each value; each experiment was repeated at least twice.

### **Reverse Transcribed Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)**

Purified RNA was reverse transcribed with SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and amplified using DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finnzymes) by PCR. Nucleotide sequences of the specific primers used were: 12F: 5'-GGAAAGAGTCCATTGACGTG-3'; 13F: 5'-GGATCCACTCCATGACCATC-3'; 14R: 5'-CAGGCCTCCAACAAGATCAC-3'; 16R: 5'-GGCATTGCAAGGTGACTGTG-3'. These primer pairs yielded PCR products of 370bp (12F-16R), of 284 bp (12F-14R), of 283 bp (13F-16R), and of 197 bp (13F-14R), respectively.

All amplified samples were examined by agarose gel electrophoresis to confirm successful amplification of each exon. Direct sequencing of the purified fragments was then done using the Genetic Sequencer ABI3100 Applied Biosystems apparatus.

### ***In silico* analyses**

Three independent *in silico* software tools were utilized to predict the pathogenic potential of the identified missense variants in *PDE8B*: Polyphen2 (<http://coot.embl.de/polyphen>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) and SeattleSeqAnnotation (<http://gvs.gs.washington.edu/SeattleSeqAnnotation/>).<sup>8,9</sup> The potential effect of the splice variant was modeled using the SplicePort online prediction tool (<http://spliceport.cs.umd.edu/>).<sup>10</sup>

### **Results**

We identified six *PDE8B* coding sequence alterations in eight unrelated individuals from our cohort of 216 patients with adrenal tumors; one individual presented with two different mutations. All mutations were found in a heterozygote state on germline DNA (Table 1). Five of the variations were missense and resulted in aminoacid substitutions: c.362G>A/p.R121H, c.1171C>A/p.H391A, c.1979C>T/p.P660L, c.2089G>A/p.V697I, and c.2263G>T/p.D755N, and one was a splice variant located five nucleotides upstream of exon 14 (c.1365-5g/a). Two of the five missense variants (R121H and D755N) were previously described in the public databases, and three were novel. Three additional *PDE8B* sequence variations were identified in the control group – one reported polymorphic variant (c.1267A>G/p.I423V), and 2 previously unknown missense substitutions (c.971G>A/p.R324Q and c.1032G>A/p.V344I), each of the three present in one control individual in a heterozygote state. Of the six *PDE8B* variants identified in the patients with adrenal tumors, only one, R121H, was seen among the controls; it was present in 4 out of the 192 unrelated control individuals studied. The total

allelic frequency of variant *PDE8B* alleles was comparable in the patients with adrenocortical tumors and the controls (1.85% vs 1.56%, respectively).

Three independent *in silico* models (Polyphen2, SIFT and SeattleSeqAnnotation) predicted mild or no effect on the PDE8B protein function for the two known (R121H and D755N) and one of the novel missense variants (V697I) in the patient group, as well as for all three missense substitutions found only in the control group (R324Q, V344I and I423V). The H391A and P660L mutations that were seen only in the patient group were predicted respectively as possibly damaging and probably damaging. The splice site variant modelling (SplicePort) predicted a 20% decrease in the probability of the mutant junction sequence to serve as a donor site (Table 1).

Seven of the mutation-positive individuals carried a single *PDE8B* change, and one patient – with ACC - presented with 2 mutations: R121H and c.1365 -5 g/a. Apart from this patient, the R121H variant was identified in one more patient with an PPNAD. This patient did not have a *PRKARIA* mutation. The c.1365-5g/a splice variation was seen in two more patients – one with AIMAH, and one with a cortisol-producing adrenocortical adenoma. The reported missense variation, D755N, and the novel H391A were each seen in one female with AIMAH, the P660L variant was identified in a male patient with a non-secreting adrenal adenoma and the V697I variant in a patient with a cortisol-producing adenoma.

To look for potential loss of heterozygosity, we sequenced 4 tumor DNAs that were available - 2 cortisol-producing adenomas (one with the c.1365 -5 g/a splice site variant and one with the V697I substitution), one AIMAH samples (with the c.1365 -5 g/a splice site variant) and one ACC (with both R121H and V697 mutations). Loss of the wild type allele was detected in the two cortisol-producing adenomas; the AIMAH and ACC retained both the normal and the mutant PDE8B alleles.

To assess the potential effect on the PDE8B protein function, transfection experiments with expression vectors harbouring the R121H, H391A, P660L, V697I and D755N substitutions were conducted on

HEK293 cell line (Fig. 1, A and B). A statistically significant decrease in PDE activity and an increase in cAMP levels relative to the WT were measured in the H391A and P660L transfected cells, indicating a reduced ability of the mutant PDE8B protein to degrade cAMP. The most significant reduction of PDE activity and increase in cAMP levels was observed after transfection with the P660L-harboring construct. This observation is concordant with the *in silico* prediction of a high potential for the P660L substitution to impair the protein function.

In order to determine if alternative splice isoforms were caused by the intronic variant (c.1365-5 g/a) we performed RT-PCR in 2 tumor samples harboring the splice site variant and 3 WT tumor samples, as controls. No difference in gel migration of PCR product between WT and mutated tumors were detected. By sequencing the PCR products, no alternative cDNA species were found in mutated tumors (data not shown) and only the wild-type sequence was present.

## Discussion

In this study of 216 patients with adrenal tumors, we identified four novel variations affecting the coding sequence of *PDE8B*: three missense substitutions H391A, p.P660L and V697I and the c.1365-5 g/a splice variant; none of them were present among the 192 controls negative for endocrine disorders. This is the first systematic screening for *PDE8B* genetic defects in a heterogeneous cohort of patients with adrenocortical tumors, including benign and malignant, secreting and silent, unilateral and bilateral tumors, and nodular and hypertrophic adrenal lesions. In consistence with our prior findings, damaging germline *PDE8B* mutations were present in patients with adrenocortical tumors, including AIMAH, PPNAD, secreting and non-secreting adrenal adenomas, and adrenocortical carcinomas. Two novel and one reported *PDE8B* missense variants, all three benign, were seen in the control group. The frequency of *PDE8B* variant alleles was comparable among the controls and the patients. Of note, although all the individuals from the control group were carefully examined and

proven negative for any endocrine abnormality or a family history of such, no hormonal and imaging data were available for this group.

We have previously reported PDE genetic variations in individuals with mild or no obvious adrenal phenotype, likely due to the PDE redundancy.<sup>5,11</sup> From the evolutionary point of view, PDE redundancy, through compensatory action, can potentially protect the cell from possible fatal consequences of single deleterious events affecting such an essential process as the cAMP degradation.

While a significant difference in the distribution of *PDE8B* variants between the patient and control groups was not seen, a difference in the pathogenic potential of the identified variants was apparent: only the H391A and P660L variants were seen exclusively in the patients' group and these mutations showed a potential to impair the protein function, both *in silico* and *in vitro*. This observation is in line with the sometimes modest, but constant higher number of PDE variations, in patients with endocrine tumors compared to controls.<sup>5-7,11</sup> Genetic changes in another phosphodiesterase, *PDE11A*, may act as a modifying genetic factor toward the development of testicular and adrenal tumors in Carney complex patients with *PRKARIA* -inactivating mutations.<sup>12</sup>

Interestingly, the only patient who presented with two different *PDE8B* variations - the missense R121H and the splice c.1365-5 g/a – had adrenocortical carcinoma. R121H and c.1365-5 g/a are the two most frequent *PDE8B* variations in our cohort of patients and controls, and, apart from this patient, they have never been seen together, thus likely being carried by different alleles. Adrenal tumor clonal analyses have suggested a multi-step adrenocortical tumorigenesis progressing from normal to adenomatous and eventually malignant phenotype.<sup>13,14</sup> Whether or not the malignant phenotype in this patient is related to the possible lack of a wild type *PDE8B* allele in this patient is hard to say given the absence of available tissue for study.

The *PDE8B* splice variant (c.1365-5 g/a) did not lead to the generation of detectable alternative mRNA, as shown by RT-PCR and sequencing of the resulting amplified cDNA products. Such alternative mRNA was expected based on the length of exon 14 (165bp), which was predicted to be spliced out leading to an in-frame deletion and expression of shorter *PDE8B* isoform. Lack of presence of such an alternate *PDE8B* mRNA species might be due to the relatively low rate of predicted mutant *PDE8B* molecules or, nonsense-mediated decay (NMD) of the mutant mRNA.

Strong support for the involvement of impaired *PDE8B* functioning in adrenocortical tumorigenesis comes from a recent study of a knockout mouse model and shRNA silencing.<sup>3</sup> The authors demonstrated that both genetic ablation and chemical/pharmacological inhibition of *PDE8B* potentiate adrenocortical steroidogenesis and that *PDE8B* has its greatest effect under low ACTH conditions. This phenomenon is likely related to the high affinity of *PDE8B* to cAMP and implies its involvement in fine cAMP regulation; the authors demonstrated that *PDE8B* is a major regulator of one or more pools of cAMP that promote steroidogenesis, via both acute and chronic mechanisms. The link between cAMP dysregulation and adrenal tumorigenesis is well established.<sup>5,15,16</sup>

In summary, we identified two novel damaging *PDE8B* variants (H391A and P660L) in two patients with respectively AIMAH and a non-secreting adrenal tumor. These two genetic defects were absent in the control group. The presented data support the possibility that *PDE8B*, together with other genetic factors or on its own in some cases, involved in the predisposition to adrenocortical tumor formation.

## References

1. Horvath, A., Mericq, V. & Stratakis, C.A. (2008) Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *New England Journal of Medicine*, **358**, 750-752.
2. Horvath, A., Giatzakis, C., Tsang, K. *et al.* (2008) A cAMP-specific phosphodiesterase (PDE8B) that is mutated in adrenal hyperplasia is expressed widely in human and mouse tissues: a novel PDE8B isoform in human adrenal cortex. *European Journal of Human Genetics*, **16**, 1245-1253.
3. Tsai, L.C., Shimizu-Albergine M. & Beavo, J.A. (2010) The high affinity cAMP-specific phosphodiesterase 8B (PDE8B) controls steroidogenesis in the mouse adrenal gland. *Molecular Pharmacology*, **79**, 639-48.
4. Horvath, A., Boikos, S., Giatzakis, C. *et al.* (2006) A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nature Genetics*, **38**:794-800.
5. Horvath, A., Giatzakis, C., Robinson-White, A. *et al.* (2006) Adrenal hyperplasia and adenomas are associated with inhibition of phosphodiesterase 11A in carriers of PDE11A sequence variants that are frequent in the population. *Cancer Research*, **66**, 11571-11575.
6. Horvath, A., Korde, L., Greene, M.H. *et al.* (2009) Functional phosphodiesterase 11A mutations may modify the risk of familial and bilateral testicular germ cell tumors. *Cancer Research*, **69**, 5301-5306.
7. Faucz, F.R., Horvath, A., Rothenbuhler, A. *et al.* (2011) Phosphodiesterase 11A (PDE11A) genetic variants may increase susceptibility to prostatic cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **96**, 135-140.
8. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L. *et al.* (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, **7**, 248-249.
9. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P.C. (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*, **4**, 1073-1081.

10. Dogan, R.I., Getoor, L., Wilbur, W.J. *et al.* (2007) SplicePort--an interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Research*, **35**, 285-291.
11. Libe, R., Fratticci, A., Coste, J. *et al.* (2008) Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clinical Cancer Research*, **14**, 4016-4024.
12. Libe, R., Horvath, A., Vezzosi, D. *et al.* (2011) Frequent phosphodiesterase 11A gene (PDE11A) defects in patients with Carney complex (CNC) caused by PRKAR1A mutations: PDE11A may contribute to adrenal and testicular tumors in CNC as a modifier of the phenotype. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **96**, 208-214.
13. Beuschlein, F., Reincke, M., Karl, M. *et al.* (1994) Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Research*, **54**, 4927-4932.
14. Gicquel, C., Leblond-Francillard, M., Bertagna, X. *et al.* (1994) Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, **40**, 465-477.
15. Kirschner, L.S., Carney, J.A., Pack, S.D. *et al.* (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nature Genetics*, **26**, 89-92.
16. Groussin, L., Kirschner, L.S., Vincent-Dejean, C. *et al.* (2002) Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: augmented PKA signaling is associated with adrenal tumorigenesis in PPNAD. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 1433-1442.

Table 1. *PDE8B* mutations seen among the studied patients with adrenocortical tumors and in the control individuals.

Figure 1. PDE (A) and cAMP (B) activity after transfection of HEK293 cells with WT and mutant *PDE8B* expression vectors.

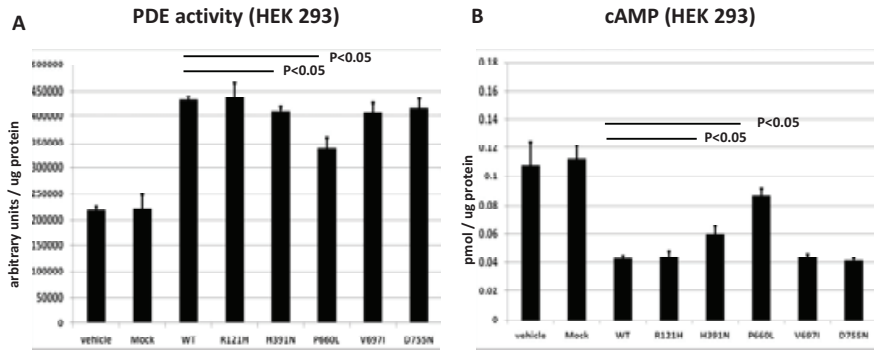


**Table 1.** PDE8B mutations seen among the studied patients with adrenocortical tumors and in control individuals

<i>PDE8B</i> mutation	Type	Novel (Y/N)	In silico prediction	Tumor type	# Patients (out of 216)	# Controls (out of 192)
c.362 G>A / p.R121H	missense	N	benign	ACC, PPNAD	2	4
c.971G>A / p.R324Q	missense	Y	benign	na	0	1
c.1032G>A / p.V344I	missense	Y	benign	na	0	1
c.1171C>A / p.H391A	missense	Y	damaging	MMAH	1	0
c.1267A>G / p.I423V	missense	N	benign	na	0	1
c.1365-5 g/a	splice	Y	20% decrease donor features	ACC, MMAH, AA (cortisol producing)	3	0
c.1979C>T / p.P660L	missense	Y	damaging	AA (non-secreting)	1	0
c.2089G>A / p.V697I	missense	Y	benign	AA (non-secreting)	1	0
c.2263G>T / p.D755N	missense	N	benign	MMAH	1	0
<b>Total</b>					9	7

ACC: adrenocortical carcinoma; PPNAD: primary pigmented nodular adrenal disease; MMAH: macronodular adrenocortical hyperplasia; AA: adrenocortical adenoma

Figure 1



## **RESUME**

La voie de l'AMPc est une voie impliquée dans la physiopathologie de nombreuses tumeurs endocrines. Les phosphodiesterases sont des enzymes clés de la voie de l'AMPc dans la mesure où elles permettent de réguler finement les niveaux intracellulaires d'AMPc en hydrolysant l'AMPc en son catabolite inactif, le 5'AMP.

L'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales est une étiologie rare de syndrome de Cushing ACTH-indépendant responsable d'un syndrome de Cushing souvent modéré contrastant avec la taille des nodules surrénaliens. Sa physiopathologie est mal connue.

Nous avons tout d'abord pu montrer dans ce travail que les variants faux sens de la phosphodiesterase 11A pouvaient participer au développement des tumeurs corticosurrénales bilatérales sécrétrices de cortisol. Ces variants sont, en effet, non seulement retrouvés de façon plus fréquente chez les patients porteurs d'une hyperplasie nodulaire comparés à des sujets contrôles, mais ils ont également des conséquences fonctionnelles in vitro.

Nous avons, dans une seconde partie, montré grâce à une étude de transcriptome ayant porté sur un groupe d'adénomes cortisoliques comparés à un groupe d'adénomes non-sécrétant que plusieurs gènes codant pour la voie de l'AMPc étaient impliqués dans la sécrétion cortisolique et que la phosphodiesterase 8 B semblait avoir un rôle prépondérant. Ces résultats ont ensuite été confirmés au niveau protéique.

**DISCIPLINE** : Biologie moléculaire et cellulaire

**MOTS-CLES** : hyperplasie macronodulaire de la surrénale, syndrome de Cushing, phosphodiesterase, transcriptome, voie de l'AMPc

Laboratoire du Pr BERTHERAT

Equipe Tumeurs endocrines et signalisation. Département Endocrinologie Métabolisme et Cancer. CNRS 8104 INSERM U567

Institut Cochin. Université Paris Descartes

24 rue du Faubourg Saint-Jacques. 75014 PARIS