

N° d'ordre: 02/2008-E/S.N

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI
BOUMEDIENNE

USTHB/ALGER

FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THESE

Présentée pour l'obtention du Diplôme de DOCTORAT d'ETAT

En : SCIENCES de la NATURE

Spécialité : Physiologie Animale

Par Yacine SOLTANI

Sujet :

REGULATION DE LA GLANDE CORTICOSURRENALIENNE
ET INFLUENCE SUR LA FONCTION GONADOTROPE

Soutenue publiquement le 24 Juin 2008 devant le jury composé de :

Boualem ASSELAH	Professeur (USTHB)	Président
Fatima HADJ BEKKOUCHE	Professeur (USTHB)	Directeur de thèse
Martine BEGEOT	Directeur de Recherche (Inserm, Lyon)	Co-Directeur de thèse
Zaïna AMIRAT	Professeur (USTHB)	Examineur
Halima DARBEIDA	Professeur (Cergy-Pontoise)	Examineur
Lakhdar GRIENE	Professeur (CPMC,Alger)	Examineur
Farida KHAMMAR	Professeur (USTHB)	Examineur

Je dédie ce travail aux personnes qui me sont les plus chères, pour leur courage et patience

***A ma femme et
mes enfants***

... A mes proches

Remerciements

*Monsieur le Professeur **Boualem Asselah**, m'a fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.*

*Je tiens à exprimer respect et remerciements à Madame le professeur **Fatima Hadj Bekkouche**, pour l'aide matérielle apportée, et pour le bénéfice de sa longue expérience scientifique durant la réalisation de ce travail au sein de l'équipe d'endocrinologie et ce, en dépit des responsabilités multiples dont elle avait la charge, et ...des difficultés.*

*A Madame le Docteur **Martine Bégeot**, j'exprime ma gratitude, d'abord pour son précieux appui au cours des péripéties administratives ayant précédé, puis suivi mon accueil dans son équipe de l'unité Inserm 855 à Laënnec (Lyon), ensuite pour l'aide scientifique riche dont j'ai pu bénéficier, et enfin pour sa compréhension durant les jours «sans», de grande nostalgie .*

*Mademoiselle le Professeur **Zaïna Amirat** à l'USTHB, a accepté de participer à ce jury. Je l'en remercie. Nul doute qu'elle ne manquera pas de nous faire bénéficier de son analyse fine sur ce travail, grâce à sa clairvoyance sur son thème privilégié,*

*Mademoiselle le Professeur **Halima Darbeida** qui n'a pas lésiné à me «booster» par ses encouragements et montré son entière disponibilité à m'apporter les acquis de son expérience scientifique à travers ses remarques pertinentes et judicieuses dont j'ai déjà bénéficié dans une précédente épreuve. Je lui exprime ma gratitude et la remercie aussi d'avoir accepté d'analyser ce travail.*

*Monsieur le Professeur **Lakhdar Griène** a spontanément, et dès notre premier contact très cordial, exprimé son enthousiasme et accepté d'examiner ce travail, et ce, malgré ses multiples charges. Je l'en remercie infiniment.*

*Madame le Professeur **Farida Khammar**, qui m'a fait l'honneur de contribuer à jalonner mes «premiers balbutiements» dans le domaine combien énigmatique de la recherche, trouvera certainement plaisir à expertiser ce travail. Je reste dans l'attente d'enregistrer ses observations et critiques, toujours constructives.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements aux collègues et étudiant(es) de l'équipe d'endocrinologie qui m'ont apporté aide et encouragements au cours de la réalisation de ce travail. Je cite Mesdames **Thérèse Gernigon, Hamoudi, Hamouli, Niboucha, Melles Amina Boubekri, Djediat et Naroun, Hassaïne, Mr Arezki Bentahar, Mr Farid Baaziz, Mr Khellouf** ...sans oublier d'avoir une pensée pour le cher et regretté Ammi Ali, **Mr Ali Chemlal**.*

*Au Docteur **Gilles Mithieux**, Directeur de l'unité Inserm 855, j'exprime ma profonde gratitude pour son accueil et son amabilité qui ont facilité mon intégration au sein de l'unité.*

*Un grand Merci au Docteur **Danielle Naville** et à **Michèle Vigier**, à **Johann** et **Julien**, pour leur disponibilité et aide appréciables . A **Armelle, Fabienne, Valérie, Anne** et **Bruno**, merci à tous pour leur contribution et amabilité, ainsi qu'à l'ambiance conviviale instaurée au sein de l'Unité 855.*

*Merci à mes enfants **Radja, Abdelaziz** et **Mohamed** pour leur aide dans le répertoire des références bibliographiques et la phase de reproduction de ce mémoire.*

Abréviations

Agrp : Agouti related protein

BP :Androgen Binding Protein

ACTH: Adrenocorticotropin hormone

ADN_c : Adenosine Desoxyribonucleic Acid

AII : Angiotensine II

AKR1-B7 :Aldo keto reductase1-B7

ALC : Adult Leydig Cells

AMPc : Adenosine mono phosphate cyclique

AP1: Activating Protein 1

ARC : Noyau arqué de l'hypothalamus

ARNm : Adenosine Ribonucleotide messenger

ASIP :Agouti Signaling Protein

Asp⁻ Acide aspartique

ATC-1 ou ATC-7 : Adrenal Tumor Cells 1 ou 7

AVP : Arginine vasopressine

CART :Cocaine and amphetamine regulated transcripts

CBG : Corticosteroid Binding Globulin

CEH : cholesterol ester hydrolase

CLIP: corticotropin-like intermediate lobe peptide

Composé B, F, S : Corticosterone, cortisol , desoxycortisol

COS1 ou COS7 : cellules de rein de singe transformées par l'antigène T de SV40

CPE : carboxypeptidase ester

CREB: cAMP-responsive element binding protein

CRF, CRH: Corticotropin releasing Factor or Hormone ,

CRF1 et CRF2: Corticotropin releasing factor receptors 1 et 2

CSCC: cholesterol side chain cleavage

CYP11A1: cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage ou P450scc

CYP11B ou la 11 β -HSD : 11 β - hydroxystéroïde déshydrogénase

CYP11B1 : cytochrome P450 11 β -hydroxylase

CYP11B2 : cytochrome P450 aldostérone synthase

CYP21A : cytochrome P450 21-hydroxylase:

DAG: Diacyl glycerol

DAX-1 : Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on X chromosome, gene 1

DBI: Diazepam Binding Inhibitor

DHEA:Dehydroepiandrosterone

5 α -DHT : 5 α -Dihydrotestostérone

DHT-R: Dihydrotestosterone -receptor

dbAMPc: Dibutyl-AMPc

DIO : Diet induced obesity

DMEM-F12 : Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's nutrient mixture

DMH : Dorso medial hypothalamus

DOC : désoxycorticostérone

E1, E2: Oestrone, Oestradiol

EDTA :Ethyl Diamino tetra acetic acid

EIA : Enzyme ImmunoAssay

Elk : facteur de transcription de la voie MAPkinase

ERK : Extracellular signal regulated kinase

ER α , ER β : Estradiol Receptor α et β

FGD : Family glucocorticoid deficiency

hFSH: human Follicle stimulating hormone

GH: Growth hormone

GAPDH :Glyceraldehyde phosphate deshydrogenase

GFP : Green fluorescent protein

GH : La sécrétion liées à l'hormone de croissance

Gi ou Gs : sous unité G inhibitrice ou stimulatrice

GnRH :Gonadotropin releasing hormone

GPCR :récepteur couplé aux protéines G

GR : récepteurs glucocorticoïdes

GTI-7 : lignée cellulaire hypothalamique

HCG : Hormone chorionique gonadotrophine

HDL: High Density Lipoprotein

HEK: Human embryonic kidney

HEPES :(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HFRW : séquence centrale des mélanocortines : His-DPhe-Arg-Trp-NH₂.

HHS :Hypothalamus-hypophyse surrénale

HMG CoA : Hydroxy Methyl Glutaryl Coenzyme A
 HSL : Hormone sensitive lipase
 3 β - ou 11 β -HSD : 3 β - ou 11 β -Hydroxy stéroïdédéshydrogénase
 β -HT: hydroxy-tryptamine
 5HT : 5 Hydroxy Tryptamine
 IBMX : IsoButyrylMéthyl Xanthine
 IRMA: Immunoradiometric assay
 ICV : Intracérébro ventriculaire
 IGFI : Insulin-like Growth Factor-1
 IgG : Immunoglobuline G
 IL : Interleukine
 ILC : Immature Leydig cells
 IP3 : inositol triphosphate
 IRS :Insulin receptor substrate
 ITS :Insulin Transferrin selenium
 JAK: Janus kinase
 JNK : c-Jun NH2 terminal kinase ou Jun kinase
 kb , pb : kilo base, paire de base
 kDa : kiloDalton
 LC : locus ceruleus
 LDL: Low Density Lipoprotein
 LXR: liver X receptor
 L-Glu : L-glutamine
 LH: luteinizing hormone
 LHA: Lateral Hypothalamus Area
 LHRH : Luteinizing hormone releasing hormone
 β -LPH : β -lipotropine
 LPS : lipopolysaccharides
 Lys ,Arg : Lysine, Arginine
 MRAP: Melanocortin 2 Receptor Accessory Protein
 MAPK: Mitogen activating protein kinase
 MC1-R à MC5-R : Melanocortin type (1- 5) receptor
 MCRs : Melanocortin receptors
 MEKK: Mitogen activated protein kinase kinase

MEK 1/2: recombinant mitogen activated kinase kinase1/2
 mGAPDH :mouse Glyceraldehyde phosphate deshydrogense
 MKP-1 ; MAPK phosphatase-1:
 MLN64: metastatic lymph node 64
 M-MLV: Moloney murine leukemia virus
 α -MSH : α -melanocyte stimulating hormone
 NTS : Noyau du tractus solitaire
 MTH II : Melanotan II
 MW : molecular weight
 NADPH: Nicotine amide dinucléotide phosphate réduite
 NBD: NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)
 NDP- α MSH : Nle4,D-Phe7-alpha-Melanocyte Stimulating Hormone
 NE : norépinéphrine
 NF- κ B : Nuclear factor- κ B: facteur de transcription nucléaire
 NPV: Noyau para ventriculaire
 NPY : Neuropeptide Y
 OBR : récepteurs de leptine
 P, S : pénicilline, streptomycine
 P13 :Phosphate inositol 3
 PAM : peptidyl- α amidating monooxygénase
 PBR : Peripheral-type benzodiazepine receptor
 PBS: Phosphate Buffer Solution:
 PC : proconvertase
 PDE :Phosphodiesterase
 PKC , PKA : Protéine kinase A et C
 PKB/Akt: protéine kinase B/Akt
 PLC : Progeniture Leydig cells cellules mésenchymal like de progénitures
 PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate
 POMC : pro-opiomélanocortine
 PRL : prolactine
 Protéine OB: La leptine
 PVDF : Polyvinylidene fluoride
 PVN: noyau paraventriculaire
 Raf : protéine kinase cytoplasmique activée par Ras dans la voie de signalisation de MAPK.

Raf : Le gène *raf* code pour des kinases sérine /thréonine spécifiques.
 RIA : radioimmunoassay
 RNA : ribonucleic acid
 SAP : Steroïdogenesis Activator Polypeptide
 SCF : Sertoli Cell Factor
 SCP : Sterol Carrier Protein
 SCP2 : Sterol Carrier Protein2
 SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate -PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
 SF1 : Steroidogenic Factor 1
 SHBG : Sex Hormone Binding Globulin
 SNC : système nerveux central
 SOCS : Suppressors of cytokines signalling
 SR-BI : Scavenger typeB classeI
 SKF: Specific phosphodiesterase
 SHP-2: SH2 (Src-like homology 2) domain-containing protein tyrosine phosphatase
 StAR: Steroïdogenic acute regulatory protein
 STAT : Signal transducer and activators of transcription
 SVF : Sérum de veau foetal
 T/ebp , Nkx2,1 : enhanced binding protein
 T3: Tri-iodothyronine
 T4: thyroxine ou tetra-iodothyronine
 TeBG : Testosterone Binding Globulin
 TFK: trifluoromethyl ketone
 TFR : Tranferrin receptor
 TGF α , β : Transforming growth factor α , β
 TNF α : Tumor Necrosis Factor α
 TRE : élément de réponse de la partie régulatrice du gène c-fos
 TRH : Thyroid Releasing Hormone
 hTSH: human Thyroid stimulating hormone
 Trp: Tryptophane
 TVK1 : gene codant pour la MAPkinase du champignon *Trichoderma virens*
 T/ebp ou Nkx2,1: thyroid-specific enhanced binding protein
 VMH : hypothalamus ventromédian
 ZG ,ZF : zone glomérulée, fasciculée

SOMMAIRE

Abréviations

Avant propos

Introduction1

Première partie : Régulation de l'activité corticosurrénalienn: Etude des récepteurs aux mélanocortines

I- La fonction surrénalienn	4
1 -Anatomie et morphologie de la glande surrénale	4
1-1 La corticosurrénale.....	4
1-2-2 la médullo-surrénale.....	5
2- Production des stéroïdes surrénaliens	5
2-1 Le cholestérol précurseur de la biosynthèse.....	5
2-1-1 Origines du cholestérol.....	5
2-1-2 Transfert du cholestérol dans la mitochondrie	6
2-1-2-1 Sterol Carrier Protein2 (SCP2).....	6
2-1-2-2 Stéroïdogenesis Activator Polypeptide (SAP).....	7
2-1-2-3 Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR).....	7
2-1-2-4 Steroid Acute Regulatory Protein (StAR).....	7
2-2 Biosynthèse des hormones stéroïdes.....	8
3 transport plasmatique des glucocorticoïdes	10
4-Rôle physiologique des glucocorticoïdes	10
4-1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes.....	10
4-2 Mécanisme d'action des glucocorticoïdes.....	11
4-3 Inactivation du cortisol et rôle de la 11 β -HSD.....	11
4-4 Effet anti-inflammatoire et anti-allergique	12
4-5 Action apoptotique sur le thymus	12
4-6 Effet sur les glucides.....	13
4-7 Effet sur les protéines.....	13
4-8 Effet sur la mobilisation des graisses et de l'énergie.....	13

4-9 Effet sur l'eau et les électrolytes.....	14
4-10 Effet sur la prise alimentaire.....	14
4-11 Effet sur l'axe reproducteur mâle	16
5-Régulation de la stéroïdogénèse par l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale.....	16
5-1 Organisation fonctionnelle.....	17
5-2 Cascade hypothalamo-hypophysaire.....	17
5-3 L'ACTH et son récepteur.....	18
5-3-1 Le récepteur à l'ACTH (ACTHR ou MC2R).....	18
5-3-2 Caractérisation génomique du MC2R.....	18
5-3-3 Expression tissulaire du MC2R.....	19
5-3-3-1 Dans les glandes surrénales.....	19
5-3-3-2 Dans les autres tissus.....	19
5-3-4 Mécanisme d'action de l'ACTH.....	20
5-3-5 Effet de l'ACTH sur la stéroïdogénèse.....	20
5-3-5-1 Effet aigu.....	21
5-3-5-2 Effet chronique.....	21
5-3-6 Effet chronique sur la glande surrénale.....	22
5-4- Rôle des glucocorticoïdes sur la stéroïdogénèse.....	22
5-4-1 Le rétro contrôle négatif.....	22
5-4-2 Contrôle paracrine et autocrine	23
6- Régulation par d'autres facteurs physiologiques.....	23
6-1 les cytokines et l'angiotensine (AII).....	23
6-1-1 Expression des cytokines dans la glande surrénale.....	24
6-1-1-1 Les interleukines (IL-1, IL-2 et IL-6).....	24
6-1-1-2 Tumor necrosis factor (TNF α).....	24
6-1-2 Angiotensine II (AII).....	25
6-2- Régulation par les facteurs de croissance.....	25
6-2-1 IGF-1.....	25
6-2-2 TGF- β	25
7- Les facteurs de l'environnement : photopériode et saison	26

II- Les mélanocortines autres que l'ACTH, et leurs récepteurs.....	26
1- La pro-opio mélanocortine (POMC)	26
2- Synthèse des mélanocortines	27
2-1 α -MSH	28
2-2 β -MSH	28
2-3 γ -MSH	29
3- Les récepteurs aux mélanocortines	29
3-1 Le récepteur MC3-R.....	30
3-1-1 Structure du MC3-R	30
3-1-2 Expression au niveau central.....	30
3-1-3 Expression périphérique.....	31
3-1-4 Rôle physiologique du MC3R	31
3-2 Le récepteur MC4-R.....	32
3-2-1 Organisation génomique du MC4-R.....	32
3-2-2 Expression du MC4-R	33
3-2-2-1 Expression du MC4-R au cours du développement.....	33
3-2-2-2 Expression au niveau central.....	33
3-2-2-3 Expression au niveau périphérique.....	33
3-2-2-4 Rôle physiologique du MC4-R.....	34
3-3 Le récepteur MC5-R.....	34
III Les agonistes et antagonistes des récepteurs aux mélanocortines.....	35
1- Les agonistes synthétiques	35
2- Les antagonistes naturels	35
2-1 La protéine Agouti	35
2-2 L'Agrp.....	36
2-2-1 Structure du gène de l'Agrp et expression tissulaire.....	36
2-2-2 Rôle de la structure de l'Agrp.....	37
2-2-3 Sécrétion de l'Agrp.....	37
2-2-4 Interaction de l'Agrp avec le récepteur MC4-R.....	38
2-2-5 Action de l'Agrp.....	39

2-2-5-1 sur la prise alimentaire.....	39
2-2-5-2 Sur d'autres fonctions physiologiques.....	39
3- Les antagonistes synthétiques.....	39
 IV- Régulation de la stéroïdogénèse surrénalienne par le système mélanocortinergique..	40
1- Présence et rôle de MC3-R.....	40
2- Présence et rôle de MC4-R.....	41
3- Présence et rôle de MC5-R	41
4- Présence et rôle de l'Agrp.....	41
 V- Rôle d'autres hormones dans la régulation de la stéroïdogénèse surrénalienne	42
1- La leptine.....	42
1-1 Les récepteurs à la leptine.....	43
1-2 Rythme de sécrétion de la leptine.....	43
1-3 Action de la leptine sur la prise alimentaire.....	44
1-4 Obésité et résistance à la leptine.....	45
1-5 Effet de la leptine sur la stéroïdogénèse surrénalienne.....	46
1-6 Signalisation de la leptine dans la glande surrénale.....	47
2- L'insuline.....	47
2-1 Sécrétion de l'insuline.....	47
2-2 Les récepteurs à l'insuline.....	47
2-3 Action de l'insuline sur la prise alimentaire.....	48
3- Les orexines	48
3-1 Effet sur la prise alimentaire.....	49
3-2 Effet sur la glande surrénale.....	49
3-2-1 Expression surrénalienne.....	49
3-2-2 Effet sur la sécrétion des glucocorticoïdes.....	50
4- Autres peptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire.....	50
5- Contrôle de la prise alimentaire par l'axe surrénalien.....	51
5-1 La CRH ou CRF.....	51

5-2 L'ACTH	52
------------------	----

Deuxième Partie : Régulation de l'activité corticosurrénalienne et influence sur la fonction gonadotrope chez le lapin mâle

I- La fonction testiculaire	54
1- Rôle des gonadotrophines dans la maturation	54
2- Expression des récepteurs - Rôle de l'ACTH.....	54
3- Anatomie du testicule	55
3-1 Les tubes séminifères	55
3-2 le tissu interstitiel	55
4- Biosynthèse des hormones stéroïdes dans le testicule.....	56
5- Sécrétion et transport des androgènes	56
6- Mécanisme d'action des androgènes	56
7- Régulation de la synthèse et de la sécrétion des androgènes	57
7-1 Régulation hypothalamique	57
7-1-1 Par la GnRH	57
7-1-2 Par la CRH.....	57
7-2 Régulation hypophysaire	58
7-2-1 Les gonadotrophines LH et FSH	58
7-2-2 Action de la LH	58
7-2-2-1 Le récepteur à la LH.....	58
7-2-2-2 Mécanisme d'action de la LH.....	59
7-2-3 Action de la FSH.....	60
7-2-4 Action de la prolactine (PRL).....	61
7-2-5 Action des hormones thyroïdiennes.....	61
7-3 Régulation par l'axe hypophyso-surrénalien	62
7-3-1 Action sur la sécrétion de la GnRH.....	62
7-3-2- Action sur la sécrétion des gonadotrophines.....	62
7-3-3 Les récepteurs LH/HCG surrénaliens.....	63
7-3-4 Les récepteurs GR des cellules de Leydig.	63
7-3-5 L'activité 11 β -HSD dans les cellules de Leydig.....	65

7-3-6 Les glucocorticoïdes et l'apoptose des cellules de Leydig.....	66
7-4 La nutrition.....	66
7-5 La leptine.....	67
7-6 L'insuline.....	68
7-7 L'Agrp	69
7-8 Régulation par le rétrocontrôle négatif des androgènes.....	69
7-8-1 Au niveau hypothalamique.....	69
7-8-2 Au niveau hypophysaire	70
7-9 Régulation autocrine	70
7-9-1 CRF et la sérotonine testiculaires.....	70
7-9-2 Les oestrogènes.....	71
7-9-3 L'Arginine vasopressine (AVP).....	71
7-10 Régulation paracrine.....	72
7-10-1 Les androgènes.....	72
7-10-2 Les dérivés de la POMC.....	72
7-10-3 LH-RH like factor.....	72
7-10-4 L'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1).....	73
7-10-5 Transforming Growth Factor (TGF α et β).....	73
7-10-6 L'inhibine.....	73
7-10-7 L'activine.....	74
7-10-8 La follistatine.....	74
7-10-9 Sertoli Cell Factor (SCF).....	74
7-10-10 Les cytokines.....	74
7-10-10-1 L'Interleukine-1 (IL-1).....	75
7-10-10-2 Tumor Necrosis Factor α (TNF α).....	75
7-10-11 L'adrénomédulline	75
7-10-12 Hepatic Growth Factor (HGF).....	76
8- Les facteurs de l'environnement	76
8-1 Photopériode et variations saisonnières	76
8-2 L'alimentation en relation avec la photopériode.....	77

II - Quelques pathologies résultant d'un dysfonctionnement surrénalien	77
1 - Le syndrome de Cushing.....	78
2- La déficience familiale en glucocorticoïdes (FGD).....	78
3- L'hyperplasie surrénalienne congénitale.....	78
4 - L'obésité, le syndrome métabolique et la 11 β -HSD-I	79

MATERIEL ET METHODES

Première partie

1- Matériel biologique

1-1 Les cellules tumorales surrénaliennes de souris ATC7-L (Adrenal tumor cells 7-left).....	81
1-2 Etude <i>in vivo</i> sur les surrénales de souris.....	81

2- Méthodes

2-1 Culture de la lignée cellulaire ATC7-L.....	82
2-1-1 Milieu de culture	82
2-1-2 Conditions de culture.....	83
2-1-3 Traitements des cellules ATC7-L.....	83
2-2 Extraction des protéines et analyse par Western blot	84
2-3 Extraction des ARN et RT-PCR	85
2-4 Dosages immunoenzymatiques.....	86
2-4-1 L'AgRP.....	86
2-4-2 La corticostérone.....	87

Deuxième partie

1- Matériel animal.....

1-1 Provenance et caractéristiques des animaux	88
1-2 Conditions d'élevage.....	88

2- Méthodes.....

2-1 Administration des substances.....	89
2-1-1 le cortrosyn	89

2-1-2 Le sérum physiologique (NaCl 0,9%).....	89
2-1-3 La dexaméthasone.....	89
2-1-4 Prélèvements des échantillons biologiques.....	90
2-2 Dosages hormonaux.....	91
2-2-1 le cortisol	91
2-2-2 La testostérone.....	91
2-2-3 L'ACTH	91
2-2-4 LH et FSH	92
3- calculs statistiques.....	92

RESULTATS

Première partie

Publication n°1 et résumé.....	93
Publication n°2 et résumé	94
1- Expression des ARNm récepteurs MC3-R et MC4-R dans la lignée cellulaire ATC7-L.....	95
2- Expression de l'ARNm codant l'Agrp dans la lignée ATC7-L.....	95
3- Régulation de l'expression du récepteur MC2-R dans la lignée ATC7-L.....	97
4- Régulation de l'expression du récepteur MC4-R dans la lignée ATC7-L.....	98
5- Régulation hormonale de la sécrétion d'Agrp dans la lignée cellulaire ATC7-L.....	100
6- Expression de MC2-R dans la glande surrénale de souris DIO.....	101
7- Expression de MC4-R dans la glande surrénale de souris DIO.....	102
8- Expression de l'ARNm codant pour l'Agrp dans la surrénale des souris DIO.....	103

Deuxième partie

Publication n°3 et résumé.....	104
Communications internationales	105
1 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux d'ACTH plasmatique.....	106
2 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de cortisol plasmatique.....	107
3 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de cortisol	

dans la glande surrénale.....	109
4 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de testostérone plasmatique.....	110
5 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de testostérone testiculaire.....	112
6 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de testostérone surrénalienne.....	113
7 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de LH plasmatique.....	115
8 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de FSH plasmatique.....	116
Discussion première partie.....	118
Conclusion	121
Discussion Deuxième partie.....	122
Conclusion.....	125
Perspectives	126
Bibliographie.....	127
Annexes	162

AVANT PROPOS

Le rôle prépondérant de la glande corticosurrénale dans divers processus physiologiques et dans la régulation de l'homéostasie générale de l'organisme n'est plus à démontrer. En effet, l'activation de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale à travers la sécrétion de ses principales hormones, la CRH, l'ACTH et des glucocorticoïdes conduit à des changements périphériques et comportementaux qui augmentent la capacité de l'organisme à corriger son homéostasie, lui permettant ainsi de s'adapter et d'améliorer ses chances de survie et celles de l'espèce. Les glucocorticoïdes surrénaliens sont des facteurs clé qui interviennent dans la régulation physiologique de diverses fonctions végétatives et de plaisir telles que la prise alimentaire et la fonction de reproduction, soit dans les conditions normales ou durant la réponse à des stimuli de stress. Cependant, en dépit des nombreuses études rapportées par la littérature, il reste à éclaircir les mécanismes de régulation de ces processus physiologiques qui demeurent tributaires de la régulation de la stéroïdogénèse dans la glande surrénale, dans des situations normales ou de déviations pathologiques consécutives à une perturbation de cette biosynthèse.

Ainsi le syndrome de Cushing imputé à une surproduction de cortisol, ainsi que la maladie d'Addison, la déficience familiale en glucocorticoïdes (FGD) et l'hyperplasie surrénalienne sont des pathologies liées à des défauts de régulation de cette stéroïdogénèse.

Par ailleurs, il est bien démontré le lien étroit entre le cortisol, l'obésité, le syndrome endocrine métabolique ainsi que le diabète de type 2 chez l'homme. Cet impact des glucocorticoïdes a amené certains auteurs à se questionner sur le facteur déclenchant l'obésité en tenant compte du fait que la sécrétion du cortisol est augmentée chez l'homme obèse: est ce que les perturbations de la sécrétion du cortisol ont une origine centrale, ou est ce que le métabolisme périphérique du cortisol serait le facteur primordial dans le déclenchement de l'obésité ? En plus de l'effet permissif des glucocorticoïdes au niveau central, beaucoup de données récentes de la littérature s'accordent pour avancer que la surexpression de l'activité réductase de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 (11 β -HSD-1) notamment au niveau du tissu adipeux et du foie, est responsable de l'excès de cortisol constaté chez les sujets obèses ou atteints du syndrome métabolique. D'après les estimations mondiales de l'OMS jusqu'en 2005, environ 1,6 milliard d'adultes (âgés de 15 ans et plus) avaient un surpoids, et au moins 400 millions étaient obèses, et en 2015 il est prévu 2,3 milliards d'adultes en surpoids et 700 millions d'obèses. En Algérie près de la moitié de la population algérienne présente une obésité: 32,6% accusent un surpoids, 15,1% ont un excès pondéral

franc et 1,2% souffrent d'une obésité morbide (étude statistique publiée en décembre 2003 par Z. Kemali dans la revue Santé Maghreb). Actuellement 80 firmes pharmaceutiques et organismes à travers le monde s'intéressent à développer une approche thérapeutique à l'obésité et au diabète de type 2 basées sur la recherche d'inhibiteurs efficaces de la 11 β -HSD-I.

D'autre part, l'effet «anti-reproducteur» des glucocorticoïdes se traduit chez le mâle par une inhibition de la biosynthèse testiculaire de la testostérone, principal stéroïde sexuel. Le contact prolongé des glucocorticoïdes (le cortisol chez l'homme, ou la corticostérone chez les rongeurs) avec les cellules de Leydig peut induire le phénomène d'apoptose de ces cellules. L'ensemble de ces données ont conforté l'idée et l'intérêt que j'ai eu à choisir l'étude de la régulation de la fonction corticosurrénalienne liée d'une part, à la prise alimentaire et d'autre part, à la fonction gonadotrope chez le mâle.

Ce travail qui s'inscrit dans le cadre de projets de recherche de l'équipe d'endocrinologie avec le laboratoire L-BPO et avec l'ANDRU (Agence Nationale de Développement de la Recherche Universitaire), m'a permis de préparer cette thèse de Doctorat en deux étapes. La première, au sein de l'équipe d'endocrinologie de la faculté des sciences biologiques de l'USTHB sur le thème «influence de l'axe corticotrope sur la fonction de reproduction chez le lapin mâle », avec le suivi scientifique de Madame le Professeur Fatima Hadj Bekkouche, directeur de thèse. Afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de régulation de la stéroïdogénèse de cette glande par des techniques de biologie moléculaire, j'ai saisi l'opportunité offerte par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour solliciter l'octroi d'une bourse doctorale de 18 mois. Ceci m'a permis de choisir une des approches scientifiques suggérées par Madame le Docteur Martine Bégeot, co-directeur de thèse, et qui fait partie des thèmes développés par son équipe à l'unité Inserm 855 (ex U449) à la faculté de médecine de Laënnec (Lyon). Cette approche est intitulée «régulation de la stéroïdogénèse surrénalienne par les récepteurs aux mélanocortines de type 2, 3 et 4. Influence des hormones métaboliques». Compte tenu de contraintes familiales ma présence effective au laboratoire a duré 13 mois, au cours desquels j'ai pu bénéficier du contact avec l'expérience scientifique riche du Docteur Martine Bégeot, comme j'ai pu aussi apprécier son humilité et sa modestie.

Je souhaite que les résultats de ces 2 études contribuent à mieux éclaircir le rôle déterminant de la glande corticosurrénale à l'échelle périphérique en corrélation avec d'autres tissus, dans le contrôle de deux fonctions physiologiques importantes que sont la prise alimentaire et la fonction gonadotrope chez le mâle.

Introduction

Introduction

La glande surrénale régule un certain nombre de fonctions physiologiques essentielles dans les organismes adultes à travers la sécrétion de stéroïdes : les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes et les hormone sexuelles, ainsi que de catécholamines. Les glucocorticoïdes surrénaliens sont des hormones clés qui interviennent dans la régulation physiologique de diverses fonctions végétatives de survie telles que la prise alimentaire et la fonction de reproduction, soit dans les conditions normales ou au cours de la réponse à des stimuli de stress. La biosynthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes par la zone fasciculée du cortex surrénalien est régulée par l'hormone hypophysaire, l'ACTH, qui se lie à son récepteur membranaire (ACTH-R ou MC2-R) et déclenche une cascade de réactions à travers les voies AMPc et PKA pour stimuler l'expression et la synthèse des enzymes de la stéroïdogénèse (Penhoat *et al.*,1989). L'ACTH qui dérive du précurseur des peptides mélanocortinergiques, la pro-opiomélanocortine (POMC), est constituée de 39 résidus d'acides aminés et montre une parfaite homologie de séquence de ses 13 premiers acides aminés avec celle de α -MSH (**Fig.1**). Les peptides de la POMC α , β et γ -Melanocyte stimulating hormone (α , β , et γ -MSH) exercent leurs effets biologiques sur les cellules cibles via les cinq récepteurs aux mélanocortines MC1-R à MC5-R. α -MSH et ses analogues sont des agonistes qui agissent à travers les récepteurs MC3-R et MC4-R (Poggioli *et al.*,1986; Murphy *et al.*,2000). L'Agouti-related protein (Agrp) est un autre composant du système mélanocortinergique exprimé dans les noyaux hypothalamiques, en particulier le noyau arqué qui est un antagoniste présentant une forte affinité pour les récepteurs MC3-R et MC4-R. La glande surrénale est le deuxième tissu après l'hypothalamus qui exprime fortement l'ARNm et la protéine Agrp (Ollmann *et al.*,1997; Bicknell *et al.*,2000; Shutter *et al.*,1997; Dhillo *et al.*,2003) et la sécrète dans la circulation (Li *et al.*,2000). Il est également démontré que l'Agrp inhibe la stéroïdogénèse surrénalienne *in vitro* (Doghman *et al.*, 2004; 2005).

Les récepteurs MC3-R et MC4-R qui sont impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique (Fan *et al.*,1997) sont aussi exprimés dans la glande surrénale. L'ARNm codant pour MC3-R est détecté dans la surrénale de rat (Dhillo *et al.*,2003) et de poulet (Takeuchi *et al.*,1999) et dans la lignée surrénalienne humaine H295-R, mais pas dans le tissu surrénalien humain normal (Doghman *et al.*,2004). L'expression de l'ARNm de MC4-R a été également démontrée dans la surrénale de rat (Dhillo *et al.*,2003) et dans les cellules H295-R et les cellules surrénaliennes bovines en culture (Doghman *et al.*, 2004).

L'augmentation de la production de cortisol est observée après une stimulation aigue (2h) ou chronique (24h) des cellules surrénaliennes bovines avec NDP- α MSH qui est un puissant analogue synthétique de l' α -MSH, alors que l'Agrp inhibe la stéroïdogénèse surrénalienne (Doghman *et al.*, 2004; 2005); cela prouve que les récepteurs MC3-R et/ou MC4-R sont stimulés par α -MSH et que l'Agrp pourrait antagoniser son effet (Doghman *et al.*, 2007).

D'autre part, il a été montré que l'Agrp stimule aussi l'expression de l'ARNm de la leptine dans les cellules surrénaliennes tumorales Y1 et NCI-H295R (Charbonneau *et al.*, 2004) et que la leptine inhibe la stéroïdogénèse dans la glande surrénale (Bornstein *et al.*, 1997; Pralong *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que des mécanismes de régulation sont mis en place afin de contrôler la stéroïdogénèse par d'autres voies que celles qui passent par l'activation classique de MC2-R par l'ACTH. Cependant la régulation de ce système mélanocortinergique alternatif dans la surrénale reste inconnu (**Fig.2**).

Dans la première partie de ce travail, nous nous proposons d'étudier la régulation de l'expression des récepteurs aux mélanocortines et la sécrétion de l'Agrp par plusieurs hormones intervenant soit dans la stéroïdogénèse, soit dans l'homéostasie énergétique telles que la leptine et l'insuline en utilisant la lignée de cellules tumorales surrénaliennes de souris ATC7-L. Cette lignée a toutes les caractéristiques des cellules surrénaliennes et produit de la corticostérone dans les conditions basales et sous stimulation par l'ACTH (Sahut-Barnola *et al.*, 2000; Ragazzon *et al.*, 2006) contrairement aux autres cellules tumorales. Nous compléterons cette étude par des résultats obtenus sur des surrénales prélevées sur des souris contrôles ou nourries avec un régime riche en lipides induisant l'obésité (DIO) et qui montrent une résistance à l'insuline et à la leptine (Moraes *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il existe une relation directe entre l'état nutritionnel et la sécrétion des gonadotrophines chez les mâles puisque une nutrition améliorée ou une malnutrition influencent la fréquence des pulses de LH (Blache *et al.*, 2002), alors qu'une privation de nourriture inhibe le pulse générateur de GnRH, la fréquence des pulses de LH et la stéroïdogénèse testiculaire (Brito *et al.*, 2007). De même que les systèmes de reproduction et de la croissance sont fortement inhibés par les différentes composantes de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Ainsi, la CRH supprime la sécrétion de GnRH par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus (ARC), et les glucocorticoïdes exercent un effet inhibiteur au niveau des neurones du GnRH, des cellules gonadotropes sécrétant LH et FSH ainsi qu'au niveau des gonades (Chrousos *et al.*, 1998). La question de savoir si les glucocorticoïdes affectent la fonction testiculaire directement en réagissant avec les cellules de Leydig, ou par

une interaction entre l'ACTH et les cellules de Leydig n'est toujours pas élucidée. Alors qu'il existe des données prouvant un mécanisme indirect LH-dépendant (Welsh *et al.*,1982; Charpenet *et al.*,1982; Lalau *et al.*,1990; Briski *et al.*,1995), plusieurs travaux ont démontré une influence directe des glucocorticoïdes sur les cellules de Leydig (**Fig.3**). Des études *in vitro* confirment l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur la stéroïdogénèse testiculaire (Bambino et Hsueh,1981; Welsh *et al.*,1982; Hales et Payne, 1989; Srivastava *et al.*,1993). La sécrétion des glucocorticoïdes elle-même est soumise à une régulation à travers la fonctionnalité des récepteurs GR (Spiga *et al.*,2007; 2008). Il apparaît aussi que l'ACTH inhibe la sécrétion hypophysaire de LH chez les ovins *in vivo* (Fuquay et Moberg, 1983) et *in vitro* (Moberg,1984; Matteri et Watson,1986), alors qu'elle stimule directement la sécrétion de testostérone *in vivo* chez le lapin (Pitzel *et al.*,1984) et *in vitro* par le testicule de lapin et de porc, mais elle n'a pas d'effet sur celui du cobaye, du hamster, du rat ou du chien (Juniewicz *et al.*,1988). L'expression du récepteur MC2R spécifique à l'ACTH dans les testicules a été rapportée (O'Shaughnessy *et al.*, 2003; Nimura *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 2007), avec un effet direct de l'ACTH sur les testicules fœtaux de rat (O'Shaughnessy *et al.*, 2003). Par ailleurs chez le rat, la dexaméthasone diminue la testostérone *in vitro* (Aguilar *et al.*, 1992) et *in vivo* (Tohei *et al.*,1997), alors que la testostérone ou la LH ne sont pas affectées chez le cobaye (Fenske,1997). Par contre la corticostérone et la dexaméthasone diminuent les taux circulants de LH et FSH. Cependant, la corticostérone n'affecte pas l'expression des ARNm codant pour les sous unités LH β et FSH β , alors que la dexaméthasone ne modifie pas l'expression de la GnRH et de LH β mais diminue celle de FSH β (Gore *et al.*,2006). Chez le lapin, une seule étude rapporte une diminution de la testostéronémie en réponse à la dexaméthasone (Lupo,1993).

De ce fait, dans la deuxième partie de notre travail il nous est apparu opportun d'aborder l'étude de l'interaction entre les fonctions corticotrope et gonadotrope chez le lapin domestique mâle adulte. L'approche consiste à estimer la réaction de l'axe hypophyso-surrénalien ainsi que celle de l'axe hypophyso-gonadique à une injection de cortrosyn (analogue synthétique de l'ACTH₁₋₂₄) et de dexaméthasone, à travers les variations cinétiques du cortisol plasmatique et surrénalien, et celles l'ACTH; ces variations seront corrélées à celles de la fonction gonadotrope, à travers l'analyse des variations de la testostérone au niveau glandulaire (testicule et surrénale) et plasmatique ainsi qu'à celles des gonadotrophines dans le plasma. Les résultats nous permettront de proposer un ou plusieurs mécanismes de régulation qui contribueraient à mieux comprendre le rôle de la glande surrénale dans le contrôle de la fonction gonadique chez le mâle.

Première Partie

Régulation de l'activité corticosurrénalienne : Etude des récepteurs aux mélanocortines

I- La fonction surrénalienne

1- Anatomie et morphologie de la glande surrénale (figure 4a et b)

Les glandes surrénales ou surrénales, sont deux glandes endocrines de forme triangulaire, localisées chez l'homme et les rongeurs aux pôles supérieurs des deux reins. Chez une espèce telle que le lapin, les surrénales sont complètement dissociées des reins et sont attachées au tissu conjonctif de la paroi dorsale, de part et d'autre de la veine cave inférieure. Les surrénales sont vascularisées de leur capsule vers la zone médullaire par des artéioles issues de l'aorte, des artères phréniques et des artères rénales. Elles sont essentiellement responsables de la gestion des situations de stress à travers la synthèse et la sécrétion de corticostéroïdes et de catécholamines.

1-1 La corticosurrénale

Les cellules de la cortico-surrénale contiennent un réticulum endoplasmique lisse développé, de nombreuses mitochondries, des vacuoles lipidiques et parfois de la lipofuchsine, un marqueur de dégénérescence. Chez les mammifères la corticosurrénale est composée de cellules séparées en zones fonctionnelles distinctes qui délimitent de l'extérieur vers l'intérieur du cortex :

- la zone glomérulée représente environ 10% du volume du cortex est située immédiatement sous la capsule et produit principalement les minéralocorticoïdes comme l'aldostérone qui est requise dans le contrôle de la concentration d'eau et d'électrolytes dans l'organisme. Ses cellules sont organisées sous forme de cordons en réseaux arrondis, ou glomérules. Son organisation est spécifique de l'espèce et on distingue des différences entre celle de l'homme, du lapin et de la souris.
- la zone fasciculée est sous-jacente à la zone glomérulée et occupe 65 à 70% du cortex. Les cellules s'organisent d'une ou deux couches sous forme de cordons parallèles et séparées par des capillaires. Dans les situations de stress ou d'états émotionnels, cette zone produit des glucocorticoïdes, principalement le cortisol chez l'homme et les primates, la corticostérone chez le rat et la souris ou le cortisol et la corticostérone chez le lapin..
- la zone réticulée représente entre 20 et 25% du cortex et synthétise les androgènes surrénaliens, essentiellement la DHEA et l'androstènedione, mais aussi de la testostérone chez l'homme mais pas chez les rongeurs. L'irrigation sanguine de ces zones s'effectue par trois petites sphères capsulaires, supérieure, moyenne et inférieure qui s'organisent en un réseau sous-capsulaire, cortical puis médullaire.

1-2 la médullo-surrénale

La médullo-surrénale est la principale source corporelle d'hormones du groupe des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) qui permet de répondre à des situations de stress ou de réactions émotionnelles. Comme son nom l'indique, elle est située dans le prolongement et en profondeur par rapport au cortex. Ses cellules appelées cellules chromaffines sont disposées en amas, ou en colonnes et entourées d'un réseau riche en capillaires.

2- Production des stéroïdes surrénaliens

La production des hormones stéroïdes surrénaliennes résulte aussi bien de la propre sensibilité de chaque zone en réponse à un sécrétagogue spécifique (angiotensine II, potassium, ACTH) qui stimulent la transcription des gènes stéroïdogènes, que de la localisation stricte des hydrolases qui catalysent les étapes terminales de la stéroïdogénèse.

En effet la production d'aldostérone est essentiellement sous le contrôle de l'angiotensine II et du potassium qui agit à travers le système messager du Ca^{++} alors que l'ACTH est le principal régulateur de la production des glucocorticoïdes dans la zone fasciculée et exerce son effet en générant l'AMP cyclique comme messenger intracellulaire.

2-1 Le cholestérol précurseur de la biosynthèse

2-1-1 Origines du cholestérol

Tous les tissus stéroïdogènes captent le cholestérol à partir des lipoprotéines plasmatiques qui transportent le cholestérol sanguin sous sa forme estérifiée, mais ont la capacité de synthétiser le cholestérol de novo à partir de l'acétate. La synthèse du cholestérol est initiée par une étape limitante catalysée par une enzyme microsomique l'HMG CoA réductase ou mévalonate NADP oxydo-réductase qui utilise 2 molécules de NADPH H^+ , et qui transforme le 3 β -hydroxy-3 β -méthyl-glutaryl-coenzyme A en mévalonate. Cette enzyme allostérique est inhibée par le produit final de biosynthèse, c'est-à-dire le cholestérol.

Dans les cellules à fonction stéroïdogène (surrénales, testicules, ovaires, tissu adipeux), les stéroïdes sont synthétisés à partir du cholestérol libre cytosolique dont une partie importante provient des lipoprotéines à faible densité (LDL) plasmatiques captées par endocytose chez l'homme et des lipoprotéines à haute densité (HDL) chez les rongeurs in vivo et in vitro (Gwynne *et al.*,1976), et l'autre partie moins importante provient de la synthèse *de novo* à partir de l'acétyl-coenzyme A. Il est transféré vers la mitochondrie par la Sterol Carrier Protein2 (SCP2) où se produit l'étape limitante de la stéroïdogénèse, la synthèse de Δ^5 -

prégnénolone. Dans les surrénales des rongeurs, la capture intracellulaire et le transfert intramitochondrial du cholestérol sont facilités respectivement par SR-BI (Scavenger receptor binding class B type I) un récepteur des HDL, et par la StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) (Stocco et Clark,1996). La majeure fraction du cholestérol est stockée comme ester de cholestérol et avant qu'il n'entre dans la voie de biosynthèse, il est hydrolysé en cholestérol libre par l'action de la cholestérol ester hydrolase (CEH).

La molécule de cholestérol étant hydrophobe, pour subir l'action de la cholesterol side chain cleavage (CSCC), elle doit franchir la barrière constituée par le milieu aqueux qui règne dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie. Etant donné que la diffusion du cholestérol dans ce milieu aqueux est extrêmement lente et ne fournit pas suffisamment de substrat pour entretenir la production des stéroïdes (Johnson *et al.*,1991), cela nécessite la synthèse de molécules protéiques qui facilitent le transfert du cholestérol à travers cette barrière pour former un « pool pré-stéroïdogénique » dans l'espace inter membranaire. Des études utilisant la cycloheximide montrent que l'inhibition de la synthèse de ces protéines bloque la synthèse des stéroïdes (Stevens *et al.*,1993).

2-1-2 Tranfert du cholestérol dans la mitochondrie

Plusieurs molécules ont été préconisées d'intervenir dans le transfert du cholestérol du cytosol vers la membrane interne de la mitochondrie telles que SCP2, SAP, PBR ou StAR.

2-1-2-1 Sterol Carrier Protein 2 (SCP2) :

C'est une protéine de 13 KDa découverte abondamment dans le foie, mais qui n'a pas des niveaux élevés dans les tissus stéroïdogènes. Il a été montré que SCP2 intervient dans le transfert du cholestérol vers la mitochondrie avec un rapport 1:1 et est capable de stimuler la production des stéroïdes dans les mitochondries isolées de surrénales (Mcnamara et Jefcoate, 1989). La co-expression de SCP2 avec la CSCC et l'adrénodoxine dans les cellules COS-7 entraîne une augmentation de la production des stéroïdes de 2,5 fois par rapport à celle observée avec les enzymes stéroïdogènes seules. Cependant la synthèse de SCP2 est régulée par l'ACTH (Trzeciak *et al.*,1987) et la stimulation des surrénales par l'ACTH n'a pas d'effet sur les niveaux de SCP2 (Van Amerongen *et al.*,1989) alors que leur traitement avec un anticorps anti-SCP2 inhibe la production des stéroïdes (Chanderbhan *et al.*, 1986).

Il n'est pas établi que SCP2 transfère effectivement le cholestérol dans les mitochondries, mais il est probable qu'elle fonctionne en maintenant le mouvement des stéroïdes dans les cellules

en support à la stéroïdogénèse en affectant l'utilisation du cholestérol dérivé des microsomes (Pfeifer *et al.*,1993). En effet, le phénotype normal et les niveaux sériques normaux en stéroïdes (testostérone, progestérone et corticostéroïdes) chez des souris ayant subi une délétion du gène SCP2 suggère que SCP2 n'est pas essentiel pour la stéroïdogénèse gonadique et surrénalienne (Seedorf *et al.*,1998) et qu'un mécanisme additionnel ou compensatoire doit exister pour le transfert du cholestérol.

2-1-2-2 Steroidogenesis Activator Polypeptide (SAP)

Il s'agit d'un peptide à de 3,2kDa, purifié à partir de cellules tumorales de Leydig (Pedersen et Brownie,1987) qui augmente dans le cas d'une stimulation trophique de nature hormonale, mais cette augmentation est empêchée en présence de cycloheximide (Pedersen,1987). Il a été démontré que des mitochondries isolées sont capables d'augmenter la production des stéroïdes 4 à 5 fois de façon dose-dépendante, indiquant que le SAP aurait un rôle dans le transfert du cholestérol dans les organites, mais ce rôle reste discuté vu que le mécanisme par lequel le SAP transporterait le cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie n'a pas été démontré de façon satisfaisante.

2-1-2-3- Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR)

PBR est une protéine de 18 kDa présente à des concentrations élevées dans la membrane externe de la mitochondrie de la plupart des cellules y compris dans les tissus stéroïdogènes (Amsterdam et Suh,1991). Le ligand endogène de PBR est le peptide Diazepam binding inhibitor (DBI) de 10kDa appelé aussi endozepine (Costa et Guidotti ,1991) . Les agonistes de PBR augmentent la production des stéroïdes dans les cellules de Leydig ou dans les cellules surrénaliennes tumorales, dans des cellules surrénaliennes en culture et dans mitochondries isolées, alors que les antagonistes de PBR inhibent la production de stéroïdes dans les cellules de Leydig stimulées par l'ACTH (Papadopoulos *et al.*, 1990). De plus l'addition de DBI à la CSCC est capable de stimuler la conversion du cholestérol en prégnénolone (Brown et Hall, 1991). L'effet stimulateur des agonistes de PBR est bien établi dans la littérature, mais le mécanisme par lequel le système DBI/PBR peut affecter le transfert du cholestérol vers la mitochondrie n'est pas clair.

2-1-2-4- Steroid Acute Regulatory Protein (StAR)

Chez l'homme le gène de StAR est localisé sur le chromosome 8p11 et la protéine est composée de 285 acides aminés. StAR est une phosphoprotéine de 37 kDa synthétisée dans le cytoplasme et transportée dans la mitochondrie où elle est clivée en une forme de 30kDa.

Le rôle essentiel et irremplaçable de StAR chez les mammifères a été suggéré pour son action à stimuler la stéroïdogénèse dans les cellules tumorales MA-10 de souris (Clark *et al.*,1994), dans les mitochondries isolées (King *et al.*, 1995), et dans les cellules transfectées (Lin *et al.*, 1995). Les sujets humains porteurs de mutations qui inactivent StAR montrent une réduction marquée de la stéroïdogénèse gonadique et surrénalienne conduisant à une accumulation du cholestérol dans les gouttelettes lipidiques et à l'hyperplasie lipoïde surrénalienne congénitale (Lin *et al.*, 1995), et la délétion du gène de StAR chez la souris se traduit par un phénotype de stéroïdogénèse perturbée et d'une accumulation de lipides dans la surrénale (Caron *et al.*,1997). Trois hypothèses ont tenté d'expliquer le mécanisme par lequel StAR médie le transfert du cholestérol vers la membrane interne de la mitochondrie, la première est que le processus de translocation sert à la formation de sites de contact entre les membranes externe et interne pour permettre au cholestérol de traverser l'espace intermembranaire suivant un gradient chimique soit que StAR fonctionne comme la plupart des autres protéines de transfert et agit à l'extérieur de la mitochondrie (Stocco, 2000). La troisième hypothèse est formulée après la caractérisation d'une protéine MLN64 (metastatic lymph node 64) qui montre 35% d'identité structurale avec StAR related lipid-transfer domain (START) (Ponting et Aravind, 1999). La cristallographie aux rayons X et le modelage moléculaire révèlent l'existence d'un tunnel hydrophobe dans le domaine MLN64 START qui permet d'accommoder la molécule de cholestérol. Une autre molécule synthétique, MENTHO, homologue N-terminal de MLN64 est aussi impliquée dans le transport du cholestérol (Alpy et Tomasetto, 2006).

Les travaux de Petrescu *et al.*,(2001) montrent que la StAR stimule de 100 fois le transfert de stérols vers la mitochondrie et augmente rapidement la formation des domaines transférables du cholestérol dans les membranes mitochondriales isolées. La StAR est 67 fois plus efficace dans le transfert du cholestérol des mitochondries de cellules stéroïdogènes MA-10 que des mitochondries de fibroblastes humains comparée à SCP2 dont l'efficacité est de 2,2 fois.

2-2 Biosynthèse des corticostéroïdes (figure 5)

Dans la mitochondrie, le cholestérol est converti en Δ^5 -prégnénolone grâce à l'action du cytochrome P450 Side chain cleavage qui possède 3 activités : 22-hydroxylase, 20 α -hydroxylase et 20-22 desmolase ou lyase; ainsi sont synthétisés successivement le 22-hydroxy-

cholestérol, le 20 α -22dihydroxycholestérol et la Δ 5-prégnénolone. Ces enzymes agissent successivement sur la chaîne latérale du cholestérol :

- Par un mécanisme de transfert d'électrons du NADPH vers une protéine Fer-soufre, l'adrénoxine grâce à une enzyme à flavoprotéine, l'adrénoxine réductase. Ces enzymes sont localisées dans la matrice mitochondriale.
- L'adrénoxine transfère ensuite ses électrons sur une forme spécifique de cytochrome P450, la cholesterol side chain-cleavage P-450 (P450_{scc}) localisée dans la face interne de la membrane interne de la mitochondrie .
- Cette chaîne de réactions aboutit à l'activation de l'oxygène qui est nécessaire à l'activité de la desmolase. Le clivage de la chaîne latérale du cholestérol en prégnénolone nécessite 3 molécules d'oxygène moléculaire et 3 molécules de NADPH. Les deux premiers sont requis pour les hydroxylations en position 20 et 22 et la troisième est indispensable pour le clivage de la liaison entre les carbones 20 et 22.

La prégnénolone produite traverse la barrière mitochondriale pour se localiser au niveau du réticulum endoplasmique où elle subira les transformations supplémentaires.

La différence zonale de production des stéroïdes est attribuée à une zone d'expression spécifique de 2 cytochromes P450 hydroxylases structurellement liés. Toutes les réactions conduisant du cholestérol à la désoxycorticostérone sont catalysées par l'action séquentielle de 3 enzymes exprimées à travers le cortex surrénalien, le cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage (P450_{scc} ou CYP11A1), la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD) et le cytochrome P450 21-hydroxylase (CYP21A) (Miller, 1987)

- Dans les surrénales humaines, de veau, de mouton et de porc, la prégnénolone est convertie par une seconde forme de cytochrome la P-450_{C17}, en 17 α -hydroxyprégnénolone.(17-OH prégnénolone)
- Les surrénales de rat, de lapin, de hamster et de cobaye ne contiennent pas la P450_{C17} et la prégnénolone est directement transformée en progestérone par la 3 β -HSD.
- Chez l'homme, la 3 β -HSD convertit la 17 α -OH prégnénolone en 17 α -OH progestérone.
- La progestérone et la 17 α -hydroxyprogestérone subissent ensuite une hydroxylation par le cytochrome P450 _{C21} et aboutit à la synthèse de la désoxycorticostérone (DOC) et du 11-désoxycortisol (S). Les hydroxylases microsomales, P450_{C17} et P450_{C21} sont réduites par NADPH via une flavoprotéine microsomale, la NADPH cytochrome P450 réductase (Hiwatashi et Ichikawa, 1979).

- L'aldostérone synthase (CYP11B2) et la 11 β -hydroxylase (CYP11B1) transforment la DOC respectivement en aldostérone dans la ZG et en corticostérone dans la ZF chez les rongeurs (Domalik *et al.*,1991), mais chez l'homme CYP11B1 transforme le 11-désoxycortisol (composé S) en cortisol. L'aldostérone synthase n'est pas exprimée dans les cellules tumorales surrénaliennes de souris ATC7-L (Raggazon *et al.*, 2006).
- La DOC et S quittent ensuite le RE et entrent dans la mitochondrie pour l'étape finale de la production des glucocorticoïdes qui est catalysée par une deuxième forme de cytochrome P450, le cytochrome P450_{11 β} ou CYP11B. Cette enzyme est également localisée dans la membrane mitochondriale interne et utilise les mêmes coenzymes réduits requis pour l'adrénoxine et l'adrénoxine réductase.
- La corticostérone (B) est le glucocorticoïde majeur chez les rongeurs et le cortisol est primordial chez l'homme. Chez le lapin F et B sont présents avec une prédominance de B alors que chez les primates la 11-désoxycortisone est essentielle. Ces étapes ont lieu dans la zone fasciculée. Chez les espèces possédant P450-17 α dans cette zone telles que l'homme, les stéroïdes en C19 comme l'androstènedione et la DHEA sont produits par l'activité de la 17,20-lyase et servent ainsi de précurseurs à la synthèse des stéroïdes sexuels par d'autres tissus. Cependant des préparations purifiées de surrénales et de testicules (Najakin *et al.*,1981) possèdent aussi bien l'activité 17 α -hydroxylase que la 17,20-lyase nécessaires respectivement pour la synthèse des glucocorticoïdes ainsi que des stéroïdes sexuels. Cela est conforté par la localisation de l'activité des deux enzymes sur la même chaîne polypeptidique à travers l'expression de l'ADNc de la P450-17 α dans les cellules COS-1 dérivées du rein de singe (Zuber *et al.*,1986).

3- Transport plasmatique des glucocorticoïdes

Les stéroïdes surrénaux se lient de manière réversible dans le plasma à des protéines de liaison et seule la fraction libre présente une activité biologique. Dans les conditions physiologiques, 80% du cortisol est lié à la transcortine ou CBG (Corticosteroid Binding Globulin) (Hammond *et al.*,1990) afin de permettre à cette hormone lipophile d'être soluble, 10% est lié à l'albumine et environ 10% du cortisol est libre. La CBG, une glycoprotéine de 32 kDa présente une forte affinité mais une faible capacité pour les glucocorticoïdes.

4- Rôle physiologique des glucocorticoïdes

4-1 Les récepteurs aux glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes exercent leurs effets à travers des récepteurs cytoplasmiques des cellules cibles (Smith et Toft, 1993). Deux types de récepteurs ont été mis en évidence dans les centres nerveux chez le rat, le récepteur de type I (GR1 ou MR) des minéralocorticoïdes qui a une affinité plus élevée pour le cortisol ($K_d \sim 0,5 \text{ nM}$) que le récepteur de type II aux glucocorticoïdes (GR) ($K_d \sim 2,5 \text{ nM}$) (Reul et de Kloet, 1985). MR contrôle le rythme circadien et basal des corticostéroïdes durant les phases de faible activité de l'axe HHS. GR est sollicité dans les phases d'activité aiguës de l'axe HHS dans la réponse au stress et à l'inflammation. Ils font partie des récepteurs nucléaires qui interviennent dans la réponse aux stéroïdes. La spécificité d'action des minéralocorticoïdes est facilitée par l'action de la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD). Les MR et GR sont des récepteurs cytoplasmiques sous forme inactive qui sont liés à un complexe protéique de la famille des heat shock protein (hsp).

4-2 Mécanisme d'action des glucocorticoïdes (figure 6)

Dans le cas du cortisol en réponse à une inflammation, celui-ci traverse la membrane plasmique par simple diffusion et se lie à son récepteur, formant le complexe hormone-récepteur. Le récepteur activé est dissocié de la protéine hsp90, puis transloqué dans le noyau où il se lie comme un monomère de manière directe ou indirecte à des facteurs de transcription AP-1 (Activating protein-1) ou NF- κ B (Nuclear factor κ B) afin d'activer la réponse appropriée à l'expression du gène responsable de l'inflammation (**figure 6**), ou bien le récepteur activé réagit sous forme de dimère avec une séquence spécifique d'ADN appelée élément de réponse aux glucocorticoïdes (ERG) en court-circuitant l'étape de liaison au premier site de transcription pour empêcher l'expression du gène responsable de l'inflammation.(2). Le dimère peut aussi induire l'expression de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B κ qui induit à son tour une interaction spécifique soit avec la mitogen-activated protein kinase (MAPK) ou phosphatase 1 (MKP-1) qui peut réguler l'activité de la sous unité p38MAPK et stabilise l'ARNm. Le glucocorticoïde peut aussi augmenter les niveaux des ribonucléases cellulaires et des protéines déstabilisant les ARNm (Adcock et Ito, 2005)

4-3 Inactivation du cortisol et rôle de la 11 β -HSD (figure 7)

La 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11 β -HSD) est une enzyme qui catalyse la conversion des formes actives des glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone) en formes inactives (cortisone et 11-déhydrocorticostérone) permettant ainsi de réguler l'accès des glucocorticoïdes à leurs récepteurs au niveau central ou périphérique. Cette enzyme montre une activité

bidirectionnelle dans les homogénats tissulaires et les préparations microsomiales, mais elle agit dans les cellules intactes essentiellement comme une 11 β -réductase. Il existe deux isoformes, la 11 β -HSDI et II.

L'activité réductrice prédomine dans la 11 β -HSD de type I humaine ou de rat (Moore *et al.*, 1995), qui est NADPH dépendante et transforme la cortisone et la 11-déhydrocorticostérone respectivement en cortisol et en corticostérone. Dans les organes tels que le foie et le poumon, la 11 β -HSD agit comme une réductase, et augmente la disponibilité de la forme active des glucocorticoïdes (Walker *et al.*, 1995). Par contre l'isoforme 11 β -HSDII est exclusivement oxydative (déshydrogénase) dans des organes comme le rein, et inactive le cortisol en le transformant en cortisone (**Figure 7**). En plus de l'homme, l'ARN et les protéines de la 11 β -HSD-I sont exprimés chez la souris, le lapin, le cobaye, le mouton, le taureau et le porc (Draper et Stewart, 2005). L'action de l'enzyme tend à diminuer la concentration du cortisol, ce qui l'empêche de se lier de manière non spécifique aux récepteurs MR des minéralocorticoïdes (Rusvai et Naray-Fejes-Toth, 1993). Cette enzyme permet ainsi de protéger certains tissus comme le rein d'une exposition prolongée au cortisol, mais aussi au niveau d'autres organes où il exerce des effets catabolisants, immunosuppresseurs, et anti-reproducteurs (Björntorp et Rosmond, 2000). Chez l'homme, le cas d'un excès apparent de minéralocorticoïdes résulte d'une déficience de l'activité 11 β -HSD oxydative, associée à une mutation du gène de la 11 β -HSDII, et qui semble être responsable de l'augmentation intracellulaire anormale en cortisol (Seckl, 1997). Les souris 11 β -HSD-I ^(-/-) incapables de convertir la déhydrocorticostérone en corticostérone conservent une activité 11 β -HSDII totale ainsi que leur fertilité (Draper et Stewart, 2005), alors que les surrénales de souris mâles déficientes en 11 β -HSD-I sont hypertrophiées suggérant une hyperplasie surrénalienne qui est compensée par la stimulation de l'axe surrénalien qui restaure un niveau de corticostérone plus élevé que celui des souris normales (Holmes *et al.*, 2001).

4-4 Effet anti-inflammatoire et anti-allergique

En cas de sécrétion excessive ou d'administration le cortisol exerce deux effets anti-inflammatoires essentiels : il bloque les étapes initiales de l'inflammation avant qu'elle ne débute en diminuant la perméabilité capillaire, et entraîne la résolution rapide de l'inflammation par un effet immunosuppresseur qui freine la multiplication des leucocytes. Les glucocorticoïdes diminuent la synthèse du TNF- α et de l'interleukine-I.

4-5 Action apoptotique sur le thymus

Les glucocorticoïdes et en particulier la dexaméthasone induisent une mort programmée ou apoptose des thymocytes immatures en induisant la synthèse d'endonucléases qui détruisent l'ADN. Ils augmentent aussi la concentration intracellulaire de calcium et inhibent la biosynthèse du cholestérol (Dupouy *et al.*,1993).

4-6 Effet sur les glucides

Les glucocorticoïdes représentés essentiellement par le cortisol sont hyperglycémisants en stimulant la néoglucogenèse à partir des acides aminés glucoformateurs issus du catabolisme des protéines, et favorisent l'accumulation de glycogène hépatique (glycogénogenèse). Ils exercent un effet permissif sur la néoglucogenèse opposé à celui de l'insuline, car ils ne suffisent pas seuls à la stimuler mais sont nécessaires pour la faire fonctionner. Au niveau périphérique comme dans les muscles striés, dans les tissus lymphoïdes ou cutanés, ils inhibent aussi le transport intracellulaire du glucose. La surrénalectomie provoque une tendance à l'hypoglycémie et une sensibilité à l'insuline (Dupouy *et al.*,1993).

4-7 Effet sur les protéines

Les glucocorticoïdes ont un effet catabolique sur les protéines de structure qui conduit à l'accumulation des acides aminés dans les muscles squelettiques, avec pour conséquence une balance azotée négative. Les acides aminés glucoformateurs sont transférés vers le foie où ils servent de substrats à la néoglucogenèse. Les glucocorticoïdes augmentent la synthèse de certaines protéines spécifiques telles que la lipomoduline qui inhibe la phospholipase A2. La libération réduite de l'acide arachidonique réduit la synthèse des prostaglandines. Par contre dans le foie, les glucocorticoïdes stimulent la synthèse des ARN et des protéines prouvant qu'ils ont un effet catabolique au niveau périphérique et anabolique au niveau hépatique. Il est montré aussi que la dexaméthasone augmente la synthèse d'enzymes comme la tyrosine amino-transférase dans le foie. Les glucocorticoïdes agissent en synergie avec le glucagon ou l'adrénaline et renforcent l'effet du glucagon sur le catabolisme des acides aminés (Dupouy *et al.*, 1993).

4-8 Effet sur la mobilisation des graisses et de l'énergie

L'excès des glucocorticoïdes stimule le catabolisme des lipides dans le tissu adipeux entraînant une augmentation de la concentration plasmatique des acides gras libres ce qui

augmente leur disponibilité pour des besoins énergétiques. Le cortisol semble aussi augmenter l'oxydation des acides gras dans les cellules. Le mécanisme par lequel le cortisol mobilise les graisses n'est pas encore élucidé. Toutefois la diminution de l'entrée du glucose dans les adipocytes a un rôle et le cortisol favoriserait l'effet de la lipase hormono-sensible à l'effet de l'ACTH et à l'hormone de croissance (GH) dans les adipocytes.

L' α -glycérophosphate qui provient de la glycolyse contribue à l'accumulation et au maintien des triglycérides dans les adipocytes et dans le cas d'une pénurie en lipides, les acides gras sont libérés. La mobilisation accrue des acides gras, associée à l'augmentation de leur oxydation dans les cellules est l'un des facteurs qui contribuent en cas de jeûne ou en situation de déficience énergétique à faire dévier le métabolisme cellulaire vers l'utilisation des acides gras aux dépens de la dégradation du glucose pour produire de l'énergie. Cependant ce processus de mobilisation est lent et nécessite plusieurs heures par rapport à l'effet similaire induit par une diminution de la décharge d'insuline, mais il constitue un important facteur de conservation des réserves de glucose et de glycogène dans l'organisme (Dupouy,1993 ; Guyton et Hall,2003). L'obésité résulte d'une expansion de la masse adipeuse par l'hypertrophie des adipocytes existants suite à l'accumulation de lipides, et la différenciation de préadipocytes (adipose stroma cells ou ASC) en adipocytes, conduisant à l'augmentation de l'indice de masse corporelle ou BMI (body mass index). Cette différenciation est modulée par l'activité de la 11 β -HSD-I qui régule les niveaux de cortisol (Tomlinson et Stewart, 2001), et l'obésité se développe lorsque cette enzyme est surexprimée, induisant une hyperproduction chronique de cortisol qui n'est pas compensée par la transformation de ce dernier par la 11 β -HSD-II en sa forme inactive, la cortisone. Chez les rongeurs, la corticostérone est inactivée en 11-déhydrocorticostérone.

4-9 Effet sur l'eau et les électrolytes

Les glucocorticoïdes favorisent la rétention d'eau et de sodium et la fuite de potassium. Ils augmentent aussi l'élimination urinaire du calcium et diminuent son absorption digestive entraînant un déficit calcique qui se traduit par une résorption de l'os et un ralentissement de sa formation conduisant à une fragilisation de la trame osseuse (ostéoporose).

4-10 Effet sur la prise alimentaire

Les glucocorticoïdes stimulent la prise alimentaire en inhibant la CRH alors qu'ils facilitent l'action du neuropeptideY (NPY) (Crespi *et al.*,2004). A de faibles concentrations la corticostérone (ou le cortisol chez l'homme) est anabolique, stimule la prise alimentaire, le développement d'une graisse normale et le stockage des protéines dans le foie (Freedman *et al.*, 1986).

Plusieurs études ont rapporté l'implication des stéroïdes surrénaliens dans le développement du syndrome métabolique pouvant entraîner une obésité viscérale ou abdominale et développer le diabète de type2 (Thomson *et al.*,2007), mais les concentrations circulantes des glucocorticoïdes restent normales dans la plupart des cas d'obésité. Ainsi chez l'homme, des augmentations chroniques des niveaux de cortisol dans le syndrome de Cushing conduisent à une obésité viscérale (Orth,1995), alors qu'une réduction du cortisol dans la maladie d'Addison entraîne une baisse du poids corporel (Oelkers,1996), mais en général l'obésité chez l'homme n'entraîne pas toujours des niveaux élevés de cortisol (Rask *et al.*,2001). Néanmoins, il a été rapporté que le mifepristone (RU486) qui est un antagoniste pharmacologique des récepteurs aux glucocorticoïdes de type 2 (GR2 ou GR) inverse l'obésité induite par un régime riche en graisse (high fat induced obesity) (Okada *et al.*,1992).

Chez les patients obèses, la sécrétion du cortisol est augmentée mais des concentrations circulantes normales, voire diminuées sont retrouvées (Rask *et al.*, 2001) ce qui pourrait être lié à un niveau de clairance accru. Cette augmentation de la sécrétion serait due soit à une stimulation chronique des facteurs centraux de régulation (Björntorp et Rosmond, 2000), soit à une diminution du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes (Jessop *et al.*,2001). L'augmentation de la clairance du cortisol est probablement consécutive à une augmentation de l'activité 5 α -réductase et à une diminution de la 11 β -HSD dans le foie (Rask *et al.*, 2002). Cependant, la plupart des études cliniques récentes attribuent la production excessive de glucocorticoïdes (cortisol) dans l'obésité et le syndrome métabolique, à une sur régulation de l'expression de la 11 β -HSD-I et préconisent comme approches thérapeutiques, l'utilisation d'inhibiteurs de la 11 β -HSD-I (Schnackenberg, 2008; Saiah, 2008; Hughes *et al.*, 2008).

Chez les rongeurs, le taux élevé de corticostérone est associée à une obésité qui peut causer le syndrome métabolique (Masuzaki *et al.*,2001) et la surrénalectomie peut inverser certains phénotypes d'obésité liés à l'absence de leptine et à une surproduction de glucocorticoïdes (Makimura *et al.*,2000). Chez la souris C57Bl/6J, le régime DIO n'entraîne pas une augmentation de glucocorticoïdes, ce qui a laissé suggérer que les glucocorticoïdes peuvent inverser l'obésité même si leur taux ne sont pas élevés (Bai et Castonguay,2001; Surwit *et*

al.,1995). Cependant chez cette souris obèse sous un régime riche en graisse, la surrénalectomie diminue la corticostérone plasmatique et augmente l'expression de l'ARN_m de la POMC dans l'hypophyse et l'hypothalamus, mais n'inverse pas le phénotype car elle ne réduit pas le poids corporel, l'adiposité ou le taux de leptine (Makimura *et al.*, 2003)

Chez le rat Zucker il a été montré que les animaux obèses se différencient des animaux minces par une hypercorticostéronémie et une plus grande activité 5 α -réductase de type 1 dans le foie, mais par une activité 11 β -HSD-I et des taux d'ARNm plus faibles, alors que l'activité 11 β HSD-I n'est pas différente dans le muscle squelettique, le tissu adipeux sous-cutané et dans la graisse omentale. L'activité 11 β -HSD-II est par contre plus élevée dans le rein des rats obèses, permettant de conclure que l'inactivation de la corticostérone dans le foie par la 5 α -réductase et dans le rein par la 11 β -HSD-II et sa réactivation dans le rein par 11 β HSD-I, augmente le taux de clairance métabolique des glucocorticoïdes et diminue leur concentration dans ces tissus, contrairement à la 11 β -HSD-I qui augmente l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes dans la graisse omentale et entretient l'obésité chez ces rats. (Livingstone *et al.*,2000). D'autre part, il a été montré que l'enzyme aldocétoréductase1B7 (AKR1B7) exerçait un effet inhibiteur sur l'adipogénèse *in vitro* sur les cellules ASC et la lignée 3T3-L1 et *in vivo* sur des souris C57BL/6J obèses suite à un régime DIO (Tirard *et al.*, 2007)

4-11 Effet sur l'axe reproducteur mâle

Le système reproducteur est directement inhibé par les composants de l'axe HHS. Cet effet est mis en évidence chez l'homme, le mouton, le chat, le singe Rhésus (Tilbrook *et al.*, 2000). Les glucocorticoïdes exercent un effet inhibiteur sur les neurones à GnRH, sur les cellules gonadotropes hypophysaires et sur les gonades et rendent les tissus cibles produisant des stéroïdes sexuels résistants à l'effet de ces hormones (Tsigos et Chrousos, 2002). Au cours de stress inflammatoires, les cytokines suppriment la fonction reproductrice en activant la sécrétion de la CRH et des peptides dérivés de la POMC, ainsi que par l'élévation des glucocorticoïdes qui inhibent la stéroïdogénèse testiculaire (Tsigos et Chrousos,2002). Le cortisol n'affecte pas la réponse de LH au GnRH chez le bélier (Fuquay et Moberg,1983) mais en présence d'oestradiol il diminue la fréquence des pulses de LH et diminue l'expression du gène codant pour le récepteur de GnRH (Tilbrook *et al.*,2000). Chez le rat, la corticostérone diminue les taux sériques de LH mais pas ceux de FSH alors que les taux d'ARNm codant pour les sous unités LH β et FSH β ne sont pas affectés et l'ARNm du GnRH est significativement réduit (Gore *et al.*,2006).

5-Régulation de la fonction surrénalienne par l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale

5-1 Organisation fonctionnelle (figures 8)

Les circuits du cerveau qui initient et maintiennent la réponse au stress sont localisés dans l'hypothalamus et dans le cortex cérébral et incluent les neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire (NPV) de l'hypothalamus qui sécrètent la corticotropin releasing hormone (CRH), l'Arginine vasopressine (AVP) et l'ocytocine, de même que le système du locus ceruleus (LC)-norépinéphrine (NE) ou système sympathique central (Tsigos et Chrousos, 1994). L'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale, avec le système sympathique médullo-surrénalien efférent, représentent les effecteurs limbiques, à travers lesquels le cerveau influence tous les organes après une exposition à des conditions stressantes. En réponse à un stress le cerveau active aussi les voies vagales efférentes et parasympathiques (Habib *et al.*, 2001). Il existe des interactions mutuelles entre 3 grandes aires qui sont les stations de stress centrales, le système mésocortical-mésolimbique qui influence, affecte et anticipe le phénomène, l'amygdale et l'hippocampe qui contrôlent l'initiation, la programmation et la fin de l'action du stress, et le noyau arqué qui intervient dans l'installation de la sensation de douleur (Gray, 1989). La CRH est une neurohormone de mammifère de 41 acides aminés isolée par Vale (Vale *et al.*, 1981), et connue comme étant le régulateur physiologique majeur de la sécrétion hypophysaire d'ACTH. De plus, elle stimule des réponses endocrines, autonomes et comportementales complémentaires liées au stress (Vale *et al.*, 1981; Turnbull et Rivier, 1997). L'AVP est un facteur qui agit de façon synergique avec la CRH pour induire la sécrétion d'ACTH; cependant l'AVP a une activité sécrétagogue faible par elle-même (Lamberts *et al.*, 1984).

5-2 - Cascade hypothalamo-hypophysaire (figure 9)

L'hypophyse qui est reliée à l'hypothalamus par la tige pituitaire et par un réseau de vaisseaux sanguins porte hypophysaire, est composée de 2 lobes anatomiquement distincts, l'hypophyse antérieure ou l'adéno-hypophyse qui répond aux stimulations provenant des hormones hypothalamiques, et l'hypophyse postérieure ou neuro-hypophyse. Chez certaines espèces telles que le rat, une partie intermédiaire intercalée entre l'adéno-hypophyse et la post-hypophyse appelée lobe intermédiaire est anatomiquement confondue avec le lobe antérieur chez l'homme. En absence de stress, l'ACTH et l'AVP sont sécrétées dans le système porte hypophysaire avec un rythme circadien et de façon pulsatile, avec une fréquence de 2 à 3

épisodes sécrétoires par heure (Engler *et al.*,1989). Sous des conditions stressantes l'amplitude des pulses de CRH et d'AVP augmente tôt le matin, résultant en des sécrétions épisodiques d'ACTH et de cortisol dans la circulation générale sous forme de pulses toutes les 30 à 100mn et avec un rythme circadien atteignant son maximum entre 6 et 8h du matin et un minimum au milieu de la nuit (Chrousos *et al.*, 1998).

Les conditions stressantes peuvent être engendrées par des traumatismes d'ordre psychologique, émotionnel, pharmacologique, chirurgical ou des conditions socio-économiques difficiles.

5-3 L'ACTH et son récepteur

L'hormone corticotrope ou ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) est une hormone polypeptidique sécrétée principalement par les cellules basophiles de l'hypophyse antérieure et qui stimule la production des corticostéroïdes par la glande surrénale. Elle est le produit de la maturation d'une pro hormone, précurseurs des peptides mélanocortinergiques, la POMC . L'ACTH est constituée de 39 acides aminés dont les 24 premiers sont stables, les autres variant selon les espèces.

5-3-1 Le récepteur à l'ACTH (ACTH-R ou MC2-R) (figure 10)

Le récepteur humain à l'ACTH été cloné en 1992 avec le récepteur humain à l'hormone mélanotrope α -MSH, MC1-R (Mountjoy *et al.*,1992). Il fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires (GPCR) (Cone *et al.*,1993) et de la famille des récepteurs aux mélanocortines. Ce récepteur est le plus court des récepteurs connus des mélanocortines, avec des régions N et C terminales très courtes ainsi qu'une boucle extracellulaire réduite. Il comprend 297 acides aminés et son poids moléculaire déterminé par des expériences de pontage est de l'ordre 33kDa. L'existence de 2 sites de glycosylation potentiels à l'extrémité N terminale augmente son poids moléculaire à 43 kDa (Penhoat *et al.*, 1989).

5-3-2 Caractérisation génomique du MC2-R

Le récepteur humain à l'ACTH a été localisé sur le chromosome 18 dans la région 18p11.2 (Gantz *et al.*, 1993). Le promoteur du gène de 891 paires de bases a été cloné et il a été montré qu'il possède plusieurs sites de liaison de facteurs de transcription (Naville *et al.*,1997) tels que

SF1 (Steroidogenic Factor-1) et AP1 (Activating Protein-1). L'expression du MC2-R et sa signalisation dépendent de 3 sites de liaison à SF-1 pour assurer la régulation par la voie AMPc (Naville et al.,1999, Marchal et al.,1999). Deux sites de liaison TRE (tetradecanoylphorbol-13-acetate responsive element ou TPA-RE) qui lient le complexe AP-1 stimulent la voie PKC/Ca⁺⁺ (Naville *et al.*, 2001). Un autre site de liaison pour AP-1 localisé en amont des deux premiers interagit avec SF-1 et semble être impliqué dans la voie AMPc (Sarkar *et al.*, 2000). L'extrémité 5' non traduite montre que le gène est constitué de 2 exons séparés par un intron de 18kb (Naville *et al.*,1997). Le site majeur d'initiation de la transcription est localisé dans le premier exon non codant de 49pb, alors que l'exon 2 code pour la séquence de l'ACTH. (Naville *et al.*,1994). A l'extrémité 3' non traduite du MC2-R humain cinq signaux de polyadénylation ont été décrits (Penhoat *et al.*,1997). Le gène codant le récepteur de l'ACTH murin comporte 3 ou 4 exons avec seul un site de polyadénylation à l'extrémité 3'; l'exon 4 contient la totalité de la partie codante (Shimizu *et al.*,1997).

5-3-3 Expression tissulaire du MC2-R

5-3-3-1 Dans les glandes surrénales

Une expression importante des ARNm codant MC2-R a été démontrée dans les cellules du cortex surrénalien humain révélée par des études d'hybridation in situ, essentiellement dans les zones fasciculée et glomérulée. La zone réticulée montre moins de marquage des ARNm alors que dans la médullo-surrénale des cellules éparses avec une coloration positive pour le MC2-R est observée mais leur fonction est inconnue (Mountjoy *et al.*,1992). Dans les cellules fasciculées ovines et bovines, un transcrit majeur de 3,6 kb et trois transcrits minoritaires de 1,3, 1,8 et 4,2 kb ont été mis en évidence (Penhoat *et al.*,1994; Picard-Hagen *et al.*,1997). Ce site majeur d'initiation de la transcription justifie la présence de plusieurs transcrits consécutivement à la pluri-adénylation dans la région 3' non traduite (Penhoat *et al.*,1997). Le récepteur MC2-R humain couplé au marqueur EGFP(hMC2R-EGFP) et transfecté de façon stable dans les cellules murines du mélanome M3 et dans les cellules HEK293 montre qu'il est bien adressé à la membrane cellulaire dans les cellules M3 mais pas dans les cellules HEK293 où il reste dans un compartiment intracellulaire (Rached *et al.*,2005).

5-3-3-2 Dans les autres tissus

L'ARNm du MC2-R a été aussi détecté dans la peau humaine (Slominski *et al.*,1996). Le MC2-R a aussi été trouvé dans les adipocytes murins (Boston,1999), et dans les cellules de

Leydig fœtales de testicules de souris (Johnston *et al.*,2007). Chez les rongeurs le MC2-R des adipocytes serait responsable d'une lipolyse induite par un stress et médiée par une décharge d'ACTH par l'hypophyse (Boston,1999), cependant un tel mécanisme est improbable chez l'homme chez lequel le MC2-R est indétectable dans les adipocytes (Chhajlani,1996). Chez le poulet, les récepteurs MC2-R sont exprimés aussi bien dans la rate que dans la surrénale (Takeuchi *et al.*,1998), ce qui indique des fonctions additionnelles de ce récepteur chez les oiseaux comparés aux mammifères. Dans les cellules surrénaliennes tumorales Y1, MC2-R est répertorié parmi les 1386 transcrits activés par une stimulation à l'ACTH (Schimmer *et al.*, 2007). Des mutations dans la région codante du récepteur MC2-R ont été observées (Huebner *et al.*,1999). Certaines de ces mutations confèrent des fonctions du MC2-R associées à des déficiences familiales en glucocorticoïdes (FGD) (Naville *et al.*,1998; Metherell *et al.*,2005).

5-3-4 Mécanisme d'action de l'ACTH (figure 11a et b)

Des expériences de stimulation à l'ACTH des cellules surrénaliennes ovines ont montré une augmentation de l'expression des ARNm du récepteur à l'ACTH (Penhoat *et al.*,1989; Lebrethon *et al.*, 1994) et un prolongement de la demi-vie des ARNm (Penhoat *et al.*,1996). Une augmentation du nombre des sites de liaison est aussi observée aussi bien avec l'ACTH qu'avec des activateurs de la voie AMPc, tels que le dibutyryl-AMPc et la forskoline (Mountjoy *et al.*,1994).

Plusieurs études ont montré qu'après la liaison de l'ACTH au récepteur MC2-R (Mountjoy *et al.*, 1992; Bégeot et Saez, 2000), la concentration intracellulaire d'AMPc est augmentée, et la protéine kinase A (PKA) est activée (Seelig et Sayers,1973;Cooke,1999). A de faibles concentrations d'ACTH, la production des stéroïdes a lieu sans détecter de trace d'AMPc (Gallo-Payet *et al.*,1996), alors que le Ca^{++} seul peut stimuler la production des stéroïdes (Capponi *et al.*, 1984). Le flux de Ca^{++} vers le compartiment intracellulaire a été proposé comme deuxième second messenger de l'action de l'ACTH (Yanagibashi,1979) ou comme troisième messenger (en plus de l'AMPc et du Ca^{++} intracellulaire) (Schiebinger *et al.*1995). L'importance du Ca^{++} est différente entre la zone fasciculée et la zone glomérulée (Gallo-Payet et Payet,2003) car il a été montré qu'en absence de Ca^{++} extracellulaire la production d'aldostérone dans la zone glomérulée est abolie même si l'ACTH est liée à son récepteur (Gallo-Payet *et al.*,1996) .

5-3-5 Effet de l'ACTH sur la stéroïdogénèse

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'ACTH joue un rôle clé dans le maintien et la régulation de la stéroïdogénèse surrénalienne

5-3-5-1 Effet aigu.

Le principal effet aigu de l'ACTH est d'augmenter la mobilisation du cholestérol et son transport au niveau du cytochrome P450_{scc} localisé dans la membrane interne de la mitochondrie pour catalyser la transformation du cholestérol en prégnénolone (Mc Namara et Jeffcoate,1990).

5-3-5-2 Effet chronique

La sécrétion de cortisol et de corticostérone par la zone fasciculée est strictement contrôlée par l'ACTH, alors que la sécrétion d'aldostérone par la zone glomérulée est soumise à une régulation plurifactorielle par l'ACTH, l'angiotensine II et plusieurs neuropeptides (Ehrhart-Bornstein, 1998)

L'ACTH agit non seulement sur la stimulation immédiate de la transcription et de la décharge des stéroïdes, mais intervient à long terme dans l'augmentation du nombre de récepteurs à l'ACTH ((Penhoat *et al.*, 1989), de la quantité de sous-unité G stimulatrice (Gs) (Bégeot *et al.*, 1991), la régulation de la biosynthèse d'enzymes stéroïdogènes telles que P450_{scc}, la 11 β -hydroxylase et la 3 β -HSD (CYP11B1 ou la 11 β -HSD) (Clark *et al.*,2001, Naville *et al.*,1991) et le transport des électrons entre l'adrénoxine et l'adrénoxine réductase (Hanukoglu *et al.*,1990). Dans les cellules tumorales surrénaliennes Y1, l'ACTH régule la transcription du gène de StAR (Lehoux *et al.*,2003), active la JNK *in vivo* et *in vitro*, induit l'expression de MAPK phosphatase-1 (MKP-1) alors qu'elle inhibe l'activité ERK (enzyme recombinant kinase) (Watanabe *et al.*,1997). ERK subit une phosphorylation sous forme inactive et active MEK1/2 (recombinant mitogen activated kinase kinase1/2) (Robinson et Cobb,1997;Volmat et Pouysségur,2001). MEK 1/2 régulent à leur tour le processus de prolifération et/ou de différenciation par la phosphorylation des facteurs de transcription tels que CREB ou Elk et induisent l'expression du gène (Murphy *et al.*, 2002).

Winnay et Hammer, (2006) observent aussi une activation de ERK et de SF1 après une stimulation à l'ACTH. Très récemment, il a été répertorié 1386 transcrits dans la lignée de cellules tumorale surrénalienne Y1 en réponse à l'ACTH, en utilisant des puces ADN, dont 56% interviennent via la voie AMPc, ceux impliqués dans les voies PKC et Ca⁺⁺-dépendante contribuant faiblement, et 38% ne sont pas impliqués dans ces voies de signalisation

(Schimmer *et al.*, 2007). Très récemment, il a été démontré que l'ACTH perfusée à 40ng/jour pendant 7 jours à des rats Wistar augmente significativement l'expression d'ARNm de la CYP11B1(11 β -hydroxylase) dans la surrénale mais elle diminue celle de la CYP11B2 (aldostérone synthase). Par contre la dexaméthasone administrée à raison de 10 μ g/jour pendant 7 jours réduit l'expression d'ARNm de la CYP11B1 dans la surrénale. (Ye *et al.*, 2008).

D'autre part, des travaux récents montrent que les cellules de la lignée tumorale ATC7-L produisent la corticostérone dans les conditions basales et sous stimulation par l'ACTH, et les facteurs de transcription tels DAX-1 et SF-1 qui répriment et activent respectivement la stéroïdogénèse surrénalienne sont régulés par l'ACTH. Celle-ci diminue l'expression de DAX-1 et active SF-1 ; ainsi le rapport SF-1/DAX-1 constitue l'un des moyens permettant de réguler finement la réponse à l'ACTH au niveau de la zone fasciculée (Ragazzon *et al.*, 2006).

5-3-6 Effet chronique sur la glande surrénale.

Il a été rapporté que l'ACTH peut induire une augmentation de la prolifération de la glande surrénale dans des conditions de stress (Lotfi et Armelin, 1998). L'hyperplasie surrénalienne peut être observée après une exposition prolongée à l'ACTH comme dans le cas de patients souffrant du syndrome de Cushing (Imaki *et al.*, 2004). Il est également possible que cette hyperplasie soit liée aux effets mitogènes de certaines mélanocortines telles que γ -MSH (Bicknell *et al.*, 2001). Une augmentation de l'activité de ERK est observée après une stimulation chronique à l'ACTH allant de 24 h à 15jours. Par contre, Zwermann *et al.*, (2005) notent qu'une stimulation chronique à l'ACTH₁₋₂₄ durant 3 semaines inhibe de façon dose-dépendante la prolifération de cellules surrénaliennes tumorales murines Y6 n'exprimant pas MC2-R et donc résistantes à l'ACTH, sans affecter significativement les niveaux de corticostérone ou d'ACTH endogène, ni le poids des surrénales.

5-4- Rôle des glucocorticoïdes sur la stéroïdogénèse

5-4-1 Le rétro contrôle négatif (figure 12)

Dans la circulation sanguine, la majorité du cortisol ou de la corticostérone est liée à CBG, et lorsque le niveau circulant de la forme libre augmente, les glucocorticoïdes exercent une rétroaction négative sur le système hypothalamo-hypophyso-surrénalien à 3 niveaux anatomiques afin de moduler la sécrétion du CRH et de l'ACTH; l'hippocampe et l'amygdale, l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure. Cette rétroaction est facilitée par la présence des récepteurs MR et GR au niveau de ces centres. Cet effet inhibiteur sur la réponse sécrétoire de

l'ACTH agit pour limiter la durée de l'exposition des tissus aux glucocorticoïdes afin de minimiser notamment leur effet anti-inflammatoire. Par ailleurs, le cerveau est l'un des tissus extra-surréaliens qui produisent les corticostéroïdes mais avec une capacité plus réduite comparée aux surrénales à cause d'une faible expression des gènes impliqués (Gomez-Sanchez *et al.*,1997; MacKenzie *et al.*,2000). Cependant, la proximité des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR et MR) implique une régulation paracrine/autocrine. D'autre part, une étude très récente montre que l'ACTH perfusée à 40ng/jour pendant 7 jours à des rats Wistar augmente l'expression CYP11 B1 (11 β -hydroxylase) dans l'hypothalamus et le cortex cérébral, et celle de la CYP11B2 (aldostérone synthase) dans toutes les régions du SNC, excepté dans le cortex. Par contre, la perfusion de 10 μ g/jour de dexaméthasone pendant 7 jours n'a aucun effet sur l'expression du gène CYP11 B1 dans le SNC. Celle-ci est augmentée dans l'hypothalamus et l'hippocampe des animaux surrénalectomisés ainsi que celle de la CYP11B2 dans le cervelet des animaux non opérés (Ye *et al.*, 2008).

5-4-2 Contrôle paracrine et autocrine

Les cellules corticosurréaliennes possèdent des récepteurs aux glucocorticoïdes (Loose *et al.*, 1980). Une régulation autocrine ou paracrine a été démontrée sur des cellules coricosurréaliennes bovines adultes et fœtales en réponse à stimulation aiguë à l'ACTH (Darbeida et Durand,1987; 1988).

Un pré-traitement de ces cellules par les glucocorticoïdes augmente la production d'AMPC et de cortisol par une double action d'une part, en augmentant la transcription du gène codant la récepteur à l'ACTH sans modifier la stabilité des transcrits (Picard-Hagen *et al.*, 1997), et d'autre part en augmentant le nombre de récepteurs à l'ACTH sans affecter ni l'affinité de liaison, ni l'activité des protéines Gs et Gi (Darbeida et Durand,1990). Il a aussi été montré que les glucocorticoïdes augmentent la production de prégnénolone en stimulant l'activité P450scc dans les mitochondries de cellules corticosurréaliennes ovines et cela sans altérer les quantités d'adrénoxine, d'adrénoxine réductase ou de cytochrome P450scc (Picard-Hagen *et al.*, 1995). Récemment, il a été démontré que les récepteurs hormonaux nucléaires LXR α et LXR β (liver X α et β) inhibent l'expression de plusieurs enzymes stéroïdogènes dans la glande surrénale, et le traitement à l'agoniste de LXR augmente l'expression de l'ARNm de l'ACTH. La réduction de l'activité de la 11 β -HSDI dans des cellules hypophysaires entraînant une diminution du taux de glucocorticoïdes actifs, cela suggère que les LXR bloquent le feedback négatif des glucocorticoïdes (Nilsson *et al.*, 2007)

6- Régulation par d'autres facteurs physiologiques

6-1 Les cytokines et l'angiotensine (AII)

Le système immunitaire stimule la sécrétion de CRH et d'ACTH et affecte le fonctionnement de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale. Les niveaux plasmatiques des cytokines sont trop faibles pour avoir un impact sur la fonction surrénalienne et les molécules du système immunitaires sont produites dans la surrénale par deux sources: les macrophages bien dispersés dans la zone réticulée qui ont une activité phagocytaire mais sécrètent aussi différentes cytokines (IL-1, IL-6 et $\text{TNF}\alpha$), ainsi que des peptides tels que VIP, et les lymphocytes qui sont capables de sécréter des molécules ACTH-like à de faibles concentrations et n'exercent aucune stimulation significative sur la stéroïdogénèse (Ehrhart-Bornstein *et al.*,1998).

6-1-1 Expression des cytokines dans la glande surrénale

Les cellules surrénaliennes produisent une variété de cytokines à travers l'expression des ARNm de $\text{TNF}\alpha$, IL-1 et IL-6 avec une prédominance de IL-1 et IL-6 dans la zone réticulée. Chez l'homme, le site majeur de production des cytokines est la zone réticulée (Gonzalez-Hernandez *et al.*,1996). Une autre cytokine IL-18, est produite aussi dans les zones réticulée et fasciculée au cours d'un stress aigu et bien qu'elle semble être plus présente dans la rate et le duodénum pour immuniser leurs cellules (Conti *et al.*,2000).

6-1-1-1 Les interleukines (IL-1, IL-2 et IL-6)

Les 2 sous unités IL-1 α et β stimulent la sécrétion des glucocorticoïdes et inhibent l'effet de l'angiotensine sur la stéroïdogénèse mais leurs récepteurs de type I et II ne sont pas retrouvés dans les glandes surrénales normales, alors que le type I a été détecté dans le cas de néoplasie surrénalienne (Willenberg *et al.*,1998).

Chez l'homme, IL-6 et son récepteur ont leur immunoréactivité détectée dans les surrénales normales, dans les adénomes surrénaliens et dans la lignée tumorale NCI-H295 (Willenberg *et al.*,2002) mais aucune action significative de IL-6 n'a été observée sur les cellules adénomateuses *in vitro*. IL-6 stimule la sécrétion du cortisol et de l'ACTH, mais une exposition longue diminue les concentrations plasmatiques de l'ACTH et maintient le taux de cortisol élevé; chez le rat elle stimule la stéroïdogénèse et les niveaux d'ARNm qui codent pour IL-6 alors que IL-2 stimule la sécrétion des corticostéroïdes surrénaliens.

6-1-1-2 Tumor necrosis factor ($\text{TNF}\alpha$)

TNF α inhibe l'ACTH et la sécrétion d'aldostérone induite par l'angiotensine II, de même que la production de cortisol basale et stimulée par l'ACTH. De même il inhibe l'expression basale de IGF-1 induite par l'ACTH dans les cellules surrénaliennes fœtales humaines indiquant ainsi son intervention dans la différenciation et la croissance de ces cellules. Il semble que la forme 3 des interleukines (IL-3) a une action via la voie lipoxigénase, et IL-6 passe par la voie cyclooxigénase (Bornstein *et al.*,2004).

6-1-2 Angiotensine II (AII)

L'angiotensine II stimule une voie de signalisation PKC-dépendante et induit l'expression du récepteur MC2-R (Lebrethon *et al.*,1994, Mountjoy *et al.*,1994). Elle stimule aussi l'expression des ARNm du MC2-R dans les cellules fasciculées bovines (Penhoat *et al.*,1994).

Lehoux et Lefebvre (2006) rapportent que AII active PKC- ϵ et qu'une infection avec un adénovirus contenant une construction avec PKC- ϵ diminue l'expression du gène codant l'aldostérone synthase dans les cellules H295R. Dans ces cellules, AII stimule la sécrétion d'aldostérone et de cortisol de manière dose et temps-dépendante en induisant une augmentation de la phosphorylation de la protéine kinase D (Romero *et al.*, 2006).

6-2 Régulation par les facteurs de croissance

6-2-1 IGF-1

Les récepteurs à l'IGF1 ont été mis en évidence sur les cellules surrénaliennes bovines (Penhoat *et al.*,1988), sur les cellules fœtales ovines (Naaman *et al.*,1989) et dans le cortex surrénalien de plusieurs espèces. Ce facteur agit sur la croissance surrénalienne et la fonction stéroïdogène avec un effet chronique et un effet aigu (Feige *et al.*,1991). Un traitement de cellules corticosurrénaliennes bovines à l'IGF1 augmente la réponse à l'ACTH et à l'AII, entraîne une augmentation des récepteurs à ces 2 hormones (Penhoat *et al.*,1988), augmente l'activité des enzymes 3 β -HSD, P450_{C21}, P450_{C11} (Penhoat *et al.*,1988) et l'expression de la protéine Gs stimulatrice (Bégeot *et al.*,1989). IGF-I potentialise aussi les effets de l'ACTH sur l'expression des récepteurs à l'ACTH et sur la sécrétion de cortisol (Penhoat *et al.*,1989). Sur ces mêmes cellules au cours d'une stimulation par l'ACTH, IGF-I diminue de façon aiguë la production de l'AMPc et la sécrétion de glucocorticoïdes (Fujii *et al.*,1990). Récemment, il vient d'être démontré que l'IGF-I stimule la croissance des surrénales de fœtus d'ovins sans affecter la stéroïdogénèse (Ross *et al.*,2007).

6-2-2 TGF- β

Les facteurs TGF- β sont des molécules impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Le TGF- β 1 a été mis en évidence dans les cellules de la zone fasciculée avec une présence plus faible dans les cellules de la zone glomérulée (Keramidas *et al.*, 1991). TGF β 1 inhibe la production de cortisol basale et stimulée par l'ACTH dans les cellules surréaliennes bovines et ovines (Feige *et al.*, 1991; Rainey *et al.*, 1988). TGF β 1 diminue le nombre de récepteurs à l'ACTH et inhibe l'expression de la P450c17 (Rainey *et al.*, 1988), et de l'activité de la 3 β -HSD (Rainey *et al.*, 1991), ainsi que l'expression des ARNm de StAR (Brand *et al.*, 1998). Sur les cellules fasciculées humaines, TGF β 1 diminue la production de S-DHEA sans modifier le cortisol et augmente l'expression des ARNm codant la 3 β -HSD et le nombre de récepteurs AT1 (Lebrethon *et al.*, 1994). Dans la lignée tumorale de surrénales humaines H295R, il diminue la production d'aldostérone et de cortisol en inhibant l'expression de CYP11B1 et CYP11B2 (Liakos *et al.*, 2003).

7- Les facteurs de l'environnement: photopériode et saison

Les conditions de l'environnement pendant l'hiver, telle que la photopériode de jour court, la diminution de la température, la réduction de la consommation hydrique constituent un stress qui activent l'axe HHS. Des rythmes ultradiens des concentrations en glucocorticoïdes sont le résultat de sécrétions épisodiques sous forme de pulses afin d'empêcher la sous régulation de l'axe HHS et de maintenir sa capacité de réponse au stress. Ce rythme de sécrétion épisodique ultradien ou circadien a été montré pour le cortisol plasmatique chez l'homme (Weitman *et al.*, 1971), le cerf (Smith et Bubenick, 1990) et les rongeurs (Keller-Wood et Dallman, 1984).

Des variations saisonnières de l'activité et de la sensibilité de l'axe HHS ont été aussi rapportées chez l'homme (Walker *et al.*, 1997), les primates (Schiml *et al.*, 1996), les rongeurs désertiques (Amirat *et al.*, 1993; Amirat *et al.*, 1980) et le cerf (Bubenick *et al.*, 1989). Les variations de la photopériode pendant les saisons qui est régulée à travers la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale, contribue à déterminer le début et la fin de l'adaptation spécifique à la saison afin de maintenir une balance énergétique positive (Ingram *et al.*, 1999).

Récemment il a été mis en évidence des variations diurnes et saisonnières du cortisol chez des garçons et des filles durant la phase de la puberté (Matchock *et al.*, 2007)

II- Les mélanocortines autres que l'ACTH, et leurs récepteurs

1- La pro-opio mélanocortine (POMC)

Chez l'homme, le gène codant pour la POMC de 7,6 kb est localisé sur le chromosome 2p3, et comprend 3 exons séparés par 2 introns. Il est exprimé par les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure et dans les cellules du lobe intermédiaire. Il est aussi exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus, et dans d'autres tissus: peau, testicules, thyroïde, placenta, rein, foie (Smith et Funder, 1988). Dans les cellules corticotropes, seuls le deuxième (152pb) et troisième (833pb) exons sont traduits et codent pour un polypeptide de 267 acides aminés (pré-POMC), qui après clivage du peptide signal synthétise la POMC composée de 241 acides aminés chez l'homme (Takahashi *et al.*, 1981) et de 209 acides aminés chez la souris (Uhler et Herbert, 1983) et le rat (Drouin et Goodman, 1980). Elle contient 3 domaines majeurs: une partie centrale qui conserve la séquence de l'ACTH₁₋₃₉, l'extrémité C-terminale comprenant la β -lipotropine qui peut être clivée et libérer la β -endorphine et l'extrémité N-terminale qui correspond à la séquence de l' α -MSH (Castro et Morrison, 1997).

Les peptides mélanocortinergiques sont dérivés de la molécule précurseur POMC qui a été détectée dans l'hypothalamus, l'hypophyse et au niveau périphérique tels que le système immunitaire, la rate, les poumons, dans les mélanocytes et le tractus gastro-intestinal (Wikberg *et al.*, 2000).

Chez les rongeurs la POMC est principalement exprimée dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse, dans le noyau arqué (ARC) et dans le noyau du tractus solitaire (NTS). (Joseph *et al.*, 1983). La POMC est aussi exprimée dans la glande surrénale, la peau, l'intestin, le placenta, le pancréas, l'ovaire et le testicule (Smith et Funder, 1988, Chen *et al.*, 1986). Le processus post-traductionnel conduit à synthétiser différentes mélanocortines tels que la β -lipotropine, la γ -lipotropine et la β -endorphine. **(figure 13)**

2- Synthèse des mélanocortines (figures 13)

Les différentes protéines dérivées de la POMC sont synthétisées suivant un processus de clivage protéolytique nécessitant l'intervention des enzymes proconvertases et des carboxypeptidases. A l'heure actuelle il existe 7 membres de la famille des enzymes proconvertase : PC1/3, PC2, furin/PACE, PACE 4, PC4, PC5/6 et PC7/SPC7/LPC/PC8. PC1/3 et PC2 sont les 2 enzymes les plus importantes dans la synthèse des pro-hormones (Eggekraut-Gottanka et Beck-Sickinger, 2004). La pro-POMC est d'abord clivée par PC1 pour libérer la pro-ACTH ou ACTH₁₋₃₉ et la β -lipotropine (β -LPH). Le clivage a lieu entre 2 résidus d'acides aminés basiques Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Arg et Arg-Lys grâce à des endopeptidases. La pro-ACTH est à son tour clivée par PC1 pour donner naissance à la pro- γ -MSH et l'ACTH qui est

ensuite clivée par PC2 en α -MSH ou ACTH₁₋₁₇ et en corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP), alors que la β -LPH génère la γ -LPH et la β -endorphine. Ensuite, la γ -LPH est clivée par PC2 pour générer la β -MSH.

L' α -MSH mature est synthétisée à partir de l'ACTH₁₋₁₇ par une N-Acétyl transférase après l'action de la carboxypeptidase (CPE) et l'amidification par la peptidyl- α amidating monooxygénase (PAM) qui génère la désacétyl- α MSH.. Les étapes finales de ces clivages concernent les extrémités N et C terminales qui vont permettre de produire respectivement γ 3-MSH₁₋₂₈ et γ -MSH₁₋₁₂ et les 2 formes β -endorphine₁₋₂₇ et ₁₋₂₆.

Les mélanocortines ont toutes une séquence commune de 4 acides aminés composée de **His-Phe-Arg-Trp**, Celle-ci étant la séquence nécessaire mais non suffisante pour permettre une liaison au récepteur, son activation et les effets biologiques afférents (**figure 14**).

2-1 α -MSH

L' α -MSH est formée des treize premiers acides aminés de l'ACTH₁₋₁₇. A l'extrémité N terminale, la sérine est acétylée chez plusieurs espèces, et dans la partie C terminale, la valine a son groupement carboxyl amidifié. Cette séquence est conservée chez des espèces comme le rat, le mouton et la souris. Au niveau central, l' α -MSH est présente dans l'ARC de l'hypothalamus, la région dorso-latérale et dans le NTS. Dans les tissus périphériques il a été trouvé dans la zone médullaire de la glande surrénale, l'estomac, le rein, le placenta, les ovaires, l'intestin, le testicule, le pancréas et la peau où il joue un rôle prépondérant dans la pigmentation. L' α -MSH est le peptide qui active le plus le récepteur MC1-R suivi de l'ACTH₁₋₃₉, alors que les peptides issus du clivage tels que ACTH₄₋₁₀ et ACTH₁₋₁₀ n'activent pas MC1-R suggérant que les acides aminés C-terminaux de l' α -MSH sont importants pour engendrer l'activité biologique totale (Gantz *et al.*,1993). β et γ -MSH sont aussi de faibles activateurs (Abdel-malek,2001). α -MSH est aussi le ligand préférentiel pour les récepteurs MC3-R et MC4-R (Gantz *et al.*,1993)

2-2 β -MSH

La β -MSH est synthétisée par clivage de la β -LPH chez l'homme, mais chez le rat et la souris l'absence de site de clivage ne permet pas de synthétiser cette hormone. Chez l'homme, une homologie de séquence est trouvée avec celles de l' α -MSH et γ -MSH (McLean et Lowry, 1981) et la β -MSH peut être efficace quand elle est administrée par voie exogène comme dans le modèle gouty peritonitis (Getting *et al.*,1999).

2-3 γ .MSH

Dans le lobe antérieur de l'hypophyse l'activité de (PC1) est plus importante que celle de PC2 et résulte en la synthèse de la pro- γ -MSH ou N-POMC₁₋₇₄, l'ACTH et la β -LPH. Trois formes de γ -MSH sont ensuite générées, γ_1 , γ_2 et γ_3 -MSH et un peptide-like, Lys- γ_3 -MSH chez le rat et le fœtus de mouton. γ_3 -MSH est présente dans l'hypophyse de bovin. Cependant chez le rat et la souris, le site de clivage Arg-Arg nécessaire à la synthèse de γ_1 -MSH est muté en Pro-Arg, ce qui suggère l'absence de γ_1 -MSH chez les rongeurs.

Dans la glande surrénale où il est présent, γ -MSH est le seul parmi les peptides mélanocortinergiques ayant le plus d'affinité pour le récepteur MC3-R et joue un rôle activateur dans la stéroïdogénèse en potentialisant la réponse des surrénales à une stimulation par l'ACTH. Cet effet passerait par l'activation de la lipase hormonosensible (LHS) qui augmente le pool de cholestérol libre. La forme de γ -MSH qui intervient dans cette activation n'est pas connue. Cependant chez l'homme, le rat et le mouton, la pro- γ_1 -MSH est la forme prédominante dans la circulation mais, considérant l'effet potentiel plus important de Lys- γ_3 -MSH comparé à celui de pro- γ -MSH, la caractérisation du récepteur à travers lequel les peptides γ -MSH agissent sur la stéroïdogénèse surrénalienne reste à élucider (Harmer et Bicknell, 2005).

3- Les récepteurs aux mélanocortines

Les mélanocortines α , β , γ -MSH, l'ACTH₁₋₃₉ ainsi que la β -endorphine et β -lipotropine (β -LPH) sont issues du clivage du précurseur des peptides mélanocortinergiques, la POMC. Les mélanocortines exercent leurs effets biologiques sur les cellules cibles en se liant à des récepteurs couplés aux 7 protéines transmembranaires (GPCR) qui appartiennent à une même famille et sont caractérisées par une courte extrémité NH₂ terminale dans le domaine extra cellulaire et une courte extrémité COOH terminale dans le domaine intracellulaire (Cone *et al.*, 1993, Catania *et al.*, 2004). Cinq récepteurs aux mélanocortines (MCRs) ont été clonés et classés (MC1-R à MC5-R). Une grande homologie de séquence existe entre ces récepteurs avec 38% d'identité entre MC2-R et MC4-R et 60% entre MC4-R et MC5-R. Ils sont couplés au système adénylate cyclase conduisant à l'accumulation de l'AMPc dans le cytoplasme des cellules cibles. D'autres voies de signalisation ont été aussi mises en évidence avec l'augmentation du Ca⁺⁺ intracellulaire et l'activation de la voie IP3 (inositol triphosphate) (Wikberg *et al.*, 2000). Les mélanocortines naturelles et synthétiques se lient aux 5 récepteurs avec des affinités différentes excepté pour MC2-R qui lie l'ACTH de façon spécifique. Nous

nous intéresserons dans cette partie à présenter les récepteurs MC3-R et MC4-R étudiés dans ce travail de thèse, ainsi que MC5-R qui est aussi impliqué indirectement dans la stéroïdogénèse surrénalienne.

3-1 Le récepteur MC3-R

3-1-1 Structure du MC3-R (figure 15)

Il existe une grande homologie de séquence entre le MC3-R humain, et celui de souris et ou de rat. Chez ces espèces, MC3-R contient 3 sites de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) situés dans la seconde boucle intracellulaire et l'extrémité C terminale. L'ancrage du récepteur dans la membrane ferait intervenir deux résidus cystéine présents dans l'extrémité C terminale. Dans l'extrémité N terminale, il existe 3 sites potentiels de glycosylation. Chez le rat l'étude par photomarquage du NDP-MSH suivie de SDS-PAGE révèle un poids moléculaire compris entre 53 et 56 kDa et 37 kDa respectivement avant et après déglycosylation par le peptide N glycosidase F (Sahm *et al.*,1994). Ce récepteur lie l'ACTH₁₋₃₉, l' α , la β , et la γ -MSH avec une affinité de liaison équivalente. Les peptides tronqués ACTH₄₋₁₀ et ACTH₁₋₁₀ sont également efficaces, suggérant ainsi que la région centrale est requise pour l'activation du récepteur (Gantz *et al.*, 1993). Le clonage récent du MC3-R porcin (pMC3-R) montre qu'il a une grande homologie (plus de 80%) dans la séquence en nucléotides et en acide aminés avec MC3R humain, de rat et de souris (Fan *et al.*, 2008)

3-1-2 Expression au niveau central

L'expression de l'ARNm du MC3-R a été démontrée au niveau de l'hypothalamus de rat avec deux tailles, 2 et 2,5kb (Rosalli-Reh fuss *et al.*,1993). MC3-R est aussi exprimé dans le septum, l'hippocampe, le thalamus, le cerveau médian et dans le système limbique (Rosalli-Reh fuss *et al.*,1993). Par autoradiographie, une expression élevée de MC3-R a été localisée dans l'hypothalamus ventromédian (VMH) et le noyau accubens puis dans l'aire préoptique et les bulbes olfactifs. De plus, une large proportion de neurones à Agrp du noyau arqué contiennent une immunoréactivité vis-à-vis de l'ARNm MC3-R (Bagnol *et al.*,1999). Cependant, MC3-R n'est pas exprimé dans le cerveau de poulet (Takeuchi et Takahashi,1999). Par ailleurs, Mounien *et al.*,(2005) montrent qu'un double marquage des amorces d'ARN de MC3-R et MC4-R au S³² et à la digoxigénine révèle en hybridation *in situ* que 38% des neurones exprimant l'ARNm NPY expriment l'ARNm de MC3-R, et seulement 16% des cellules exprimant MC3-R sont des neurones NPY ergiques, alors que 9% des neurones produisant

NPY expriment l'ARNm qui code pour MC4-R. Les proportions de neurones de NPY qui expriment l'ARNm du MC3-R et du MC4-R ne sont pas significativement différentes dans la partie antérieure et postérieure du noyau arqué. Cette étude montre ainsi qu'une large proportion de neurones de NPY dans l'hypothalamus de rat exprime MC3-R alors qu'une quantité beaucoup plus faible exprime MC4-R, suggérant alors que les mélanocortines peuvent moduler directement l'activité du système NPY hypothalamique, essentiellement à travers l'activation de MC3-R. La large distribution de MC3-R dans le système nerveux central fait penser que sa localisation est présynaptique. Dans le noyau arqué, l'ARNm du MC3-R est exprimé dans les neurones à POMC (Jegou *et al.*, 2000) suggérant un mécanisme régulateur de rétrocontrôle où le MC3-R agit comme un autorécepteur inhibiteur (Marks *et al.*, 2005) .

3-1-3 Expression périphérique

MC3-R est détecté dans la surrénale de rat (Dhillon *et al.*, 2003) et de poulet (Takeuchi et Takahashi, 1999) et dans la lignée cellulaire humaine H295R (Chai *et al.*, 2007), mais pas dans la glande surrénale de souris (Norman *et al.*, 2003). Il est aussi exprimé dans certains tissus périphériques tels que le tissu adipeux, le cœur, le muscle squelettique, le rein (Chhajlani, 1996), dans l'estomac, le duodénum, le placenta et le pancréas (Gantz *et al.*, 1993). L'ARNm de MC3-R est aussi localisé dans les macrophages péritonéaux de souris (Getting *et al.*, 1999) et dans le thymus (van der Kraan *et al.*, 1998), mais il n'est pas présent dans les mélanocytes (Getting *et al.*, 1993).

3-1-4 Rôle physiologique du MC3-R

Malgré le rôle attribué au MC3-R dans la littérature dans le maintien de l'homéostasie énergétique (Butler *et al.*, 2000), ce récepteur reste énigmatique.

MC3-R semble agir comme un autorécepteur inhibiteur au niveau des neurones du noyau arqué, qui entraîne le syndrome d'obésité chez les souris dont le gène MC3-R a été invalidé (Morgan et Cone, 2006). Cette action est justifiée par quatre faits, la co-expression au niveau du noyau arqué de l'ARNm MC3-R avec celui de la POMC et de NPY, l'inhibition spontanée des neurones à POMC avec un agoniste spécifique de MC3-R, la stimulation de la prise alimentaire par une administration périphérique d'un agoniste de MC3-R, et la forte inhibition de la prise alimentaire avec une perte de poids après l'administration d'IL-1 β à des souris MC3-R KO (Cone, 2006). D'autre part, la souris portant une délétion spécifique du MC3-R montre un phénotype d'obésité complexe (Butler *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000) impliquant

MC3-R dans la régulation de l'homéostasie de l'énergie. La souris KO MC3-R montre une augmentation de la masse du tissu adipeux et une diminution de la masse maigre en absence d'une quelconque augmentation du poids corporel ou de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de l'hypertension, suite à une sensibilité au sel (Ni *et al.*, 2003). De plus, il est démontré qu'un agoniste spécifique, le D-Trp⁸- γ -MSH inhibe le taux de décharge des neurones à POMC (Cowley *et al.*, 2001), et l'administration de composés antagonistes stimule la prise alimentaire (Marks *et al.*, 2005). De même, MC3-R est impliqué dans le contrôle de l'axe gonadique puisque l'agoniste γ 2-MSH stimule *in vitro* l'accumulation de l'AMPc et la sécrétion du GnRH par la lignée hypothalamique GT1-7 et par des explants hypothalamiques, alors que s'il est administré *in vivo* dans l'aire préoptique médiane, il augmente le niveau de LH plasmatique. Sur la lignée cellulaire H295R humaine qui exprime MC3-R de façon stable, la prolifération cellulaire est stimulée par l'agoniste, Nle4,D-Phe7- α -MSH (NDP- α MSH) de façon dose-dépendante par l'activation de MAP kinase via le système IP3 kinase (Chai *et al.*, 2007). Cependant MC3-R intervient dans des réponses inflammatoires par sa présence dans les macrophages du péritoine et du genou, ainsi que dans la protection cardiovasculaire des blessures ischémiques (Guarini *et al.*, 2002).

3-2 Le récepteur MC4-R

3-2-1 Organisation génomique du MC4-R (figure 16)

Le gène du MC4-R a été cloné chez l'homme (Gantz *et al.*, 1993) et il est codé par un seul exon. La protéine est composée de 332 acides aminés et montre une homologie structurale de 93% entre les récepteurs du rat et ceux de l'homme (Alvaro *et al.*, 1996) et entre la famille des récepteurs aux mélanocortines au sein de la même espèce (65% avec MC5-R, 55% avec MC3-R, 46% avec MC2-R et 47% avec MC1-R) (Cone, 2000). Ce gène a été localisé sur le chromosome 18 dans la région 18q22 (Magenis *et al.*, 1994; Sundaramurthy *et al.*, 1998), ou région 18q21-3 (Gantz *et al.*, 1993). Le gène du MC4-R a été cloné chez le poulet et se situe sur le chromosome 2 (2q12) (Takeuchi et Takahashi, 1998), mais également chez le Fugu et le zebrafish (Logan *et al.*, 2003). L'interaction entre NDP- α MSH et la conformation active du récepteur hMC4-R a été modélisée par ordinateur (modèle dit de Poghosova). Le peptide His⁶-D-Phe⁸-Arg⁸-Trp⁹ de la molécule de NDP- α -MSH réagit avec les résidus trans- membranaires TM6 (Phe²⁶¹) et TM7(Phe²⁸⁴). Cette interaction est basée sur le comportement antagoniste entre NDP- α -MSH et MC4-R pour empêcher la rotation de TM6, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la taille de D-Phe⁷ interfère directement avec la rotation de

TM6, empêchant ainsi l'activation du récepteur. Ceci suggère que le changement de l'interaction avec la position de His⁶ dans la chaîne réoriente le peptide à l'intérieur de la poche de liaison et empêche indirectement la rotation de TM6. Ceci explique l'interaction avec les mutations F261^(6.51) et F284^(7.35) qui agissent pour restaurer l'efficacité des peptides où His⁶ et D-Phe⁷ ont été substitués (Fleck *et al.*,2007) (**Figure 17**)

3-2-2 Expression du MC4-R

3-2-2-1 Expression du MC4-R au cours du développement

Les récepteurs MC4-R centraux ont un développement distinct et apparaissent dans le cerveau fœtal bien avant le récepteur MC3-R (Kistler-Heer *et al.*,1998). Durant le développement fœtal, MC4-R est hautement exprimé dans le système nerveux autonome (Mountjoy et Wild, 1998). Il est possible que ce récepteur intervienne dans le développement neuronal puisque α -MSH et NDP- α MSH stimulent des marqueurs de la croissance dans les cellules du striatum et du mésencéphale obtenues à partir de fœtus de rats à 18 jours de gestation, et qui semble être le moment précis où MC3-R est absent.

3-2-2-2 Expression au niveau central.

MC4-R est exprimé principalement dans le système nerveux central, mais il est plus largement distribué que MC3-R. Des études utilisant l'hybridation in situ (Mountjoy *et al.*,1994; Kishi *et al.*, 2003) et des souris transgéniques exprimant une protéine verte fluorescente (GFP ou green fluorescent protein) de contrôle du promoteur du gène de MC4-R (Liu *et al.*,2003) ont permis de localiser MC4-R au niveau d'un certain nombre de sites incluant le cortex, le cervelet, le striatum, l'hippocampe, l'hypothalamus, le cerveau médian, l'amygdale, le thalamus et le cortex cérébral. MC4-R a été localisé dans toutes les aires connues pour lier α -MSH (Tatro, 1990). Cependant Bagnol *et al.*,(1999) chez le rat notent l'absence d'expression d'ARNm codant pour MC4-R dans les neurones NPY/Agrp probablement en raison de la souche de rat étudiée (rat Wistar ou Sprague-Dawley). Chez la souris dans le cerveau postérieur, l'immunoréactivité de GFP est retrouvée dans les cellules contenant la choline acétyltransférase, qui est un marqueur des neurones pré-ganglionnaires autonomes (Liu *et al.*,2003) et au niveau du noyau para-ventriculaire, dans les neurones à TRH et à ocytocine, impliquant ainsi MC4-R dans un processus de modulation neuroendocrine (Mountjoy,1994).

3-2-2-3 Expression au niveau périphérique

MC4-R est détecté dans les cellules corticosurrénaliennes humaines et bovines (Doghman *et al.*, 2004), de rat (Dhillon *et al.*, 2003), dans la lignée cellulaire H295-R (Doghman *et al.*, 2004) et dans la surrénale de poulet (Takeuchi et Takahashi, 1998). De plus, MC4-R est exprimé dans le cœur, le poumon, le rein, et les adipocytes (Mountjoy *et al.*, 2003; Hoggard *et al.*, 2004). MC4-R pourrait être également présent dans le tissu adipeux humain (Chagnon *et al.*, 1997). Chez le poulet, MC4-R a été localisé au niveau périphérique dans les ovaires, les testicules et le tissu adipeux (Takeuchi et Takahashi, 1998).

3-2-2-4 Rôle physiologique du MC4-R

Plusieurs fonctions ont été attribuées au MC4-R, comme le dysfonctionnement érectile (Martin et MacIntyre, 2004) et la douleur (Starowicz et Przewlocka, 2003), mais son rôle le plus important réside dans le contrôle de la prise alimentaire et la dépense énergétique et l'apparition de l'obésité (Adan *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 1997; Huszar *et al.*, 1997) ainsi que sur la régulation cardiovasculaire (Li *et al.*, 1996).

Les souris MC4-R-KO ou MC4-R^{-/-} comportent une délétion du gène après l'insertion d'une cassette néomycine dans le gène MC4-R, qui remplace la région codante entière. Ces souris se caractérisent par la présence d'un diabète de type 2. Elles sont hyperphagiques, hyperinsulinémiques, hyperleptinémiques, et montrent une augmentation de la croissance avec un phénotype obèse, une masse maigre normale, et une altération dans la signalisation centrale des mélanocortines. (Huszar *et al.*, 1997). Les souris MC4-R-KO pèsent plus que les souris contrôles avant l'hyperphagie, et même si leur température corporelle est normale, l'activité locomotrice chez le mâle est réduite durant la phase obscure (Ste Marie *et al.*, 2000) ; aussi, l'obésité observée est consécutive à l'hyperphagie ainsi qu'à la réduction de la dépense énergétique.

3-3 Le récepteur MC5-R

C'est le dernier des récepteurs à avoir été cloné et identifié chez l'homme (Gantz *et al.*, 1994) et la souris (Labbe *et al.*, 1994). Il est composé de 325 acides aminés. En plus de son expression dans la zone glomérulée de la surrénale bovine (Liakos *et al.*, 1998), le récepteur MC5-R a une expression ubiquitaire et son ARNm a été détecté dans plusieurs tissus de glandes exocrines telles que les glandes sébacées et lacrymales et d'autres organes comme le foie, le poumon, le thymus, le testicule, l'ovaire, les glandes mammaires, la moelle osseuse, l'estomac et le duodénum ainsi que les cellules du tissu adipeux blanc (Catania *et al.*, 2004). Son expression a

été aussi localisée dans les lymphocytes B (Buggy,1998) et les lymphocytes T (Taylor et Namba,2001). MC5-R est aussi exprimé au niveau du cerveau, ainsi que dans le muscle squelettique de souris mais pas dans celui de rat (Wikberg *et al.*,2000).

III Les agonistes et antagonistes des récepteurs aux mélanocortines

1- Les agonistes synthétiques (figure 18)

[Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH est l'un des premiers analogues synthétisés montrant une efficacité dans des modèles inflammatoires (Sawyer *et al.*,1980). D'autres molécules plus courtes ont été synthétisées, telles que le mélanotan II (MTH) (Ac-Nle⁴-c[Asp⁵,D-Phe⁷, Lys¹⁰] α -MSH) (Al Obeidi *et al.*,1989) qui est un puissant agoniste de MC3-R et MC4-R dans le modèle de l'obésité murine (Fan *et al.*,1997), et qui montre aussi un puissant effet anti-inflammatoire dans le modèle du syndrome de l'arthrite de Gouty chez les rongeurs (Getting *et al.*,2002).

2- Les antagonistes naturels

2-1 La protéine Agouti

Des peptides naturels et synthétiques ont été utilisés comme des outils pharmacologiques pour identifier le rôle physiopathologique des récepteurs MCRs dans différents tissus. Butlman *et al.*, (1992) découvrent que l'expression ectopique de la protéine Agouti en raison d'une mutation dominante serait à la base d'un modèle de souris à obésité monogénique connu sous le nom de souris A^y.A^y (souris Agouti) caractérisée par la couleur jaune du pelage et par une obésité morbide (Morgan *et al.*,1999). Le gène Agouti est normalement exprimé dans les follicules du cuir chevelu et contribue à une chevelure jaune en antagonisant l'action de l' α -MSH au niveau du récepteur MC1-R (Barsh *et al.*,1999;Ollmann *et al.*,1998). La surexpression de la protéine Agouti dans les cellules folliculaires aboutit à la synthèse d'un pigment jaune (phaeomélanine) et un blocage dans la production du pigment noir (eumélanine) à travers un antagonisme compétitif qui bloque la fixation de l' α -MSH sur le récepteur MC1-R (**Figures 19 et 20**). Dans ce modèle animal, l'expression ectopique de la protéine Agouti dans certaines régions du cerveau qui contrôlent l'homéostasie du poids corporel, est responsable de l'obésité et de l'hyperphagie (Lu *et al.*,1994). Chez l'homme, l'homologue de la protéine Agouti, nommée Agouti signaling protein (ASIP) est aussi un puissant antagoniste des récepteurs humains MC1-R, MC3-R et MC4-R et pourrait jouer un rôle dans les transmissions intercellulaires (Yang *et al.*,1999). Une protéine hypothalamique ayant une haute homologie de séquence avec la protéine Agouti et appelée Agouti related transcript a été identifiée (Shutter

et al.,1997), puis connue par la suite sous le nom de Agouti-related protein (Agrp) qui joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Ellacott et Cone,2004; MacNeil *et al.*,2002) (**figure 21**)

2-2 L'Agrp

Toutes les données bibliographiques rapportent que l'Agrp est un antagoniste des récepteurs MC3-R et MC4-R, en bloquant l'effet de l' α -MSH et d'autres agonistes qui stimulent ces récepteurs (Fong *et al.*,1997). Cependant plusieurs études (Haskell-Luevano et Monck,2001; Nijenhuis *et al.*,2001) indiquent que l'Agrp peut être plus qu'un simple antagoniste et agit comme un agoniste inverse vis-à-vis du MC4-R. L'activité d'agoniste impliquerait les effets de l'Agrp liés à l'alimentation et à l'homéostasie énergétique, de façon indépendante de l' α -MSH ou d'autres ligands des récepteurs des mélanocortines.

2-2-1 Structure du gène de l'Agrp et expression tissulaire (figures 22a et b)

Le gène codant pour l'Agrp humaine est constitué de 4 exons et mesure 1,1 kb sur le chromosome 16q22. L'Agrp humaine comprend 132 acides aminés et montre une homologie avec les rongeurs qui comptent 131 acides aminés (Shutter *et al.*,1997). La protéine Agrp contient 9 résidus cystéine en des positions stables permettant d'établir des ponts disulfure qui sont importants pour sa fonction.

Les profils d'expression de l'Agrp humaine et murine montrent une présence prédominante des 2 orthologues dans l'hypothalamus et les noyaux sub-thalamiques, et des transcrits plus courts dénués d'exon 5' non codant au niveau de la surrénale, et un niveau d'expression plus faible dans le testicule, le poumon, le rein, la moelle épinière et dans les ganglions du tronc dorsal (Beltramo *et al.*.,2003). L'Agrp est détectée dans la glande surrénale avec une proportion de 16% comparée à celle exprimée dans l'hypothalamus (Li *et al.*,2000). L'exon 5' non codant montre une activité significative du promoteur dérivé d'une lignée cellulaire ovarienne du hamster chinois (Brown *et al.*,2001). Cela suggère que cet exon pourrait jouer un rôle dans l'expression périphérique de l'Agrp, avec l'existence de 2 promoteurs chacun responsable d'une expression spécifique soit au niveau du cerveau, soit au niveau périphérique (la surrénale, le testicule et le poumon). L'Agrp a aussi été identifiée chez le porc (Halverson *et al.*, 2002), le mouton (Adam *et al.*,2002), le poisson Fugu (Klovins *et al.*,2004), le poisson zèbre (Song *et al.*, 2003), la caille japonaise (Boswell *et al.*,2002).

2-2-2 Rôle de la structure de l'Agrp

La plupart des études qui ont ciblé la fonction de l'Agrp *in vivo* ont utilisé la fonction C-terminale de l'Agrp qui mime l'effet de la protéine entière. Les peptides synthétiques de l'extrémité N terminale hAgrp (aa₂₅₋₅₁) et de la portion centrale hAgrp (aa₅₄₋₈₂) sont dénués d'une action antagoniste vis-à-vis de l' α -MSH (Quillan *et al.*, 1998)) alors qu'une variante synthétique contenant les 46 résidus C terminaux, hAgrp(aa₈₇₋₁₃₂) a une action aussi forte (Haskell-Luevano et Monck, 2001). De plus, le peptide hAgrp (aa₈₇₋₁₃₂) est capable de se lier aux récepteurs MC3-R, MC4-R et MC5-R et inhiber la liaison de l' α -MSH (Fong *et al.*, 1997; Nijenhuis *et al.*, 2001). L'élongation par 2 acides aminés d'un décapeptide central de l'Agrp, antagoniste de MC4-R mais pas de MC3-R aussi bien au niveau de l'extrémité C que N terminale confère aussi une fonction antagoniste pour le MC3-R qui ressemble à celle de la totalité de l'Agrp (Joseph *et al.*, 2003). Ces données montrent l'importance de la partie C terminale dans l'action antagoniste de l'Agrp sur les MCRs. L'injection icv unique de l'Agrp (aa₈₃₋₁₃₂) augmente la prise alimentaire, alors que les parties N terminales aa₂₅₋₅₁ et ₅₄₋₈₂ ne l'affectent pas. Cependant l'injection d'une quelconque de ces 3 portions d'Agrp entraîne une diminution de la consommation d'oxygène et de la température du colon qui provoquent toutes les deux une dépense énergétique, alors que les deux portions N terminales sans action sur MC4-R augmentent le poids corporel, le poids des tissu adipeux, épidydimaire et mésentérique malgré l'absence d'une hyperphagie.

L'explication de cette indépendance vis à vis des mélanocortines peut être une interaction potentielle avec des co-récepteurs tels que le syndecan 3 (Reizes *et al.*, 2003) qui ne peut se lier qu'à la partie N terminale de l'Agrp.

Récemment, Creemers *et al.* (2006) ont montré que la partie C terminale de l'Agrp agit comme un antagoniste endogène du récepteur MC4-R et que la partie N terminale de l'Agrp se lie au Syndecan-3 qui ainsi module les effets de l'extrémité C terminale au niveau du MC4-R. Le syndecan-3 semble influencer la prise alimentaire indépendamment de MC4-R car l'Agrp est clivée par des proconvertases PC1/3 avant sa sécrétion. Il est aussi montré que l'Agrp₍₈₃₋₁₃₂₎ est un antagoniste plus puissant que l'Agrp avec sa structure complète, alors que l'injection icv de l'Agrp₍₂₅₋₄₇₎ et d'Agrp₍₅₀₋₈₀₎ n'a pas d'effet sur le poids corporel, la prise alimentaire ou la température corporelle, suggérant que le clivage post-transcriptionnel est requis pour potentialiser l'effet de l'Agrp sur MC4-R.

2-2-3 Sécrétion de l'Agrp

Récemment un rythme circadien très prononcé du gène codant pour l'Agrp a été mis en évidence avec une forte corrélation avec la prise alimentaire. Le moment de sa plus forte expression correspond à 8 heures après le pic de la prise alimentaire nocturne, suggérant que l'Agrp surrénalienne pourrait ne pas jouer un rôle direct dans l'initiation de l'alimentation nocturne (Stütz *et al.*, 2007). De même l'injection du fragment ^{125}I -Agrp₈₂₋₁₃₁ dans différents tissus chez la souris révèle que l'Agrp pénètre plus rapidement dans les organes périphériques que dans le cerveau, en 10 mn dans le foie, puis dans le cœur, les poumons puis le muscle squelettique. La glande surrénale qui a une vitesse de capture modérée, a cependant le plus haut volume de distribution. Par contre d'autres organes tels que le testicule, l'épididyme, et le pancréas ont une perméabilité réduite pour l'Agrp. Cette capture de l'Agrp par le foie et l'épididyme est très augmentée chez les souris à jeûn au cours de la nuit, alors qu'elle est diminuée dans la glande surrénale.

2-2-4 Interaction de l'Agrp avec le récepteur MC4-R

Un modèle tri-dimensionnel du récepteur MC4-R de souris avec le ligand hAgrp₍₈₇₋₁₃₂₎ localisé à l'intérieur du récepteur a été développé afin d'identifier les interactions récepteur-ligand antagoniste (**figure 23**). Ces interactions font intervenir le résidu Arg111 de hAgrp₍₈₇₋₁₃₂₎ qui réagit dans une poche de charges négatives localisée dans une cavité formée par les hélices transmembranaires (TM) 1, 2, 3, et 7, qui est coiffée par la première boucle extracellulaire acide (EL1) et avec la conservation spécifique des résidus Glu92(TM2), Asp114 (TM3) et Asp 118 (TM3) du sMC4-R. De plus, Phe112 et Phe113 de l'hAgrp₍₈₇₋₁₃₂₎ réagissent de manière putative avec une poche de groupements aromatiques hydrophobes formée par les résidus Phe176 (TM4), Phe193 (TM5), Phe253 (TM6), et Phe254 (TM6).de sMC4-R. Afin de valider ce modèle complexe Agrp-MC4-R il a été généré 9 ligands chimériques basés sur une amorce modifiée de l'hAgrp₍₁₀₉₋₁₁₈₎ (Tyr-c[Asp-Arg-Phe-Phe-Asn-Ala-Phe-Dpr]-Tyr-NH(2)). Dans ces ligands chimériques, les résidus antagonistes de l'Agrp, Arg-Phe-Phe sont remplacés par les acides aminés de l'agoniste His/D-Phe-Arg-Trp. Ces peptides ont une activité agoniste sur les récepteurs MC1-R et MC3-5R. Mais une nouvelle amorce correspondant au peptide mélanocortinergique, Tyr-c[Asp-His-DPhe-Arg-Trp-Asn-Ala-Phe-Dpr]-Tyr-NH(2) est mise en évidence. Ce peptide a une activité équivalente à l' α -MSH au niveau des récepteurs sMC1, sMC3, et sMC5-R, mais est 30fois plus puissant que l' α -MSH pour sMC4-R. Une autre séquence peptidique 200 fois plus sélective pour MC4R que MC3R a été développée: Tyr-c[Asp-DPhe-Arg-Trp-Asn-Ala-Phe-Dpr]-Tyr-NH(2) (Wilczynski *et al.*, 2004).

2-2-5 Action de l'Agrp

2-2-5-1 sur la prise alimentaire

L'Agrp est produit de façon prédominante par une population de neurones du noyau arqué de l'hypothalamus. Cette population neuronale exprime aussi le neuropeptide Y (NPY) qui est aussi un puissant agent orexigène. L'Agrp est l'un des plus puissants peptides orexigènes connus à l'heure actuelle et il est caractérisé par son effet long et prolongé sur la prise alimentaire. Ainsi les animaux montrent une hyperphagie même 7 jours après l'injection unique d'Agrp par voie icv (Hagan *et al.*, 2000). Les souris transgéniques surexprimant l'Agrp montrent une sévère obésité, une augmentation de la croissance corporelle, une hyperinsulinémie, une installation tardive de l'hyperglycémie, une hyperplasie des îlots pancréatiques et une diminution des niveaux de la corticostérone (Graham *et al.*, 1997). Ces effets de l'Agrp supposent qu'ils sont médiés essentiellement par le cerveau, puisque les orthologues d'Agrp murine et humaine stimulent l'hyperphagie quand ils sont administrés par voie icv (Hagan *et al.*, 2000; Small *et al.*, 2003). Le mécanisme de cet effet prolongé n'est pas expliqué, mais il semble qu'il soit indépendant du blocage persistant des récepteurs aux mélanocortines (Hagan *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002).

2-2-5-2 Sur d'autres fonctions physiologiques

L'injection icv de l'Agrp humaine à des femelles de Rhesus monkey ovariectomisées fait augmenter la sécrétion du cortisol, de l'ACTH, et de la prolactine (Yang *et al.*, 1999). L'Agrp exerce aussi un effet stimulateur sur l'axe gonadotrope chez le rat mâle (Stanley *et al.*, 1999). De plus, l'injection icv d'Agrp accroît la capacité des IL-1 β sur la sécrétion de l'ACTH probablement en affectant la fonction de l' α -MSH au niveau des récepteurs hypothalamiques aux mélanocortines (Dandona *et al.*, 2004) confortant ainsi le rôle modulateur de l'Agrp dans les réponses endocrines à l'inflammation, qui pourrait elle même entraîner l'obésité et le diabète de type 2. D'autre part, il est démontré que l'Agrp supprime l'expression du TRH et diminue les concentrations des hormones thyroïdiennes circulantes démontrant ainsi un effet inhibiteur sur l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (Fekete *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré que des souris déficientes en Agrp (Agrp^{-/-}), nourries avec un régime riche ou pauvre en lipides ont une plus faible mortalité comparées aux souris contrôles (Redmann et Argyropoulos, 2006).

3- Les antagonistes synthétiques (tableau 2)

La substitution d'un volumineux acide aminé aromatique D-Nalt (2) de l'ACTH₄₋₁₀ conduit à un antagoniste du MC3-R et MC4-R nommé SHU9119 (Ac-Nle⁴-c[Asp⁵, D-Nalt (2), Lys¹⁰] α -(4-10)-NH₂) (Hruby *et al.*, 1995). L'effet antagoniste de ce composé a été observé chez la souris dans le modèle de l'obésité (Fan *et al.*, 1997), et dans les modèles d'inflammation aigue (Getting, 2002). D'autres substitutions dans l'ACTH₁₋₃₉ ont donné l'antagoniste du MC4-R, HS014 (Schioth *et al.*, 1998) qui bloque la formation d'AMPC par α -MSH dans les cellules COS-1 transfectées avec MC4-R. La substitution des résidus d'acides aminés aromatiques en certaines positions entraîne aussi une augmentation de la sélectivité de MC3-R (Grieco *et al.*, 2000). D'autres molécules appelées PG901 et PG911 ont été synthétisées par la substitution d'acides aminés aromatiques et se comportent comme des agonistes complets de MC5-R, mais aussi comme des antagonistes de MC3-R et MC4-R chez l'homme (Grieco *et al.*, 2002).

IV- Régulation de la stéroïdogénèse surrénalienne par le système mélanocortinergique

La fonction majeure des récepteurs MC3-R et MC4-R est de réguler respectivement la dépense énergétique et la prise alimentaire mais ils interviennent également dans le contrôle d'autres fonctions importantes comme la stéroïdogénèse.

1- Présence et rôle de MC3-R

L'ARNm du MC3-R a été décrit dans la surrénale de rat (Dhillon *et al.*, 2003) et de poulet (Takeuchi et Takahashi, 1999). Cependant il n'est pas présent dans les mélanocytes (Getting *et al.*, 1993) et dans la glande surrénale de souris (Norman *et al.*, 2003).

MC3-R est le seul des récepteurs aux mélanocortines qui a une forte affinité pour γ -MSH et qui se trouve exprimé dans la surrénale de rat. Il a été montré que l'activation de la lipase hormono sensible (LHS), nécessaire pour l'hydrolyse de l'ester de cholestérol après activation par l' α -MSH ne conduit pas à un effet direct sur la stéroïdogénèse surrénalienne mais elle stimule l'accumulation du cholestérol libre (Pedersen et Brownie, 1987) car les souris ont un niveau de corticostérone basal normal, mais qui est très diminué en réponse à une administration d'ACTH (Li *et al.*, 2002). Aussi, le rôle régulateur de MC3-R dans l'action de α -MSH sur l'activité de HSL reste controversé (Harmer et Bicknell, 2005) car la signalisation via des mécanismes AMPC-dépendants (Roselli-Reh fuss *et al.*, 1993) n'est pas observée avec une molécule synthétique, Lys- γ_3 -MSH (résidus 50 à 74 chez le rat). Celle-ci potentialise l'action de l'ACTH (Pedersen et Brownie, 1987), et n'entraîne pas d'accumulation intracellulaire d'AMPC, ni d'augmentation d'ACTH au niveau basal (Farese *et al.*, 1983). Malgré la forte

affinité du MC3-R pour les peptides γ -MSH, il est suggéré l'existence d'un récepteur surrénalien potentiel pour les peptides α -MSH, autre que les 5 récepteurs aux mélanocortines déjà connus (Harmer et Bicknell, 2005)

2- Présence et rôle de MC4-R

L'ARNm codant pour MC4-R a été détecté par RT PCR au niveau du tissu surrénalien humain isolé des zones réticulée et fasciculée, chez le rat et dans les cellules corticosurréaliennes bovines (Doghman *et al.*, 2004; Dhillo *et al.*, 2003). MC4-R est aussi exprimé dans les cellules H295-R (Doghman *et al.*, 2004) NDP- α MSH qui est un puissant analogue de α -MSH active aussi bien MC4-R que MC3-R et induit une sécrétion significative de cortisol au cours d'une stimulation aigue de 2 heures, ou chronique de 24h de cellules surréaliennes bovines (Doghman *et al.*, 2004; 2005). Cette observation est aussi relevée sur des cellules dispersées de la zone glomérulée de rat (Dhillo *et al.*, 2003), montrant que ces récepteurs étroitement couplés à la stéroïdogénèse sont présents à la surface de cellules de la zone glomérulée ou fasciculée de plusieurs espèces.

3- Présence et rôle de MC5-R

Dans la glande surrénale bovine, l'ARNm codant MC5-R est détecté dans la zone glomérulée mais pas dans la zone fasciculée, et cette expression est fortement stimulée en présence d'ACTH (Liakos *et al.*, 1998). L'ACTH et l' α -MSH stimulent la production d'AMPC et d'aldostérone par la zone glomérulée in vitro (Kapas *et al.*, 1996) mais l'ACTH qui lie MC2-R a un effet plus puissant. L' α -MSH se lie à MC5-R et stimule la production de IP3 et l'activation de la protéine PKC dans les cellules de la granulosa (Liakos *et al.*, 1998). Il a été montré aussi que la lipolyse est stimulée par α -MSH via MC5-R, et la sensibilité à cette hormone dépend des espèces, puisque le lapin et le cobaye sont beaucoup plus sensibles à α -MSH que les rongeurs et les primates (Boston, 1999).

4- Présence et rôle de l'Agrp

Un rythme diurne dans l'expression de l'ARNm codant l'Agrp a été mis en évidence chez le rat, avec un pic à 22h et un minimum à 10h qui coïncide avec le rythme quotidien de prise alimentaire. Ce rythme corrèle aussi avec celui de la sécrétion de la corticostérone et la diminution de corticostérone circulante abolit le rythme de l'Agrp en supprimant son

expression nocturne. Une expression d'Agrp fixe est aussi retrouvée sur des animaux surrénalectomisés traités avec une dose constante de corticostérone (Lu *et al.*,2002).

L'Agrp est détectée dans la glande surrénale avec une proportion de 16% par rapport à celle exprimée dans l'hypothalamus (Li *et al.*, 2000). La sécrétion d'Agrp par les cellules bovines de la zone fasciculée cultivées pendant 24h a été démontrée (Doghman *et al.*,2004) et les concentrations de la protéine Agrp-like sont estimées à travers son inhibition de la production d'AMPc par NDP- α -MSH dans les cellules HEK293 qui expriment MC4-R de façon stable (Doghman *et al.*,2004). Il a aussi démontré qu'un excès de la protéine Agouti chez les souris Agouti hétérozygotes (A^y/a) ou bien l'obésité ne modifient pas l'activité de l'adénylate cyclase dans la glande surrénale mais affectent la production de corticostérone. Cette production stimulée par la forskoline chez les souris A^y/a est plus élevée que chez les souris déficientes en Agouti (Iakovlev *et al.*,2004).

Par ailleurs, des niveaux plus élevés d'Agrp ont été observés dans la glande surrénale contralatérale après une surrénalectomie unilatérale (Bicknell *et al.*,2000). De même, une stimulation aiguë de 2 heures de la stéroïdogénèse par NDP- α MSH, est inhibée par des doses croissantes d'Agrp (Doghman *et al.*,2004). Cet effet est reproduit par l'antagoniste des récepteurs MC3-R et MC4-R, SHU9119 aussi bien que par un antagoniste plus puissant de MC4-R, JKC363 (Doghman *et al.*,2007). Cependant une réponse aiguë à l'ACTH n'est pas modifiée en présence d'Agrp. L'Agrp antagonise aussi l'effet chronique de NDP- α MSH (Doghman *et al.*,2005), mais exerce un effet biphasique soutenu sur l'effet à long terme de l'ACTH avec une inhibition entre 10^{-10} M et 10^{-8} M, qui disparaît à 10^{-7} M. Ces effets suggèrent que l'action soutenue de l'Agrp sur la stimulation de la stéroïdogénèse par l'ACTH n'est pas liée à ses propriétés antagonistes envers les récepteurs MCRs, mais intervient dans un mécanisme alternatif qui reste à définir mais pourrait impliquer l'existence d'autres sites spécifiques de liaison de l'Agrp (Doghman *et al.*,2007).

V- Rôle d'autres hormones dans la régulation de la stéroïdogénèse surrénalienne

1- La leptine

La leptine (appelée aussi protéine OB), un produit du gène *Lep/ob* a été découverte en 1994 par Friedman et ses collaborateurs (Zhang *et al.*,1994). Elle a poids moléculaire égal à 18kD contenant une séquence qui est clivée pour produire l'hormone mature de poids moléculaire 16kD (Zhang *et al.*,1994). Les études initiales ont suggéré que la leptine est synthétisée seulement par le tissu adipeux blanc, mais il est maintenant reconnu que l'hormone est produite

dans plusieurs autres tissus comme le tissu adipeux brun, l'estomac, le placenta, la glande mammaire, les follicules ovariens, certains organes chez le fœtus comme le cœur, l'os et le cartilage et dans le cerveau.(Trayhurn et Beattie 2001; Masuzaki *et al.*,1997). Le gène *ob* est exprimé dans tous les tissus où se dépose la graisse mais le tissu adipeux sous-cutané exprime des niveaux d'ARNm d'*ob* plus élevés que la graisse omentale (Hube *et al.*,1996; Montague *et al.*, 1998). Une mutation du gène *ob* résultant en une absence de leptine circulante conduit à phénotype de souris *ob/ob* obèse et hyperphagique, qui peut être normalisé par l'administration de leptine (Campfield *et al.*,1995, Halaas *et al.*,1995; Pelleymounter *et al.*,1995). De façon similaire des mutations entraînant l'absence de leptine bioactive chez l'homme causent une sévère obésité et un hypogonadisme (Montague *et al.*,1997; Strobel *et al.*,1998) qui peuvent être améliorés par une thérapie à la leptine aussi bien chez l'enfant (Farooqi *et al.*,1999) que l'adulte (Licinio *et al.*, 2004).

1-1 Les récepteurs à la leptine

Un ou plusieurs isoformes des récepteurs de la leptine (OB-R) ont été trouvés dans la plupart des tissus (Hoggard *et al.*,1997) incluant le tissu adipeux blanc, suggérant que cette hormone pourrait avoir une action autocrine et paracrine dans le tissu adipeux. Les récepteurs de leptine existent sous plusieurs variantes (OB-Ra et OB-Re) et appartiennent à la super-famille des récepteurs aux cytokines qui utilisent la voie de signalisation JAK-STAT. Ces différentes formes de récepteurs peuvent être divisés en 3 classes: long, court et sécrétés (Tartaglia,1997; Ge *et al.*,2002). La forme courte du récepteur a été proposée pour le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (El Haschimi *et al.*,2000), alors que la forme sécrétée se lierait à la leptine circulante pour moduler son activité biologique (Ge *et al.*,2002).

La forme longue du récepteur OB-Rb diffère des autres formes de récepteurs par un long domaine intracellulaire nécessaire à l'action de la leptine (Lee *et al.*,1996). L'expression des récepteurs de leptine (OB-R) est aussi présente dans le cortex surrénalien de l'homme (Glasow *et al.*,1999;2000), de souris (Hoggard *et al.*,1997), de rat (Malendowicz *et al.*,2003;2004) et de bovin (Chelikani *et al.*,2004). Au niveau central, OB-Rb est trouvé essentiellement dans l'ARC, le NPV, DMH, et la LHA (Mercer *et al.*, 1996; Guan *et al.*,1997; Håkansson *et al.*,1998) et dans le tronc cérébral (Buyse *et al.*,2001).

1-2 Rythme de sécrétion de la leptine

Chez l'homme, il existe un rythme de sécrétion au cours des 24 heures. En général, le rythme circadien est caractérisé par des concentrations basales entre 8h00 et 12h00, qui augmentent progressivement jusqu'à un pic entre 24h00 et 4h00 du matin, pour diminuer progressivement jusqu'à un minimum à 12h00 (Sinha *et al.*, 1996). Cette augmentation nocturne de la leptine est consécutive à l'absorption d'aliments et l'hyperinsulinémie cumulées au cours de toute la journée (Sinha et Caro, 1998). Contrairement aux rongeurs, la stimulation de la sécrétion de leptine chez l'homme ne paraît pas être consécutive au repas mais elle est sécrétée avec des pulses réguliers avec des intervalles inter-pic de l'ordre de 44 minutes, et le rythme circadien est attribué à l'amplitude du pic. Ces rythmes circadiens sont observés chez les patients obèses et l'hyperleptinémie chez ces patients pourrait être due à l'augmentation de l'amplitude du pulse. Ces fluctuations de la leptine sanguine impliquent que des composants nerveux et neuro-hormonaux régulent la sécrétion à partir des adipocytes (Sinha *et al.*, 1996).

1-3 Action de la leptine sur la prise alimentaire

La leptine circulante est transportée à travers la barrière hémato-encéphalique via un processus saturable (Banks *et al.*, 1996). La régulation du transport peut être un important modulateur des effets de la leptine sur la prise alimentaire. Le jeûne réduit le transport, alors que la reprise de l'alimentation augmente le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (Kastin et Pan, 2000). Après sa liaison à ses récepteurs dans l'hypothalamus, la leptine stimule une cascade de signalisation spécifique qui résulte en une inhibition et une diminution du taux de plusieurs neuropeptides orexigènes, tels que le NPY, la MCH, les orexines et l'Agrp alors qu'elle stimule d'autres peptides anorexigènes comme l' α -MSH qui agit sur le récepteur MC4-R, le CART et la CRH (Jequier, 2002).

Les afférences vagales sont également connues pour être le trajet emprunté par des peptides périphériques anorexigènes tels que la leptine pour signaler les centres satiétogènes (Peters *et al.*, 2005). Ainsi la leptine active les afférences vagales innervant les intestins (Gaige *et al.*, 2002), l'estomac (Wang *et al.*, 1997) et le duodénum (Peters *et al.*, 2007).

Une étude très récente chez le rat montre que les neurones sensibles à la réponse anorexigène de la leptine sont localisés de façon primordiale dans le noyau sous-médian du NTS (mNTS) du cerveau postérieur, qui constitue la zone-clé de projection des afférences vagales provenant du tractus gastro-intestinal (Huo *et al.*, 2008). La réponse de ces neurones à la leptine est activée par une distension de l'estomac, et la leptine réduit la prise alimentaire de façon efficace même si la distension gastrique n'est pas suffisante. Paradoxalement, Sachot *et*

al.,(2007) montrent que la leptine n'agit pas sur les centres de la satiété du cerveau principalement par la voie des afférences vagales, mais elle utilise la voie humorale, car l'injection intrapéritonéale de leptine inhibe la prise alimentaire et le poids corporel chez le rat, et induit l'expression de c-fos dans le NTS, mais cette inhibition n'est pas abolie par une vagotomie qui entraîne des variations d'expression d'ARNm codant pour l'Agrp et la POMC.

1-4 Obésité et résistance à la leptine

En dépit du fait que la plupart des adultes humains et les rongeurs obèses ont des taux élevés de leptine, cette hyperleptinémie n'entraîne ni une diminution de l'appétit, ni une augmentation de la dépense énergétique. Cet état caractérise une résistance à la leptine. De rares exemples imputent l'apparition de l'obésité chez l'homme à la mutation d'un seul gène, appelée aussi obésité monogénique, mais la plupart des obésités seraient la conséquence d'une interaction polygénique avec l'environnement (Tschops et Heiman.,2001). Par ailleurs, il est estimé qu'environ 5% des populations obèses sont considérés comme des patients déficients en leptine qui nécessitent une leptinothérapie (Sinha et Caro, 1998).

Deux hypothèses expliquant la leptino-résistance ont retenu l'attention : d'une part, la défaillance de la leptine circulante dans l'atteinte de ses cibles centrales (Banks,2003), et d'autre part, la défaillance dans les composants de la cascade de signalisation intracellulaire du récepteur OB-Rb (Munzberg et Myers,2005). Le développement de l'obésité et de la leptino-résistance chez la souris C57BL/6J soumise au régime riche en graisse (high fat ou DIO) peut être divisé en 3 étapes: une première étape précoce caractérisée par un gain de poids corporel et le maintien d'une réponse adéquate aux effets anorexigènes de l'injection périphérique de leptine, une étape intermédiaire où la souris perd sa sensibilité à la leptine périphérique mais conserve sa capacité de réponse à la leptine administrée au niveau central, et la dernière étape pendant laquelle la souris montre une résistance totale à la leptine (El-Haschimi *et al.*,2000). Des études ont montré que les souris hétérozygotes déficientes en SOCS-3 (suppressor of cytokine signaling-3) sont plus sensibles à la perte de poids induite par la leptine et plus résistantes au développement d'une obésité induite par le régime hyperlipidique (Howard *et al.*, 2004), avec un niveau de POMC induit par la leptine plus important que chez les souris normales (Mori *et al.*,2004). Ces études indiquent que SOCS-3 régule de manière négative la signalisation de pSTAT3 (signal transducer and activator of transcription) induite par la leptine dans l'hypothalamus et que l'activité excessive de SOCS-3 constitue un mécanisme potentiel dans la leptino-résistance. L'hypothèse avancée alors est

que la sensibilité des neurones à POMC et des neurones NPY/Agrp à la leptine est altérée chez les souris DIO (Eniori *et al.*, 2007).

Alors qu'il est démontré que la leptino-résistance est due à une mutation homozygote du gène OB-R chez le rat Zucker (Livingston *et al.*, 2000), la souris C57BL/6J obèse sous un régime DIO a un taux normal d'OB-Rb et une augmentation de SOCS-3; cependant, elle n'arrive pas à moduler la sécrétion peptidique dans la cascade de signalisation, malgré la persistance d'une haute sensibilité du système mélanocortique à ses agonistes, probablement en raison d'une augmentation de MC4-R. Par contre chez les souris maigres, la leptine module la sécrétion de NPY/Agrp et d' α -MSH par le noyau arqué, montrant ainsi le rôle important de la sensibilité à la leptine dans le système mélanocortinergique et indiquant combien la perte de cette sensibilité contribue à la pathologie de leptino-résistance (Eniori *et al.*, 2007).

1-5 Effet de la leptine sur la stéroïdogénèse surrénalienne

Les études initiales n'ont pas montré d'effet sur la sécrétion des stéroïdes surrénaliens stimulée par l'ACTH mais plutôt un effet secrétagogue facilité de l'ACTH-like sur des cellules surrénaliennes dispersées de rat (Malendowicz *et al.*, 1997; 2003; 2004). Par contre d'autres travaux (Bornstein *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 1998; Glasow et Bornstein 2000) montrent que la leptine inhibe la sécrétion basale de cortisol et stimulée par l'ACTH des stéroïdes surrénaliens par des cultures primaires de surrénales humaines et bovines, ainsi que par la lignée NCI-H295.(Hsu *et al.*, 2006). Une inhibition similaire est observée sur des cellules surrénaliennes provenant d'adénomes humains (Szucs *et al.*, 2001). En utilisant une neurotoxine chez la femelle de rat, il a été montré que la diminution d'expression du récepteur OB-R rend la surrénale réfractaire à une inhibition par la leptine et hypersensible à l'ACTH, impliquant que la leptine peut avoir une interaction directe avec le cortex surrénalien pour moduler l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.(Perello *et al.*, 2004).

Cette réponse distincte entre les bovins et celle de l'homme pourrait être due à une sélectivité au sein des espèces, mais d'autres travaux (Pralong *et al.*, 1998, Cherradi *et al.*, 2001) montrent que la leptine inhibe la sécrétion des stéroïdes surrénaliens par des cultures primaires de surrénales humaines et bovines. Cette inhibition implique l'accumulation de l'ARNm de certaines enzymes tels que P450_{scc}, P450_{c21} et la P450_{17 α} .(17 α -hydroxylase, 17,20 lyase/desmase) par les surrénales bovines (Bornstein *et al.*, 1997; Kruse *et al.*, 1998), ou la P450_{17 α} chez l'homme (Glasow *et al.*, 1998, 1999), ou la P450_{scc} dans la lignée surrénalienne humaine

NCI-H295 (Hsu *et al.*,2006), ou bien les protéines StAR et PBR qui interviennent dans le transfert du cholestérol dans la mitochondrie (Cherradi *et al.*,2001, Salzemann *et al.*, 2004).

1-6 Signalisation de la leptine dans la glande surrénale (figure 24)

En utilisant la cholera toxine qui mime l'action de l'ACTH, Hsu *et al.*, (2006) montrent que le traitement de lignées cellulaires surrénaliennes humaines NCI-H295 avec de la leptine pendant 24 heures inhibe la sécrétion des stéroïdes surrénaliens mais pas leur sécrétion basale, ainsi que l'expression de l'ARNm codant pour la P450scc et l'activité du promoteur CYP11A1 induites par l'ACTH/cholera toxine via une région responsable de la production d'AMPc localisée entre -1,7 et -1,6kb. De manière concomittante la leptine inhibe aussi la sécrétion protéique induite par la cholera toxine comme elle active Jack2 et Akt. Ces inhibitions sont empêchées par des inhibiteurs de la Jack2 (5AG490) ou de IP3 kinase/Akt (wortmannine) ou des inhibiteurs des phosphodiesterases (PDE) qui dégradent l'AMPc, tels que l'IBMX ou SKF 94836 spécifique de la PDE3. Ces résultats ont suggéré que la leptine interfère avec la signalisation ACTH/AMPc à travers une voie Jack2-IP3/Akt-PDE3-AMPc pour sous-réguler l'expression du gène P450scc, et inhiber la stéroïdogénèse surrénalienne, et que l'obésité a une influence sur la réponse physiologique au stress, sur le métabolisme énergétique et sur la balance électrolytique.

2- L'insuline

2-1 Sécrétion de l'insuline

C'est l'hormone métabolique majeure produite par les cellules β du pancréas, ainsi que le premier signal d'adiposité (Schwartz *et al.*,1992). Les valeurs de l'insuline plasmatique varient directement avec les changements d'adiposité (Bagdade *et al.*,1967) et augmentent au moment où la balance énergétique est négative ou déficitaire (Woods *et al.*,1974). La graisse viscérale est la clé déterminante de la sensibilité à l'insuline et du niveau d'insuline plasmatique (Porte *et al.*,2002). Cependant et contrairement à la leptine, la sécrétion d'insuline augmente rapidement après un repas alors que les niveaux de leptine sont insensibles à l'ingestion d'un repas (Polonsky *et al.*,1988).

L'insuline pénètre la barrière hémato-encéphalique via un processus médié par un récepteur saturable avec des niveaux proportionnels à l'insuline circulante (Baura *et al.*,1993). Des travaux récents suggèrent que très peu ou pas d'insuline est produite par le cerveau (Woods *et*

al.,2003; Banks *et al.*,2004). Une fois l'insuline entrée dans le cerveau, elle agit comme un signal anorexigène (Marks *et al.*,1990)

2-2 Les récepteurs à l'insuline (figure 25)

Le récepteur d'insuline est composé d'une sous-unité α extracellulaire qui lie l'insuline et une sous-unité β intracellulaire qui traduit le signal et a une activité tyrosine kinase intrinsèque. Il existe de nombreux substrats récepteurs à l'insuline (IRS) avec IRS-1 et IRS-2 présents dans les neurones (Baskin *et al.*,1994; Burks *et al.*,2000). Il a été montré récemment une augmentation de l'expression des ARNm et des protéines correspondantes de IRS-1 et IRS-2 dans les cellules chromaffines surrénaliennes via l'activation Ca^{++} -dépendante de la PKC- α /ERK et une stimulation des voies PI3K et ERK (Sugano *et al.*,2006).

2-3 Action de l'insuline sur la prise alimentaire

Les neurones à NPY et à POMC sont également des cibles de l'insuline pour son action sur la prise alimentaire et le poids corporel (Schwartz *et al.*,1992; Benit *et al.*,2002). L'administration icv de l'insuline à des rats durant une privation de nourriture empêche l'augmentation hypothalamique des niveaux de NPY dans le NPV et de l'ARNm du NPY dans l'ARC induite par le jeûne (Schwartz *et al.*,1992; Air *et al.*,2002). L'administration d'insuline dans le 3ème ventricule de rats soumis à un jeûne prolongé augmente l'expression de l'ARNm de la POMC (Air *et al.*,2002). Ce dernier est réduit de 80% chez des rats diabétiques non traités, et ceci peut être atténué par un traitement périphérique à l'insuline qui réduit partiellement l'hyperglycémie (Sipols *et al.*,1995). La réduction de la prise alimentaire causée par une injection icv d'insuline est aussi bloquée par des antagonistes de la POMC (Benoit *et al.*,2002). Des souris mâles ayant subi une délétion spécifique du récepteur d'insuline au niveau neuronal ont un phénotype obèse et sont dyslipidémiques avec des niveaux élevés d'insuline plasmatique (Bruning *et al.*,2000). La diminution des récepteurs à l'insuline dans le noyau arqué médian après l'administration de l'ARN antisense dirigé contre la protéine précurseur du récepteur d'insuline entraîne une hyperphagie et une augmentation de la masse adipeuse (Obici *et al.*,2002). De même, le traitement de souris avec des substances mimant l'effet de l'insuline diminue le gain corporel produit par un régime enrichi en lipides ou au cours d'un état d'insulino-résistance (Air *et al.*, 2002). Récemment, il a été montré qu'un traitement chronique à l'insuline de tissu adipeux humain en culture organique pendant un à deux jours augmente le taux de biosynthèse de leptine, sans affecter son niveau d'ARNm (Lee *et al.*,2006). L'insuline et la leptine parmi

d'autres cytokines, partagent une voie de signalisation intracellulaire commune via IRS et l'enzyme PI3-kinase (Niswender *et al.*,2001; Porte *et al.*, 2002).

3- Les orexines

Les orexines A et B appelées aussi hypocrélines sont des neuropeptides isolés de l'hypothalamus (De lecca *et al.*,1998; Sakurai *et al.*,1998). Elles dérivent du clivage d'un précurseur de. 130-131 acides aminés, la pré-proorexine qui présente 83 % d'identité entre l'homme et le rat. Leur dénomination provient du fait qu'elles sont fortement exprimées dans les centres hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Elles exercent leurs effets via 2 types de récepteurs couplés aux protéines G, OXR 1et 2. D'autres études montrent que les orexines jouent aussi un rôle dans le système sommeil/éveil. Elles sont exprimées aussi bien chez le rat adulte que nouveau-né au niveau de l'hypothalamus latéral, dans l'éminence médiane avec une extension vers d'autres régions hypothalamiques et d'autres noyaux comme les noyaux arqué et paraventriculaire. Dans l'hypophyse, aucune expression n'a été détectée ni en ARNm, ni en protéine. Le récepteur OX1-R est largement exprimé dans les noyaux ventro et dorso-médian, alors que OX2-R est exprimé dans l'hypothalamus latéral, l'ARC et le PVN, et le noyau des tubercules mamillaires. La privation de nourriture augmente l'expression hypothalamique.des deux récepteurs (Spinazzi *et al.*,2005).

3-1 Effet sur la prise alimentaire.

Les orexines A et B stimulent l'expression de *c-fos* (Buru *et al.*,2000) et l'orexine A augmente l'expression de l'ARNm de la CRH et de l'AVP dans le NPV (Al-Barazanji *et al.*,2001). Elle stimule la sécrétion de la CRH à partir d'explants hypothalamiques, et son application sur des coupes hypothalamiques entraîne une dépolarisation et une augmentation de la fréquence du pic des neurones du NPV. L'action stimulatrice sur la CRH semble être en partie médiée par NPY via le récepteur Y1, car l'orexine augmente non seulement la décharge de la CRH mais aussi celle du NPY.

3-2 Effet sur la glande surrénale

3-2-1 Expression surrénalienne.

L'expression de l'ARNm du précurseur pré-pro-orexine a été détectée dans la glande surrénale humaine par RT-PCR (Nakayabashi *et al.*,2003), alors que l'expression protéique de pré-proorexine est notée aussi bien dans la surrénale humaine adulte que fœtale (Karteris *et al.*,

2001); mais ces résultats sont controversés par d'autres travaux qui ne montrent aucune expression des orexines dans les surrénales (Spinazzi *et al.*,2005) et pensent que l'activation des récepteurs OX-R1 et 2 a lieu par les orexines circulantes. Les ARNm de ces 2 récepteurs sont exprimés dans les zone fasciculée et réticulée, et dans la médulla, et seul l'OX1-R est exprimé dans la zone glomérulée (Mazzochi *et al.*,2001), mais Karterias *et al.*,(2001) montrent que seul OX2-R est exprimé dans la surrénale adulte et fœtale. Chez le rat, les ARNm de OX2-R sont détectés dans les homogénats surrénaux (Lopez *et al.*,1999, 2001) et dans les cellules dispersées des zones fasciculée et réticulée (Spinazzi *et al.*,2005), contrairement à un très faible niveau d'expression de OX1-R (Jöhren *et al.*,2001).

3-2-2 Effet sur la sécrétion des glucocorticoïdes

Les orexines stimulent la sécrétion des glucocorticoïdes selon deux mécanismes. Le premier indirect, via la stimulation de l'orexine A du système CRH/AVP qui augmente les taux d'ACTH et de corticostérone dans le sang (Nowak *et al.*,2000), alors que l'orexine B est inefficace. Cet effet s'exerce par les 2 récepteurs via une stimulation directe de la zone fasciculée. Le deuxième mécanisme est direct et implique une stimulation de la sécrétion des glucocorticoïdes dans les zones fasciculée et réticulée par l'orexine A (Ziolkawska *et al.*,2005) via le récepteur OX1-R et cette sécrétion est abolie par des inhibiteurs synthétiques de l'adénylate cyclase (SQ-22536) ou de la protéine kinase A (U-73122) (Spinazzi *et al.*,2005).

Ces auteurs rapportent que l'orexine A augmente non seulement l'AMPc mais aussi la production d'IP3 dans les membranes surrénales humaines (Randeva *et al.*,2001)

4- Autres peptides impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire

Le comportement alimentaire est contrôlé par le système nerveux central et principalement par l'hypothalamus qui reçoit des signaux périphériques hormonaux, neuronaux provenant du tractus gastro-intestinal. Des facteurs sociaux psychologiques et environnementaux influencent aussi ce comportement. En effet, à court terme des stimuli mécaniques signalent la présence de l'aliment dans le tractus digestif (distensions gastriques et motilité intestinale) conduisant à la sécrétion d'hormones telles que la cholécystokinine (CCK), le peptide YY (PYY). De même que des paramètres métaboliques tels que l'augmentation de la glycémie après la prise d'un repas génère un « signal glucose portal » détecté et transmis au cerveau par le système nerveux autonome. Ce signal est capable de modifier l'homéostasie glucidique et d'induire un effet anorexigène. D'autres signaux périphériques telle que la sécrétion de ghréline stimulent

l'initiation au repas. A long terme d'autres hormones telle que la leptine qui joue le rôle de «sensor» et les glucocorticoïdes renseignent sur l'état des réserves énergétique stockées respectivement dans le tissu adipeux et le foie. Ces signaux convergent vers l'hypothalamus qui intègre ces multiples signaux et induit une réponse adaptée à travers la sécrétion de peptides et neurotransmetteurs orexigènes tels que NPY, MCH, AgRP, la galanine, les opioïdes endogènes, ou par leurs antagonistes anorexigènes tels que les mélanocortines, la CART, et la CRH. La sérotonine qui agit à travers le récepteur 5HT-R et la norépinéphrine à travers les récepteurs $\beta 2$ et $\beta 3$ réduisent aussi la prise alimentaire (revue Anubhuti, 2006). Cependant ces peptides, hormones et neuropeptides ne montrent pas d'effets sur la stéroïdogénèse dans la surrénale. (**tableau 3**) (Wilding, 2002)

5- Contrôle de la prise alimentaire par l'axe surrénalien

5-1 La CRH ou CRF

CRH est un agent anorexigène et thermogénique endogène (Richard Denis, 1999). La sécrétion de CRH module la prise alimentaire en absence de stress en exerçant un effet inhibiteur sur l'appétit. et inhibe fortement la prise alimentaire dans toutes les classes des vertébrés qui ont fait l'objet d'études (Crespi *et al.*, 2004). CRH médie son action à travers l'interaction avec 2 types de récepteurs, CRF1 et CRF2 qui ont été clonés et caractérisés (Chalmers *et al.*, 1996; Turnbull et Rivier, 1997). Le récepteur CRF2 intervient essentiellement dans la suppression de la prise alimentaire et dans la réponse thermogénique au CRF et aux peptides dérivés du CRF (Martinez *et al.*, 1998; Smagin *et al.*, 1998). Les 2 ligands principaux au CRF2, la stresseptine humaine (SCP) et la stresseptine related peptide (SRP), sont capables de supprimer la prise alimentaire et le délai d'évacuation gastrique. L'injection de CRH dans le cerveau et spécifiquement dans le NPV diminue la prise alimentaire spontanée ainsi que celle induite par le jeûne (Schwartz *et al.*, 1995; Heinrichs *et al.*, 1998). L'administration chronique de CRH cause une anorexie aiguë et une perte progressive du poids corporel (Schwartz *et al.*, 1995). La CRH diminue la prise alimentaire en inhibant certains neuropeptides ou neurotransmetteurs comme le GABA, la norépinephrine, la dynorphine, et le NPY (Levine *et al.*, 1983). Inversement, le blocage des récepteurs à CRH avec des antagonistes ou des oligonucléotides anti-sens, l'immunoneutralisation ciblée du CRH dans l'hypothalamus accroît la prise alimentaire basale ou stimulée par NPY, suggérant ainsi que CRH pourrait moduler les actions des signaux orexigènes (Heinrichs *et al.*, 1995). Une privation de nourriture et l'obésité peuvent masquer l'expression du récepteur CRF type 2 dans le VMH et réduire l'expression de la

protéine liant le CRH (qui inactive la CRH) (Richard *et al.*,2000). La CRH est aussi sensible à l'action de peptides périphériques qui signalent au cerveau les fluctuations dans les réserves d'énergie, particulièrement la leptine. La leptine augmente aussi l'expression de CRH type 2 α dans le noyau du VMH, une structure-clé dans le contrôle de la sécrétion d'insuline et dans la régulation de la balance énergétique (Richard *et al.*,2000). Un deuxième peptide CRH-like, l'urocortine, produit par des neurones du noyau d'Edinger-Wesphal (Vaughan *et al.*,1995), est un inhibiteur encore plus fort que le CRH sur la prise alimentaire chez les mammifères quand il est administré par voie icv (Spina *et al.*,1996). L'urocortine qui est un peptide de 40 acides aminés est un activateur puissant des récepteurs CRF2 plus que CRF1 (Vaughan *et al.*,1995; Spina *et al.*,1996). L'urocortine réduit la prise alimentaire et entraîne une perte de poids à des doses qui n'induisent pas de stress (Spina *et al.*,1996; Asakawa *et al.*, 1999).

5-2 L'ACTH

Al-Barazanji *et al.*, (2001) ont montré que l'administration de fragments C terminaux d'ACTH humaine (ACTH₁₈₋₃₉ et ACTH₂₂₋₃₉) par voie icv à des rats soumis au jeûne pendant 16h ou pendant la phase obscure augmente la prise alimentaire; par contre des fragments N terminaux α -MSH induisent une diminution de la prise alimentaire, mais pas le fragment ACTH₁₋₁₀. Aucune modification de la prise alimentaire n'a été détectée chez les animaux alimentés sans restriction, alors que l'ACTH avec sa structure globale réduit l'alimentation aussi bien chez les animaux soumis au jeûne que ceux qui sont alimentés. Comme l'ACTH peut se lier à MC4-R avec une affinité similaire à celle de l' α -MSH et que le récepteur MC2-R n'a pas été cloné dans le cerveau, il a été suspecté que l'effet anorexigène de l'ACTH est médié par MC4-R. Par ailleurs Gantz *et al.*,(1993) ont montré que l'ACTH et l' α -MSH stimulent l'accumulation de l'AMPc dans les cellules HEK293 avec une intensité similaire, après une transfection stable avec MC4-R, alors que l'ACTH₁₋₁₀ a une faible capacité, en accord avec l'absence d'effet sur la prise alimentaire. Par contre, aussi bien l'ACTH₁₈₋₃₉ que l'ACTH₂₂₋₃₉ ne peuvent stimuler l'AMPc via MC4-R *in vitro*.. Ceci suggère que l'effet orexigène des fragments C terminaux de l'ACTH n'est pas médié par le récepteur MC4-R.(Gantz *et al.*,1993). Des effets analogues à ceux des fragments d'ACTH₁₈₋₃₉ et ₂₂₋₃₉ ont été enregistrés avec des antagonistes du MC4-R, tels que SHU9119 et les fragments C terminaux de l'Agrp₈₃₋₁₃₂ qui augmentent la prise alimentaire 8 h et 24h après l'injection icv chez des rats normaux en satiété (Rossi *et al.*,1998), alors que l'Agrp₈₃₋₁₃₂ ou le SHU9119 n'augmentent pas la prise alimentaire durant la phase obscure. Le mécanisme par lequel les fragments d'ACTH augmentent la prise alimentaire reste

à identifier. Tenant compte que seuls les fragments N-terminaux et non C-terminaux peuvent induire la stéroïdogénèse surrénalienne via le récepteur MC2-R, il apparaît que l'action de l'ACTH₁₈₋₃₉ et ₂₂₋₃₉ passe par ce récepteur. L'effet anorexigène de l'ACTH injectée par voie icv, est antagonisé par l'administration d'un agoniste du récepteur de la dopamine (β -HT) chez des rats à jeûn pendant 16 heures (Ninan et Kulkarni,1998). Une autre éventualité est avancée, qui serait que ces fragments pourraient agir par l'intermédiaire d'autres récepteurs exprimés dans le cerveau, tels que MC3-R et MC5-R (Tatro,1990). Tous les types d'hyperphagie et de syndromes d'obésité sont inversés et empêchés par une surrénalectomie et peuvent être rapidement restaurée par un traitement aux stéroïdes surrénaux (Tempel et Leibowitz, 1994). Les glucocorticoïdes qui sont désignés comme des hormones de stress à cause de leur forte augmentation dans le sang en réponse à des stimuli stressants, perturbent aussi le fonctionnement de l'axe reproducteur mâle en inhibant les signaux endocrines hypophysaires (Suter et Schwartz,1985;Contreras *et al.*,1996). En effet, les glucocorticoïdes inhibent directement la production de testostérone par les cellules de Leydig en réprimant la transcription des gènes qui codent pour les enzymes de biosynthèse (Orr *et al.*,1994), Ces changements sont accompagnés par une diminution de la libido et de la fertilité (Phillips *et al.*,1989). Cette observation est relevée aussi bien chez l'homme avec un stress psychologique (Fenster *et al.*,1997), que par un stress d'immobilisation chez le rat (Monder *et al.*,1994). D'autre part, les effets des glucocorticoïdes sont facilités par l'expression de leurs récepteurs dans les cellules de Leydig (Stalker *et al.*,1991), et leur augmentation sérique peut conduire à l'initiation d'un processus d'apoptose des cellules de Leydig (Hardy *et al.*, 2005). En participant au métabolisme énergétique, à la prise alimentaire, l'axe corticotrope pourrait-il influencer la fonction gonadotrope? Dans la deuxième partie de ce travail, nous tenterons de répondre à la question.

Deuxième partie :

Régulation de l'activité corticosurrénalienne :

Influence sur la fonction gonadotrope chez le lapin mâle

I La fonction testiculaire

1- Rôle des gonadotrophines dans la maturation des cellules de Leydig

La principale fonction des cellules de Leydig est de produire la testostérone qui est requise pour l'installation de la spermatogénèse et le maintien de la fonction de reproduction mâle. Au cours du développement, la plupart des cellules de Leydig régressent au cours des 3 premiers mois de la vie, mais certaines persistent durant la vie adulte (Ariyaratne *et al.*, 2000). Chez les mammifères, la population de cellules de Leydig responsable de la production de la testostérone apparaît durant la puberté. La maturation morphologique et fonctionnelle des cellules de Leydig paraît être dépendante de la stimulation par la LH. Les souris déficientes en récepteurs de LH ou en LH circulante (Zhang *et al.*, 2001) ne montrent pas une augmentation normale post-partum du nombre de cellules de Leydig et ont des niveaux indétectables en androgènes sériques (O'Shaughnessy *et al.*, 1998; Baker et O'Shaughnessy, 2001). De plus, le traitement à la LH de rats privés de LH ou de HCG restaure en partie la structure et la fonction des cellules de Leydig (Keeney *et al.*, 1990). De même, le traitement de souris hypogonadiques par des injections quotidiennes de LH induit une augmentation marquée de l'activité de la plupart des enzymes stéroïdogéniques (O'Shaughnessy, 1991). Par contre, la population fœtale des cellules de Leydig ne requiert pas les gonadotrophines puisque les souris déficientes en LH montrent des niveaux normaux en androgènes testiculaires et en nombre de cellules de Leydig durant le développement fœtal (O'Shaughnessy *et al.*, 1998).

2- Expression des récepteurs : Rôle de l'ACTH

Parmi les autres facteurs de croissance et récepteurs impliqués dans le contrôle de la stéroïdogénèse testiculaire fœtale, le récepteur aux mélanocortines de type 2 (MC2-R) spécifique à l'ACTH joue un rôle important. L'étude de O'Shaughnessy *et al.*, (2003) montre que le récepteur MC2-R est exprimé 100 fois plus dans les testicules de fœtus de souris que chez les adultes et que l'incubation de testicules de fœtus de souris ou de souris nouveau-nés par l'ACTH stimule la production de testostérone de 10 fois de manière dose-dépendante, similaire à celle observée avec HCG, alors que les testicules ou des cultures primaires de testicules dérivés de souris adultes ne répondent pas à l'ACTH. Cependant cette production n'est pas affectée chez les souris POMC-KO, ni par α -MSH ou γ -MSH. Ces résultats suggèrent que l'ACTH régule la production de testostérone par le testicule fœtal mais pas par celui de l'adulte. Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par Johnston *et al.*, (2007) qui montrent que l'ACTH induit une augmentation temps

-dépendante de la production d'AMP_C et de la testostérone en moins de 3 minutes, par une population de cellules de Leydig fœtales isolées de souris nouveau nées. En présence de doses maximales d'HCG et d'ACTH, il n'y pas d'effet additionnel, et l'expression d'ARNm de la StAR est multipliée par 4, alors que celle des enzymes stéroïdogènes n'est pas affectée; mais la dexaméthasone qui inhibe la phospholipase A2 ou un inhibiteur synthétique de ERK1/2 (UO126) réduisent cette production, suggérant que l'ACTH et la LH agissent à travers leurs récepteurs respectifs pour stimuler la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig foetales via l'acide archidonique, la protéine kinase A et l'activation de la StAR par ERK1/2.

3- Anatomie du testicule (figure 26)

Le testicule adulte a pour principales fonctions d'assurer la spermatogénèse et la production des hormones stéroïdes sexuelles; il est limité par l'albuginée d'où partent des cloisons qui divisent la glande en plusieurs lobules comprenant un à 4 tubes séminifères. Chez le lapin, le testicule se caractérise par une forme allongée et entouré par un tissu adipeux dense .

3-1 Les tubes séminifères

Chaque tube comporte de la périphérie vers le centre :

- la lame basale participant à la barrière sang-testicule entourée par une couche de cellules myoïdes péritubulaires synthétisant du collagène, des facteurs de croissance et des facteurs paracrines modulant la fonction Sertolienne.
- l'épithélium séminifère constitué de grandes cellules pyramidales ou cellules de Sertoli, entre lesquelles sont localisées les cellules germinales. Les cellules de Sertoli sécrètent de nombreuses substances (hormones, facteurs de croissance et de différenciation et les protéines dont l'Androgen Binding Protein ou ABP qui lie la testostérone et la 5 α -DHT) qui sont impliquées dans les fonctions endocrine et spermatogénique du testicule.

3-2 Le tissu interstitiel

C'est un tissu conjonctif lâche baigné par le liquide interstitiel; il contient des îlots de cellules de Leydig , des vaisseaux lymphatiques, des vaisseaux sanguins et des nerfs. Les cellules de Leydig qui représentent le testicule endocrine sécrètent les androgènes et d'autres substances qui interviennent par une action paracrine ou autocrine dans l'activité testiculaire, dont les dérivés de la pro-opiomélanocortine (POMC), l'activine, l'ocytocine et la vasopressine.

4 – Biosynthèse hormones stéroïdes dans le testicule (figure 27)

La synthèse des androgènes a lieu dans les microsomes dans les cellules de Leydig en utilisant les mêmes enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse surrénalienne, selon deux voies: la voie $\Delta 5$, qui comprend la synthèse de la $\Delta 5$ -prégénénolone, la déhydroépiandrosterone (DHEA), et l'androstènediol, et la voie $\Delta 4$ qui synthétise la progestérone, la 17-hydroxyprogestérone, l'androstènedione et la testostérone. Les cellules de Leydig disposent de la 5α -réductase qui catalyse la conversion de la testostérone en 5α -dihydrotestostérone (5α -DHT); l'aromatase qui convertit l'androstènedione en oestrone (E1) et la testostérone en oestradiol (E2) a une activité faible dans le testicule.

Dans le testicule de lapin, la testostérone est l'androgène majeur jusqu'à 60 jours après la naissance, puis les concentrations de la DHT sont égales ou supérieures à celles de la testostérone, ce qui constitue une particularité chez le lapin (Berger *et al.*, 1982). La maturation sexuelle chez le lapin est caractérisée par la conversion de la testostérone en DHT au niveau du testicule, mais pas au niveau plasmatique (Berger *et al.*, 1979).

5- Sécrétion et transport des androgènes

La testostérone est sécrétée dans la circulation sanguine de façon pulsatile et épisodique en réponse à la stimulation de LH. Chaque pulse de LH est suivi d'un pulse de testostérone. Une partie importante de la testostérone est sécrétée avec les autres androgènes (à faible concentration) dans le sang veineux; l'autre partie est stockée dans le testicule (Perelman et Perlman, 1994).

Une fois sécrétée la fraction majeure de la testostérone circulante (98%) est liée à des protéines de transport telles que la Testosterone Binding Globulin (TeBG), la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG), ou la ou la transcortine ou Corticosteroid Binding Globulin (CBG). La fraction libre qui représente 2% est la seule biologiquement active.

6- Mécanisme d'action des androgènes

Au niveau de la cellule cible, la testostérone traverse la membrane plasmique par diffusion passive, une partie est transformée de façon irréversible en 5α -DHT par la 5α -réductase. Une fraction de la DHT ainsi formée est utilisée pour l'action hormonale et une partie regagne la circulation, alors qu'une faible fraction est transformée par l'aromatase en oestradiol dans le tissu adipeux.

Dans la cellule cible, la testostérone et la DHT se lient à un récepteur (R) localisé au niveau cytosolique (Mowszowicz, 1989). L'affinité de ce récepteur pour la testostérone est plus faible

que pour la DHT et le complexe testostérone-R formé est moins stable que le complexe DHT-R. L'interaction du complexe avec les sites accepteurs de l'ADN nucléaire résulte en une activation de certains gènes de structure qui conduit à la synthèse d'ARNm. Ces ARNm sont ensuite traduits en protéines spécifiques, essentiellement des enzymes, qui déterminent l'action hormonale (Perelman et Perlman, 1994).

7- Régulation de la synthèse et de la sécrétion des androgènes

7-1 Régulation hypothalamique (figures 28,29)

7-1-1 Par la GnRH

La GnRH est un décapeptide synthétisé au niveau des cellules neurosécrétrices dans la surface pré-optique de l'hypothalamus. Elle est déversée dans la circulation porte-hypophysaire où elle sera liée à des récepteurs fixés sur la cellule gonadotrope de l'adénohypophyse pour moduler la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines LH et FSH (Kaiser *et al.*,1997). Sa sécrétion est typiquement pulsatile et épisodique à raison d'un pulse toutes les 60 à 90 minutes (Idelman, 1994). Sa demi-vie est brève, de 2 à 4 minutes car elle est rapidement dégradée par des peptidases circulantes comme la Tyr-Gly endopeptidase (Conn et Crowley,1991),

Son action sur les cellules gonadotropes hypophysaires intervient par:

- une interaction avec son récepteur membranaire de 110 kDa, qui entraîne une interaction récepteur-récepteur suivie d'une micro-aggrégation des récepteurs.
- une mobilisation du Ca^{++} intra cellulaire et l'activation de la phospholipase C par la protéine G qui active le système inositol phosphate à synthétiser la diacyl glycérol (DAG). L'activation de Ca^{++} active la calmoduline qui va intervenir dans la libération des gonadotrophines.
- Le calcium en combinaison avec le diacyl glycérol (DAG) active la protéine kinase C qui stimule l'expression du gène qui code pour l'ARNm de $LH\beta$ et la synthèse des récepteurs spécifiques au GnRH (Conn et Cowley, 1991).

7-1-2 Par la CRH

La CRH est un composé de 41 acides aminés, isolé pour la première fois dans l'hypothalamus de mouton (Vale *et al.*,1981), et ayant une activité biologique localisée dans la partie C terminale (Dufau *et al.*,1993). La CRH inhibe directement la sécrétion de GnRH durant le stress (Rivier *et al.*,1986) à cause des connexions existants entre les axones des neurones à CRH et les dendrites des neurones à GnRH (Maclusky *et al.*,1988). Les neurones à CRH envoient des projections axonales vers la couche externe de l'éminence médiane, où la CRH est sécrétée puis véhiculée

dans le sang porte-hypophysaire pour atteindre la glande hypophysaire (Palkovitz, 1987). La CRH exerce son action à travers un récepteur membranaire spécifique localisé sur les cellules corticotropes dans la partie anté-hypophysaire et dans le lobe intermédiaire via la voie AMPc (Wynn *et al.*,1984). La CRH stimule l'expression du gène de la POMC et active la libération des peptides mélanocortiques dérivés de la POMC tels que l'ACTH₁₋₃₉, l' α -MSH et la β -endorphine (Bruhn *et al.*,1984). La CRH et les dérivés de la POMC inhibent l'axe reproducteur par une action sur l'hypothalamus en inhibant la sécrétion du GnRH (Petraglia *et al.*,1987), entraînant une réduction de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH (Veldhuis et Johnson, 1986). Sous une stimulation de la CRH, les opioïdes ont aussi une action inhibitrice directe sur la libération de LH (Blank *et al.*,1986).

7-2 Régulation hypophysaire

7-2-1 Les gonadotrophines LH et FSH

Ce sont des glycoprotéines composées de deux sous-unités α identiques et β différentes reliées par des liaisons non covalentes. Les masses moléculaires de LH et FSH sont respectivement de 28 et 33 kDa. La synthèse de ces gonadostimulines a lieu dans la même cellule gonadotrope, et leurs sécrétions dépendent de la fréquence et de l'amplitude des quanta de GnRH arrivant à l'anté-hypophyse. L'augmentation de la fréquence des pulses (un toutes les 8 minutes) stimule préférentiellement les taux d'ARNm codant pour les sous-unités α , alors que les faibles pulses d'intervalle (1/120minutes) stimulent l'ARNm codant pour FSH β . En effet, les cellules hypophysaires en culture montrent que la sous-unité α peut être stimulée par des concentrations constantes de GnRH, mais les gènes LH β et FSH β exigent un traitement pulsatile de GnRH (Shupnik,1996). D'autre part, Kaiser *et al.*,(1993) montrent que les pulses sont importants pour le maintien de l'expression des récepteurs à GnRH sur les cellules gonadotropes.

La LH et la FSH circulantes agissent sur le testicule respectivement en stimulant la production des stéroïdes sexuels notamment la testostérone, et la spermatogénèse. La testostérone participe à son tour à la promotion de la différenciation sexuelle et l'androgénisation à l'âge de la puberté (Dupouy, 1993)

7-2-2 Action de la LH

7-2-2-1 Le récepteur à la LH

Au niveau testiculaire, le récepteur à la LH est exprimé sur les cellules de Leydig durant le développement fœtal, au cours de la période post-natale, et de la puberté à l'âge adulte. Ce

récepteur est aussi exprimé dans d'autres organes extra-gonadiques tels que la prostate, les vésicules séminales et l'épididyme, sans que l'on sache la signification physiologique de cette expression (Rulli *et al.*,2006). Le conformité structurelle et biologique qui existe entre la LH et l'hormone gonadotrophine chorionique (HCG) fait que ce récepteur LH/HCG lie les deux hormones avec la même affinité.

7-2-2-2 Mécanisme d'action de la LH (figures 30 et 31)

La liaison de LH au récepteur LH/HCG de la cellule de Leydig induit une activation de ce récepteur qui stimule le système adénylate cyclase par l'intermédiaire de la sous-unité stimulatrice de la protéine G (Gs), qui conduit à la production d'AMPc. Ce dernier stimule à son tour l'action de la PKA impliquée dans la phosphorylation des résidus thréonine (Thr) des protéines. Des concentrations élevées en LH/HCG peuvent activer l'inositol phosphate et la cascade MAPK (Hirakawa *et al.*,2002) et causent une sous régulation des récepteurs LH/HCG et une désensibilisation des enzymes stéroïdogènes dans les cellules de Leydig *in vivo*, telles que la 3 β -HSD-I et II, 17 α -hydroxylase et 17 β -HSD (Dufau *et al.*,2001). Par ailleurs, la LH et l'AMPc activent aussi la voie PKC en induisant la sécrétion de l'acide arachidonique et de ses métabolites tels IP3 afin d'assurer la transduction du signal vers le noyau, et en régulant l'expression génique de la StAR et celle de la stéroïdogénèse. Ces voies de signalisation via PKA et PKC agissent en concert et la stimulation ou l'inhibition de l'une de ces voies affecte la stéroïdogénèse (Wang *et al.*,2002). Cette action est rapide, dans les minutes qui suivent l'exposition des cellules de Leydig à la LH, et la sécrétion de testostérone déclenchée par un pulse de LH apparaît environ 40 minutes après ce pulse (Grumbach et Styne,1992).

L'action de la LH consiste principalement à activer le transport du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie par la StAR, qui comprend 2 sites de phosphorylation de PKA ser 56/57 et 194/195 respectivement dans la StAR murine et humaine (Reyes-Fuentes et Veldhuis,1993). En utilisant des cellules de Leydig tumorales de souris MA-10, Manna *et al.*,(2007) démontrent que l'activation des voies de signalisation PKA et PKC respectivement par PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) et dbAMPc/HCG est capable de phosphoryler ERK1/2. PMA stimule l'expression de la StAR mais pas sa phosphorylation, alors que dbAMPc augmente cette phosphorylation (P-StAR). Un inhibiteur de la voie MAPK/ERK, U0126, inhibe ERK1/2 et diminue l'expression de la StAR en réponse au PMA et atténue la stéroïdogénèse, mais il augmente la phosphorylation de la StAR médiée par dbAMPc.

La régulation de l'expression de la StAR fait intervenir plusieurs facteurs de transcription tels que CREB et DAX-1, ainsi que SR-B1, une lipoprotéine à haute densité qui facilite la mobilisation du cholestérol dans les cellules stéroïdogènes (Manna *et al.*, 2006). La LH stimule la stéroïdogénèse:

- en augmentant la fraction du cholestérol libre intracellulaire en augmentant le nombre de récepteurs aux LDL et en stimulant la cholestérol ester hydrolase.
- en stimulant la synthèse et l'expression des ARNm codant pour les cytochromes P450_{scc} et P450_{c17}.
- par son action trophique en assurant la multiplication et la maturation des cellules de Leydig.
- en régulant le nombre de ses récepteurs.

7-2-3 Action de la FSH

La FSH n'a de récepteur que sur la cellule de Sertoli; son effet est AMPc-dépendant et aboutit à l'activation de la PKA qui constitue une partie importante du système de transduction du signal (Means *et al.*, 1976). La FSH agit sur la cellule de Sertoli en stimulant l'expression de l'ARNm codant pour la sous-unité α de l'inhibine (Toebosch *et al.*, 1989) et de l'ARNm qui code pour les récepteurs androgéniques situés sur cette cellule (Block *et al.*, 1989). Il a été suggéré que FSH influence la fonction de la cellule de Leydig indirectement à travers les facteurs dérivés des cellules de Sertoli, comme les cytokines, des facteurs de croissance et des stéroïdes (Lejeune *et al.*, 1996). Lorsque des cellules de Leydig sont mises en co-culture avec des portions de tubes seminifères représentant le stade VII de la spermatogénèse, la sécrétion de testostérone augmente et le traitement de co-cultures avec FSH stimule la capacité stéroïdogénique avec une augmentation des récepteurs à LH et une hypertrophie du REL (Jegou, 1993). Paradoxalement, les souris FSH β -KO ont des niveaux normaux de testostérone (Kumar *et al.*, 1997) qui laisse déduire que FSH n'est pas importante pour le développement et la fonction des cellules de Leydig, mais d'autres travaux montrent que l'administration d'un anticorps anti-FSH à des rats immature ou adultes n'a aucun effet sur le poids testiculaire ou sur la testostérone sérique et testiculaire, alors qu'un recombinant de FSH administré chez ces rats augmente la production de testostérone par les cellules de Leydig en présence de HCG. De même, le blocage de l'action de FSH à l'aide d'un anticorps anti-récepteur FSH entraîne une diminution des taux d'ARNm (Sriraman et Rao, 2004) de la StAR et de IGF-I, suggérant une action spécifique de FSH dans la régulation du développement des cellules de Leydig et un rôle modulateur sur la sensibilité de LH et sur la stéroïdogénèse.

7-2-4 Action de la prolactine (PRL)

La prolactine est un polypeptide de 24 kDa sécrété par les cellules lactotropes de l'antéhypophyse. L'expression du gène du récepteur de la prolactine a été démontrée dans les testicules de plusieurs espèces tels que l'homme, le bœuf, le rat, le cerf (Hair *et al.*, 2002; Ouhit *et al.*, 1993; Jabbour et Lincoln, 1999). Ces récepteurs sont localisés sur les cellules de Leydig, dans les cellules germinales et l'interstitium, mais aussi dans les organes accessoires (Jabbour et Lincoln, 1999). Les études expérimentales ont prouvé que la prolactine agit en concert avec LH et FSH pour stimuler la fonction testiculaire chez le rat mâle, la souris, le hamster, le bœuf et l'homme (Hair *et al.*, 2002). L'addition de PRL à des explants testiculaires chez des ruminants, induit une phosphorylation des protéines de signalisation JAK (Janus kinase), et STAT (signal transducer and activator of transcription). La prolactine stimule la stéroïdogénèse en régulant les récepteurs de LH ou la biosynthèse des androgènes/oestrogènes en contrôlant les enzymes limitantes dans les cellules de Leydig (Takase *et al.*, 1990). Chez l'homme l'activation du récepteur fonctionnel de prolactine dans le canal vas-déférent induit une phosphorylation rapide de la tyrosine de JAK2 et STAT5 respectivement après 10 et 20 mn et celle de la tyrosine et de la thréonine de ERK1 et 2 après 5 mn.

Au niveau hypophysaire, PRL stimule la sécrétion de LH et FSH par les cellules gonadotropes par un mécanisme de régulation paracrine (Kugu *et al.*, 1989). Cependant la PRL seule, n'a pas d'effet significatif sur la production basale de la testostérone ou stimulée par l'HCG chez le hamster, alors que la combinaison de PRL avec LH et FSH permet de maintenir une stéroïdogénèse optimale chez le hamster hypohysectomisé (Klemcke *et al.*, 1990).

Par ailleurs il a été démontré que la prolactine stimule la sécrétion de la CRH et de l'ACTH respectivement à partir d'explants hypothalamiques et de culture primaires de cellules hypophysaires de rat (Weber et Calogero, 1991)

7-2-5 Action des hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes sont cruciales pour la différenciation post-natale des cellules de Leydig. Elles stimulent fortement la stéroïdogénèse ainsi que la prolifération des peroxyosomes cytoplasmiques et stimulent l'expression de l'ARNm et la synthèse de la StAR dans les cellules de Leydig. Des récepteurs à la triiodothyronine (T3) sont exprimés dans les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli, les cellules germinales, les cellules péritubulaires et le sperme (Maran, 2003). La Thyrosine releasing hormone (TRH), l'ARNm codant pour TRH, et les récepteurs de TRH sont aussi mis en évidence dans les cellules de Leydig (Mendis-Handagama et Siril

Ariyaratne, 2005). Il a aussi été montré que la T3 stimule directement le nombre de récepteurs à LH, les taux d'ARNm des enzymes stéroïdogéniques dans les cellules de Leydig ainsi que la sécrétion basale de testostérone, de progestérone et d'oestradiol stimulée par LH. Le facteur SF-1 agit comme médiateur dans la stimulation de la stéroïdogénèse (Maran, 2003)

Les cellules de Leydig de rats adultes rendues hypothyroïdiens produisent moins de testostérone *in vitro* en réponse à un traitement à la forskoline ou à l'isobutyrylméthyl xanthine (IBMX); cela est dû à une diminution de la production d'AMPc et de l'activité des enzymes de biosynthèse et non à des modifications des récepteurs à LH, et l'administration de T3 ou de thyroxine (T4) pendant 3h à 48h n'affecte pas la sécrétion de testostérone; cependant si les animaux hypothyroïdiens sont traités *in vivo* aux hormones thyroïdiennes la fonction des cellules de Leydig est complètement restaurée *in vitro* (Valenti *et al.*,1997).

7-3 Régulation par l'axe hypophyso-surrénalien

7-3-1 Action sur la sécrétion de la GnRH

Les mécanismes et substrats cellulaires à travers lesquels a lieu l'interaction entre les axe surrénalien et testiculaire sont encore mal compris, mais cet effet se manifeste en partie par l'inhibition de la décharge des gonadotrophines à travers l'effet des glucocorticoïdes sur l'hypothalamus ou sur l'hypophyse (Breen et Karsch, 2004; Breen *et al.*,2004; Kamel et Kubajak,1987). La preuve d'une régulation directe des cellules sécrétant la GnRH par l'axe surrénalien est fournie par les études sur la lignée cellulaire hypothalamique GTI-7 qui synthétise et sécrète la GnRH (Mellon *et al.*,1990). En effet, il est démontré que les glucocorticoïdes répriment l'expression et la décharge du GnRH (Attardi *et al.*,1997) à travers des récepteurs fonctionnels aux glucocorticoïdes qui sont exprimés dans les cellules GTI-7 (Chandran *et al.*,1994). Ceci peut être le cas chez les animaux, car les neurones à GnRH co-expriment les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR)(Ahima et Arlan,1992; Gore, 2002).

7-3-2 Action sur la sécrétion des gonadotrophines

Les études effectuées à travers l'administration de d'ACTH ou de glucocorticoïdes naturels ou de synthèse chez l'homme et d'autres espèces de mammifères confirment la corrélation entre la diminution de la sécrétion des gonadotrophines et l'élévation de la concentration plasmatique des glucocorticoïdes. Le traitement par l'ACTH présente comme avantages:

- la stimulation de la sécrétion de tous les stéroïdes et pas uniquement celle des glucocorticoïdes.

- le taux de glucocorticoïdes sécrétés en réponse à une seule injection d'ACTH peut être limité par la capacité biologique du cortex surrénalien qui élimine ainsi l'effet pharmacologique potentiel qui se produit lorsque la quantité de glucocorticoïdes exogènes administrée est très élevée.

L'action des glucocorticoïdes sur l'axe gonadique peut être aussi médié de manière alternative par le feed back des glucocorticoïdes sur la sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse. Chez le mouton l'effet des glucocorticoïdes sur l'axe gonadique est exercé essentiellement au niveau de l'hypophyse (Breen et Karsch, 2004; Breen *et al.*,2004), chez lesquels les récepteurs GR sont exprimés par les gonadotropes (Breen et Karsch,2004), et par ceux du rat (Kononen *et al.*,1993). Les récepteurs GR ont été aussi localisés dans les cellules LH-like et FSH-like de la truite (Teitsma *et al.*,1999). Des travaux récents (Gore *et al.*,2006) confirment cette rétroaction négative aussi bien avec la corticostérone qu'avec la dexaméthasone sur les taux circulants des gonadotrophines, mais pas sur l'expression des ARNm codants pour LH β , FSH β .et pour la GnRH. Par contre d'autres travaux ne montrent pas de modification dans le sang ni de la LH chez le rat (Fenske,1997), ni celles des gonadotrophines chez le cobaye (Tohei *et al.*,1997) en réponse à la dexaméthasone..

7-3-3 Les récepteurs LH/HCG surrénaliens

D'autre part il a été montré par hybridation in situ et par immunocytochimie la présence respectivement de transcrits d'ARNm codant pour les récepteurs de LH/HCG et celle de la protéine récepteur de LH/HCG sur les zones réticulée et fasciculée de la surrénale humaine (Pabon *et al.*,1996). Cette étude révèle aussi la présence de ces récepteurs sur les cellules qui contiennent l'enzyme P450_{scc}, suggérant un rôle de ces récepteurs dans la stéroïdogénèse, notamment la synthèse du S-DHEA qui est élevée chez la femme souffrant d'une absence chronique d'ovulation, et qui se caractérise par une concentration élevée de LH et des taux normaux d'ACTH. Il est aussi rapporté que HCG peut stimuler la production des androgènes à partir de cellules isolées de surrénales de cobaye qui sont similaires aux surrénales humaines d'un point de vue morphologique et fonctionnel.(O'Connell *et al.*,1994), et que HCG peut aussi stimuler la sécrétion de S-DHEA par des surrénales humaines fœtales au cours d'une gestation précoce (Seron-Ferre *et al.*,1978).

7-3-4 Les récepteurs GR des cellules de Leydig

Les glucocorticoïdes jouent un rôle fondamental dans la différenciation et la croissance des tissus en modulant l'expression génique (Schmidt *et al.*,1995). Leurs effets sont exercés à travers leurs récepteurs (GR) qui se fixent sur une séquence spécifique de l'ADN appelée éléments de réponse aux glucocorticoïdes (glucocorticoid response elements) qui sont présents sur le gène promoteur cible et qui conduit soit à stimuler la transcription ou à la réprimer (Landers et Spelsberg,1992). Les récepteurs GR peuvent aussi interférer avec l'activité transcriptionnelle de facteurs tels que le complexe de transcription AP-1 par une interaction protéine-protéine directe (Jonat *et al.*,1990). Les cellules de Leydig contiennent des récepteurs GR qui permettent aux glucocorticoïdes de réguler directement la production de testostérone (Schultz *et al.*,1993). La fonction majeure des glucocorticoïdes sur les cellules de Leydig est l'inhibition de la biosynthèse de la testostérone à travers la répression des gènes qui codent pour les enzymes de biosynthèse (Bambino et Hsueh 1981; Monder *et al.*,1994). Les glucocorticoïdes augmentent aussi la capacité des cellules de Leydig précurseurs de répondre à la LH (Engel et Frowein,1974).

De plus, les gènes modulés par les récepteurs GR, tels que la 3 α -HSD et l'IGF-I sont exprimés dans les précurseurs de cellules de Leydig (Shan *et al.*,1993; Lin *et al.*,1990), cependant le rôle de la 3 α -HSD dans les testicules n'a pas été déterminé, et la présence des récepteurs GR dans les cellules de Leydig précurseurs n'a pas été directement établie. Une diminution significative de l'expression et de l'activité de l'ARNm de la 3 β -HSD I et la 17 β -HSD type 3 est montrée dans les cellules de Leydig de rats adultes *in vivo* et *in vitro* en réponse à une dose excessive de corticostérone (Badrinarayanan *et al.*,2006). L'influence majeure de l'axe surrénalien sur la régulation de la fonction testiculaire se traduit par la modulation de la sécrétion des gonadotrophines, mais il apparaît que les glucocorticoïdes ont une action directe sur le testicule qui est indépendante de celle des gonadotrophines (Bambino et Hsueh, 1981, Welsh *et al.*,1982, Li.,1991; Schultz *et al.*, 1993).

Chez l'homme, la sécrétion de testostérone est réduite alors que les gonadotrophines ne paraissent pas être modifiées au cours d'un stress ou d'un dysfonctionnement surrénalien. Chez les patients atteints du syndrome de Cushing ou du carcinome médullaire de la thyroïde, la testostéronémie est supprimée, mais si les conditions d'hypercortisolémie sont inversées à la suite d'un traitement, la sécrétion de testostérone devient normale (Mckenna *et al.*,1979). Par ailleurs, l'administration d'un glucocorticoïde de synthèse, le méthylprédnisolone (MPL), à des rats mâles diminue rapidement la sécrétion basale de corticostérone et cet effet n'est pas empêché par un prétraitement avec un antagoniste aux récepteurs GR, Org 34850; par contre le blocage de ces récepteurs par Org 34850 empêche l'inhibition retardée de la sécrétion de corticostérone 4h et 12h

après l'administration de MPL, suggérant que les récepteurs GR interviennent dans le retard d'inhibition de la sécrétion basale de corticostérone par MPL mais pas dans sa réponse rapide (Spiga *et al.*, 2008).

7-3-5 L'activité 11 β -HSD dans les cellules de Leydig (figures 32 et 33)

Cette action des glucocorticoïdes est approfondie par la détermination du nombre de récepteurs GR dans les cellules de Leydig, de la concentration intracellulaire des glucocorticoïdes et de l'activité de la 11 β -HSD qui convertit la corticostérone (chez le rat) en son dérivé inactif, la 11-déhydrocorticostérone. La 11 β -HSD-I qui a une activité réductase (**Fig.32**) est abondamment exprimée dans les cellules de Leydig à 4 semaines post-partum seulement et qui est proche de la mi-puberté (Phillips *et al.*, 1989). Comme les niveaux de glucocorticoïdes restent stables durant la puberté, Ge *et al.*, (1997) ont étudié deux autres principaux déterminants, l'expression de l'ARNm de la 11 β -HSD et le nombre de récepteurs GR à 3 stades de différenciation des cellules de Leydig de rat, les cellules mésenchymal like de progénitures à 21 jours (PLC), les cellules de Leydig immatures (ILC) qui sécrètent les androgènes 5 α -réduits à 35 jours et des cellules adultes (ALC) capables de synthétiser la testostérone à 90 jours. Les récepteurs GR évalués par le nombre de sites de liaison de la dexaméthasone tritiée par cellule de Leydig purifiée montre que le nombre de récepteurs est bas dans les cellules PLC, et presque identique dans les ILC et les ALC, alors que les niveaux d'ARNm qui codent pour les récepteurs GR est équivalent dans les 3 stades de maturation. Les activités réductrice et oxydative de la 11 β -HSD mesurées par le taux de conversion de substrats radioactifs dans les cellules de Leydig intactes sont à peine détectables dans les PLC, intermédiaires dans les ILC et élevés dans les ALC. Le rapport des activités (oxydative/réductrice) montre que la réduction est favorisée dans les cellules PLC, alors qu'elle est oxydative dans les cellules ALC, sachant que la prédominance d'une activité oxydative de la 11 β -HSD (11 β HSD-II) conduit à une inactivation du glucocorticoïde par sa transformation en 11-déhydrocorticostérone ou en cortisone (11-déhydrocortisol), alors que l'action réductrice implique un effet opposé. Il est établi que la 11 β -HSD est oxydative dans les cellules de Leydig adultes fraîchement isolées (Gao *et al.*, 1997). Dans les cellules de Leydig qui expriment aussi les récepteurs MR chez le rat, la liaison sélective pourrait résulter d'une action inactivante de la 11 β -HSD de type 1 et/ou de type 2; ainsi l'aldostérone augmente la sécrétion de testostérone basale ou induite par la LH, puisque en présence d'un antagoniste des récepteurs MR, RU28318, cette production est empêchée (Ge *et al.*, 2005). La balance qui maintient le taux de cortisol circulant normal permet d'équilibrer entre son niveau de sécrétion et son niveau de métabolisation, et dans

le cas d'une déficience en 11 β -HSD-I, la réduction consécutive du feedback augmente la production de cortisol ainsi que celle des androgènes surrénaliens (**Fig.33**) (Draper et Stewart, 2005).

7-3-6 Les glucocorticoïdes et l'apoptose des cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont la source primordiale de testostérone dont les niveaux circulants sont déterminés par la capacité stéroïdogène individuelle des cellules de Leydig et par leur nombre. Le stress qui induit l'augmentation des concentrations sériques de glucocorticoïdes inhibe l'activité biosynthétique conduisant à la diminution de sécrétion de testostérone. L'exposition de cellules de Leydig à de fortes concentrations de corticostérone augmente la fréquence d'apoptose. Le stress d'immobilisation qui induit l'augmentation de la corticostérone est directement responsable de l'apoptose des cellules de Leydig; de même, l'accès aux récepteurs des glucocorticoïdes est modulé par l'action oxydative de la 11 β -HSD qui inactive la corticostérone en 11-DOC. En utilisant un inhibiteur de la 11 β -HSD1, l'acide glycyrrhétinique, il a été prouvé récemment que cette enzyme module la concentration de corticostérone dans les cellules de Leydig de rat, entraînant une réduction de la production de testostérone et d'expression des enzymes stéroïdogènes (Hu *et al.*, 2008). En dessous du niveau basal de glucocorticoïdes, il existe un niveau suffisant de métabolisme glucocorticoïde qui favorise un minimum de liaison aux récepteurs des glucocorticoïdes. Les cellules de Leydig expriment la 11 β -HSD1 qui a une activité oxydo-réductase bidirectionnelle ainsi que la 11 β -HSD2 qui est unidirectionnelle et oxydative. La génèse d'un potentiel redox à travers la synthèse du NADPH et la production de glucocorticoïde par la 11 β -HSD1, et l'inhibition de la stéroïdogénèse ne peut avoir lieu que sous des conditions stressantes, quand de grandes quantités de corticostérone dépassent la capacité oxydative de la 11 β -HSD. La modification de l'activité catécholaminergique pourrait contribuer à la suppression de la fonction des cellules de Leydig et expliquer la rapidité de l'inhibition. (Hardy *et al.*, 2005). Le ligand FasL (FasLigand ou CD95L) qui appartient à la famille des protéines de type TNF et son récepteur transmembranaire Fas (ou CD95, APO-1) ainsi que la Caspase sont aussi impliqués dans le mécanisme d'apoptose des cellules de Leydig induite par la corticostérone (Gao *et al.*, 2002).

7-4 La nutrition

Il existe une relation directe entre l'état nutritionnel et la sécrétion des gonadotrophines chez les mâles. Une nutrition améliorée augmente la fréquence des pulses de LH alors qu'une malnutrition

les diminue chez le mouton (Blache *et al.*,2002), alors que la privation de nourriture au cours de la croissance du veau inhibe le pulse générateur de GnRH, réduit la réponse hypophysaire au GnRH, diminue la stéroïdogénèse testiculaire et la taille du testicule et retarde la puberté (Brito *et al.*,2007). Le «metabolic sensor» permet de détecter l'état nutritionnel de l'organisme en transmettant des signaux périphériques provenant des concentrations de certaines hormones métaboliques telles que la leptine, l'insuline, l'hormone de croissance (GH) et IGF-1 en signaux neuronaux qui régulent la sécrétion des gonadotrophines. Ces hormones dont les récepteurs ont été mis en évidence sur le testicule (Abele *et al.*,1986) ont un effet sur la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig et sur la multiplication et la différenciation des cellules testiculaires chez le taureau (Wang et Hardy,2004). Récemment une étude a montré que des doses croissantes d'extrait de Khat (*Catha edullis*) contenant un stimulant amphétamine-like, la cathinone, provoque chez des lapins mâles une diminution de la fréquence des pulses de LH ainsi que les taux plasmatiques de LH et de testostérone, alors que le cortisol plasmatique est significativement augmenté de manière dose-dépendante (Nyongesa *et al.*,2008). De même l'hélénaline lactone, un agent puissant anti-inflammatoire isolé de plusieurs plantes de la famille des Asteracea inhibe la stéroïdogénèse induites par l'ACTH ou par l'hCG dans des cultures primaires de cellules de Leydig et de cellules surrénaliennes, mais cette substance n'inhibe pas la stéroïdogénèse initiée à partir du 22-OH cholestérol, suggérant que l'hélénanine inhiberait l'expression de la StAR (Supornsilchai.*et al.*, 2006).

7-5 La leptine

Plusieurs arguments montrent que la leptine agit sur la fonction de reproduction chez les rongeurs et des mammifères de plus grande taille. Chez la souris *ob/ob* stérile, l'injection de leptine recombinante restaure l'activité sexuelle, et diminue l'ingestion ainsi que les quantités de lipides corporels à des niveaux normaux (Chehab *et al.*,1996), alors que chez la souris normale la leptine administrée par voie centrale stimule la sécrétion de LH et augmente la réponse gonadotrope des cellules hypophysaires à la LH-RH (Yu *et al.*,1997). A de faibles concentrations la leptine stimule la sécrétion de LH-RH à partir d'explants hypothalamiques, ainsi que la LH et FSH de l'hypophyse de rats mâles. Chez le singe soumis au jeûne depuis 48heures, l'injection de leptine rétablit en totalité l'activité pulsatile de LH, augmente la FSH plasmatique et la testostérone et diminue le cortisol (Cunningham *et al.*,1999). De plus, l'ARNm du récepteur court de leptine a été mis en évidence dans le testicule de rat, suggérant que la leptine constitue un signal métabolique qui agit directement sur les gonades (Zamorano *et al.*,1997).

La leptine joue un rôle inhibiteur sur la stéroïdogénèse testiculaire qui explique la relation entre la diminution de sécrétion de testostérone et l'hyperleptinémie chez les hommes obèses. Cette inhibition serait liée à la diminution potentielle d'expression des gènes de facteurs contrôlant positivement la stéroïdogénèse tels que SF-1, la StAR, P450_{scc}, ainsi que l'expression du gène du récepteur de leptine OB-R et sa forme fonctionnelle OB-Rb (Tena-Sempere et Barreiro, 2002).

La présence aussi de récepteurs fonctionnels de la leptine au niveau hypothalamique co-localisés avec l'expression du gène pré-pro-NPY montre que NPY est une cible neuroendocrinienne de la leptine (Schwartz et al., 1996), et qu'il est impliqué dans la sécrétion du GnRH (Kalra et al., 1993). De même, il existe depuis quelques années une évidence croissante d'une interaction entre le syndrome métabolique et la fonction testiculaire. Le syndrome métabolique, en particulier l'obésité, affecte la fonction testiculaire en réduisant les niveaux de testostérone totale et de la SHBG (sex hormone binding globulin), comme elle a aussi un effet néfaste sur la spermatogénèse. L'homme obèse est caractérisé par une diminution progressive des niveaux de testostérone, alors que la femme affectée par un phénotype d'obésité abdominale développe un hyperandrogénisme fonctionnel. Parmi d'autres facteurs qui restent encore à définir, les mécanismes potentiellement responsables de la dichotomie sexuelle des niveaux d'androgènes interviennent des altérations spécifiques de la sécrétion des gonadotrophines, des oestrogènes, l'axe HHS, la leptine, les récepteurs aux androgènes, les enzymes spécifiques stéroïdogènes dans les tissus périphériques ainsi que la ghréline. Chez les deux sexes, les androgènes ont un rôle important et déterminant dans la distribution de la graisse corporelle, et il est admis que le niveau bas en testostérone chez l'homme ou élevé de la testostérone libre chez la femme peut induire le développement du syndrome diabétique (Pasquali, 2006).

D'autre part, l'hypogonadisme augmente la résistance à l'insuline, qui correspond au fait physiopathologique majeur dans le syndrome métabolique et le remplacement par la testostérone améliore non seulement la fonction testiculaire mais aussi les paramètres du syndrome. Même si les mécanismes physiopathologiques restent inconnus, il apparaît que la leptine, la résistine et la ghréline jouent un rôle crucial dans l'interaction entre le syndrome métabolique et la fonction testiculaire. Comme ces mécanismes affectent le système endocrinien en entier, il a été proposé de renommer le syndrome métabolique «**syndrome neuroendocrine métabolique**» (Goulis et Tarlatzis, 2008).

7-6 L'insuline

L'hyperinsulinémie et l'augmentation de la concentration en glucose sont corrélées négativement avec les niveaux de testostérone chez l'homme (Seidell *et al.*, 1990). Même s'il a été proposé que les niveaux bas de testostérone contribuent à l'insulino-résistance et au diabète de type 2, la cause de cette diminution n'est pas connue. L'hypoglycémie induite par l'insuline diminue la pulsativité de la LH chez le rat et le mouton, ainsi que la fréquence du pulse générateur de GnRH chez le rat et le singe Rhésus. Chez l'homme l'hypoglycémie en réponse à l'insuline induit une diminution rapide des niveaux de testostérone (Cummings *et al.*, 1983). En plus, la diminution du niveau de testostérone chez les patients atteints du syndrome métabolique serait la conséquence directe d'une fonction perturbée de l'axe HHS (Rosmond et Björntorp, 1998) car l'augmentation du cortisol consécutive soit à l'administration d'insuline ou d'hydrocortisone chez l'homme est suivie d'une diminution rapide du niveau de testostérone sans modification du niveau de LH (Cummings *et al.*, 1983). Cet effet suppressif sur la testostérone, corrélé à la diminution de LH alors que FSH reste stable, est due plus à l'hypoglycémie qui induit une action suppressive sur la sécrétion du GnRH, qu'à l'effet de l'insuline elle-même; cette diminution coïncide avec l'augmentation des concentrations d'ACTH, de cortisol et de DHEA, impliquant ainsi l'hypoglycémie post-insuline dans la stimulation de l'axe HHS, qui en retour exerce une action suppressive sur l'axe gonadique (Oltmanns *et al.*, 2001),

7-7 L'Agrp

Il a été démontré que l'administration icv d'Agrp₈₃₋₁₃₂ à des rats mâles stimule la sécrétion de LH et FSH après 40mn, ainsi que la sécrétion de LH-RH à partir d'explants d'hypothalamus médio basal, mais n'a aucun effet sur la sécrétion basale de LH par des cellules dispersées d'hypophyse de rat mâles ou stimulées par LH-RH (Stanley *et al.*, 1999).

7-8 Régulation par le rétrocontrôle négatif des androgènes

La testostérone néo-synthétisée dans la cellule de Leydig et déchargée dans la circulation sanguine peut exercer des effets suppressifs par un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse.

7-8-1 Au niveau hypothalamique

La testostérone exerce son action inhibitrice sur la sécrétion de la GnRH par 2 voies :

- sa conversion en oestradiol sous l'action de l'aromatase
- sa conversion en DHT par la 5 α -réductase.

Finkelstein *et al.*, (1981) montrent que l'administration de testostérone inhibe la sécrétion gonadique plus fortement chez l'homme normal que chez l'homme présentant une déficience en GnRH, suggérant ainsi que la testostérone ou l'un de ses métabolites exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH hypothalamique. Cette conclusion est renforcée par la diminution marquée de la fréquence de LH durant l'administration de la testostérone chez l'homme, et par la réduction des pulses de GnRH suivie d'une réduction des pulses de LH chez le bélier (Jackson *et al.*, 1991). D'autres études suggèrent que la testostérone altère l'abondance de l'ARNm qui code pour la pro-GnRH, régulant ainsi la vitesse de synthèse de la GnRH (Wiemann *et al.*, 1989).

7-8-2 Au niveau hypophysaire

Chez l'homme, l'administration de testostérone ralentit la sécrétion pulsatile de LH (Santen., 1975). De même qu'une infusion de DHT-T en quantité équimolaire diminue la moyenne de concentration de LH de façon similaire à celle observée avec la testostérone (Kotsuji *et al.*, 1988a); de plus, la testostérone circulante peut réguler directement la sécrétion des gonadostimulines en diminuant la concentration des récepteurs à GnRH sur les cellules gonadotropes (Dupouy *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'oestradiol peut réduire l'amplitude des pulses de LH et perturbe la réponse de LH à l'administration de GnRH, suggérant une action inhibitrice de l'oestradiol sur l'hypophyse (Deaver *et al.*, 1988).

7-9 Régulation autocrine

7-9-1 CRF et la sérotonine testiculaires

Le CRF sécrété par la cellule Leydig est un modulateur autocrine négatif important de la stéroïdogénèse induite par les gonadotrophines (Dufau *et al.*, 1993). La sérotonine qui est produite par la cellule de Leydig et par des cellules nerveuses régule la fonction locale Leydigienne en stimulant la sécrétion du CRF dans des situations de stress ou de stimulation physiologique par la LH. Cette sécrétion est favorisée par la présence de récepteurs 5-HT₂ de la sérotonine de faible capacité mais de haute affinité sur la cellule de Leydig (Tinajero *et al.*, 1993), qui est aussi couplée à la voie des phosphoinositols pour stimuler la sécrétion du CRF via un isoforme de la protéine kinase C autre que celui impliqué dans l'action du CRF. Une fois synthétisé, le CRF exerce une action inhibitrice sur la production d'AMPc et sur la stéroïdogénèse par le biais d'un récepteur spécifique de haute affinité (Ulissee *et al.*, 1990), et une action stimulatrice sur la sécrétion de β -endorphine (Dufau *et al.*, 1993).

7-9-2 Les oestrogènes

Les oestrogènes ont été découverts dans le système reproductif mâle par Staffieri *et al.*, (1965). L'expression du gène de l'aromatase a été détectée dans les cellules testiculaires de rat (Carreau *et al.*, 2004) et des cellules de Leydig humaines (Carpino *et al.*, 2007), ce qui donne une grande capacité aux cellules de Leydig d'aromatiser la testostérone en 17 β -oestradiol (Valladares et Payne, 1979). Chez les rongeurs, les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli synthétisent les oestrogènes respectivement chez les adultes et les animaux immatures, mais les cellules germinales de rats adultes constituent aussi une source d'oestrogènes (Carreau *et al.*, 2004). Ils sont produits par les gonades mâles et par les organes accessoires et la présence de récepteurs aux oestrogènes ER α et ER β a été décrite chez l'homme au niveau des testicules, de la prostate, des canaux déférents (Makela *et al.*, 2000). Récemment des récepteurs ER α 1, ER β 1 et ER β 2 ont été mis en évidence dans les cellules de Leydig tumorales (Carpino *et al.*, 2007).

Les données de la littérature montrent que l'oestradiol inhibe directement la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig (Li, 1991; Abney, 1999), ainsi que la prolifération des cellules de Leydig progéniture (PLC) qui n'est pas due à une diminution de la LH hypophysaire (Sriraman *et al.*, 2000). Il est aussi démontré que les cellules de Leydig précurseurs expriment plus fortement l'ARNm codant pour le récepteurs d'oestrogènes que les cellules adultes, et le 17 β -oestradiol sécrété localement par les cellules de Leydig agit via son récepteur par un mécanisme paracrine pour entraver le développement de ces cellules en cellules matures (Zhai *et al.*, 1996). L'oestradiol doit aussi avoir un effet direct ou indirect sur le collagène IV qui sous régule la prolifération des cellules de Leydig immatures (ILC) plus lentement que les cellules progénitures (Anbalagan et Rao, 2004), et agit sur la production de testostérone (Diaz *et al.*, 2002).

7-9-3 L'Arginine vasopressine (AVP)

Les cellules de Leydig expriment les récepteurs V1 de l'AVP qui sont couplés à l'activation de la PKC. Sécrétée par la cellule de Leydig, l'AVP inhibe la production des androgènes chez le rat en inhibant l'activité de la 17 α -hydroxylase/C17-lyase par l'activation de la sous unité inhibitrice de la protéine G (Gi) (Warren, 1989). Il a été aussi démontré que l'AVP entraîne une inhibition significative et dose-dépendante de l'expression de l'enzyme P450_{c17} et de la production de testostérone dans les cellules de Leydig de souris induite par l'AMPc et une activation de la PKC (Hales et Greene, 1998).

7-10 Régulation paracrine

Cette régulation est favorisée surtout par l'interaction existant entre la cellule de Leydig et la cellule de Sertoli.

7-10-1 Les androgènes

La présence de récepteurs androgéniques sur le noyau des cellules de Sertoli et la production locale d'androgènes favorise l'augmentation du nombre de ces récepteurs lors d'une exposition à long terme des cellules de Sertoli aux androgènes. Ces derniers diminuent l'activité de l'aromatase dans les cellules de Sertoli stimulées par FSH (Verhoeven *et al.*,1989).

7-10-2 Les dérivés de la POMC

La présence des peptides dérivés de la POMC, l'ACTH, α -MSH et la β -endorphine a été démontrée dans le testicule par des techniques immunocytochimiques (Boitani *et al.*,1986) Ces même auteurs indiquent que α -MSH augmente la production d'AMPc et d'oestradiol dans des cultures de cellules de Sertoli mais n'a pas d'effet sur la fonction de la cellule de Leydig. La β -endorphine dont les récepteurs ont été identifiés sur la cellule de Leydig a des effets contradictoires; soit une inhibition de la sécrétion de testostérone (Gerendai *et al.*,1985), soit une inhibition dose-dépendante par la β -endorphine et une stimulation par son agoniste, le naloxone (Ho *et al.*,1985) sur des cellules testiculaires dispersées de rat; ni la morphine ni le naloxone ne modifient les niveaux de testostérone lorsqu'ils sont additionnés *in vitro* à des cellules de Leydig purifiées de rat, ou administrés *in vivo* dans les testicules de rats adultes (Sharpe et Cooper,1987). L'administration de doses pharmacologiques d'ACTH augmente la sécrétion testiculaire de testostérone indépendamment des changements de LH sérique chez le lapin (Faulborn *et al.*,1979; Pitzel *et al.*,1984) et le porc (Liptrap et Raezide 1975; Juniewicz et Johnson,1981), mais pas chez le mouton (Juniewicz *et al.*,1987) ou le chien (Mialot *et al.*,1984). La perfusion de testicules de lapin, de rat, de hamster, et de chien avec α -MSH, β -endorphine ou naloxone n'a pas d'effet sur la sécrétion de testostérone, alors que la perfusion d'ACTH₁₋₂₄ humaine à 500ng/ml augmente la sécrétion de testostérone par les testicules de lapin et de cobaye, mais pas par ceux du rat, du hamster ou du chien. Dans les testicules de lapin la réponse de la testostérone à l'ACTH₁₋₃₉ humaine ou porcine est dose-dépendante mais elle reste sans effet avec d'autres fragments d'ACTH₁₋₁₇ et 1-13, 4-10, 7-36, 11-24 et 18-39.

7-10-3 LH-RH like factor

Les agonistes du LH-RH ont des effets directs sur la fonction Leydigienne médiés par des récepteurs; l'administration de ces agonistes à court terme stimule la production de testostérone mais l'inhibe à long terme (Skinner,1991) et diminuent le nombre de récepteurs à LH (Tähkä, 1989).

7-10-4 L'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

L'IGF-1 est un facteur de croissance à expression ubiquitaire et sa synthèse et sécrétion sont liées à l'hormone de croissance (GH) Sa sécrétion peut être stimulée de façon dose-dépendante par FSH sur des cellules de Sertoli en culture (Cailleau *et al.*,1990). L'IGF-1 peut stimuler la stéroïdogénèse dans la cellule de Leydig en augmentant le nombre de récepteurs LH/HCG de façon dose-dépendante (Spiteri-Grech et Nieschlag, 1992) et l'expression de l'ARNm codant pour la P450scc dans la cellule de Leydig (Lin *et al.*,1992).

Chez le rat et le porc, la LH stimule la production d'IGF-1 par la cellule de Leydig (Naville *et al.*,1990), et peut réguler la synthèse des récepteurs à IGF-1 ainsi que les niveaux de transcription et de traduction (Nagpal *et al.*,1991).

7-10-5 Transforming Growth Factor (TGF α et β)

TGF α est sécrété par les cellules de Sertoli . Il a un effet inhibiteur sur la stéroïdogénèse dans la cellule de Leydig. TGF β est synthétisé par de nombreuses cellules de l'organisme et stimule ou inhibe la différenciation cellulaire. Ses effets s'opposent à ceux d'IGF-1 en diminuant le nombre de récepteurs à LH/HCG de la cellule de Leydig de façon dose-dépendante, en bloquant la production d'AMPC et celle de la testostérone en réponse à une stimulation par LH/HCG, et en empêchant aussi l'effet stimulateur d'IGF-I sur la production d'AMP_C par la cellule de Leydig (Dupouy *et al.*,1993). Récemment un rôle de TGF α a été mis en évidence dans la régulation photopériodique de la reproduction chez les oiseaux à travers l'administration icv d'une dose physiologique de TGF α qui stimule la sécrétion de LH et la croissance testiculaire sous des jours courts (Takagi *et al.*, 2007).

7-10-6 L'inhibine

C'est une glycoprotéine dimérique de 32 kDa constituée d'une sous unité α et d'une des deux sous unités β (βA , βB) qui inhibe la libération de FSH et celle de la testostérone (Moore *et al.*, 1994), contrairement à d'autres auteurs qui suggèrent que l'inhibine stimule la stéroïdogénèse (Skinner,1991). D'autres auteurs rapportent que l'inhibine inhibe préférentiellement la synthèse et

la sécrétion de FSH (McLachlan *et al.*,1988) en réduisant l'expression de l'ARNm codant pour FSH β et en bloquant la GnRH (Kotsuji *et al.*,1988b),

7-10-7 L'Activine

Elle résulte en la combinaison des deux sous unités β en 3 formes dimériques possibles βA , βB ou $\beta A \beta B$ (Moore *et al.*,1994). Elle stimule la libération de FSH des cellules hypophysaires *in vitro* (Ling *et al.*,1986) et *in vivo* (McLachlan *et al.*,1989). L'activine stimule l'activité de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase/isomérase et la libération de testostérone (Lin *et al.*, 1989; Mauduit *et al.*,1991). Dans les cellules surrénaliennes humaines, l'activine A supprime la production de cortisol et d'androgènes ainsi que l'expression des enzymes stéroïdogénique (Wang *et al.*,2003), alors que d'autres études montrent que l'activine stimulent la production d'aldostérone et l'expression de certains gènes intervenant dans la stéroïdogénèse (Vänttinen *et al.*,2003)

7-10-8 La follistatine

C'est un polypeptide isolé du liquide folliculaire ovarien qui est décrit comme un inhibiteur de la sécrétion de FSH. Elle exerce une action neutralisante en se liant à l'activine; formant un complexe follistatine-activine qui empêche celle-ci de se lier à ses récepteurs (Utriainen *et al.*, 2006). La présence d'expression de la follistatine et l'activine a été montrée dans les cellules surrénaliennes humaines fœtales et adultes. La follistatine inhibe la mort cellulaire par apoptose induite par l'activine dans les cultures primaires de cellules fœtales humaines et de la lignée surrénaliennne H295-R.(Vänttinen *et al.*,2003)

7-10-9 Sertoli Cell Factor (SCF)

C'est une protéine de masse moléculaire d'environ 10000 à 30000 dont la production est stimulée par FSH. L'incubation de cellules de Leydig matures avec SCF stimule la production des androgènes par l'augmentation des stéroïdes en C19 via la conversion de l'androstènedione en testostérone (Verhoeven *et al.*,1989).

7-10-10 Les cytokines

Il existe une relation fonctionnelle importante entre les macrophages du tissu interstitiel et la cellule de Leydig à cause de leurs jonctions spéciales (Miller *et al.*,1983). Ces macrophages sont

une source de cytokines comme TNF α et IL-1 qui modulent la sécrétion de testostérone par la cellule de Leydig.

7-10-10-1 L'Interleukine-1 (IL-1)

L'IL-1 est sécrétée par les cellules de Sertoli mais plus fortement par les macrophages interstitiels. Une activation immune par le traitement des macrophages aux lipopolysaccharides (LPS) induit une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour IL-1 et une inhibition de l'expression des gènes P450_{C17}, une diminution de l'activité de la 17 α -hydroxylase et de la 17,20lyase (Mauduit *et al.*,1992). IL-1 inhibe aussi le transport du cholestérol vers la mitochondrie (Fauser *et al.*,1988) stimulé par l'AMPC, entraînant une diminution de production de testostérone selon la dose d'IL-1 *in vivo* et *in vitro* (Hales,1992). IL-1 β inhibe complètement la production de testostérone induite par l'AMPC, ainsi que l'expression de l'ARNm de la P450_{C17} et il semble qu'il active la voie PKC (Hales,1992).

7-10-10-2 Tumor Necrosis Factor α (TNF α)

Le TNF α inhibe la production basale de testostérone et celle stimulée par la Br-AMPC dans les cellules de Leydig de souris. TNF α induit une diminution d'expression de l'ARNm codant pour la P450_{SCC} et la P450_{C17} induite par le TNF α . Cette inhibition est dose-dépendante et réversible (Xiong et Hales,1993). Ce facteur induit aussi des changements au niveau structural et fonctionnel de la membrane de la cellule de Leydig montrées par la capacité de diminuer partiellement les récepteurs LH/HCG et celle de la production d'AMPC stimulée par HCG.. Cependant TNF α s'oppose à l'action des hormones gonadotrophiques en diminuant le transport du cholestérol vers la mitochondrie et qui implique l'étape d'hydrolyse par la CEH (Albert *et al.*, 1980), le transport par la SCP (Vahouny *et al.*,1984) et le rôle des protéines labiles de régulation (Pedersen et Brownie,1987)

7-10-11 L'adrénomédulline

L'adrénomédulline (ADM) est une hormone peptidique isolée du phéochromocytome humain, qui fait partie de la famille des gene calcitonine-related peptide (CALCA). Elle est formée de 52 et 50 acides aminés respectivement chez l'homme et le rat et exerce ses effets biologiques à travers des récepteurs like de la calcitonine (CALCRL) en association avec l'un des 3 récepteurs RAMP (receptor activity-modifying proteins). L'expression des ARNm codant pour les deux types de récepteurs et pour l'ADM a été mis en évidence dans les testicules de rat et ces

récepteurs sont considérés comme les sites de liaison spécifiques de l'ADM aux cellules de Leydig. La présence de l'ADM dans les testicules est 50fois plus forte que dans le plasma mais elle reste moins importante comparée à la glande surrénale. In vitro il est montré que l'ADM inhibe la décharge de testostérone par les testicules de rat stimulée par HCG et par l'endothéline1 (END1). D'autre part, l'ADM antagonise la contraction des cellules myoïdes péritubulaires induite par l'END1, et inhibe la production d'END1 alors que sa production est augmentée par END1. De ce fait, il est suggéré que l'ADM a un effet autocrine sur la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig à travers un mécanisme d'interaction avec l'END1 sous le contrôle des gonadotrophines (Chan *et al.*, 2007).

7-10-12 Hepatic Growth Factor (HGF)

HGF est un facteur de croissance de 87kDa identifié et caractérisé pour la première fois pour ses effets angiogènes et prolifératifs dans les cultures primaires de cellules épithéliales (Bussolino *et al.*,1992). Ce facteur est sécrété par les cellules mésenchymateuses et les organes cibles voisins des cellules épithéliales qui expriment le récepteur HGF c-met, faisant que le système HGF/c-met agit par un mécanisme paracrine pour réguler la fonction tissulaire locale. Le récepteur c-met est exprimé à 18jours chez le fœtus dans le tissu interstitiel de souris et HGF stimule la sécrétion basale de testostérone (Ricci *et al.*,2006). Les cellules de Leydig expriment aussi la c-met immunoréactive durant la période post-natale et HGF stimule la sécrétion basale de testostérone et inhibe l'apoptose dans les cellules de Leydig de la période post-natale et dans les explants de testicules (Del Bravo *et al.*,2007). Mais la stéroïdogénèse est stimulée dans les cellules de Leydig adultes humaines malgré l'absence d'expression de c-met dans ces cellules (Catizone *et al.*, 2001)

8- les facteurs de l'environnement

8-1 Photopériode et variations saisonnières

Des variations diurnes mais non saisonnières ont été mises en évidence pour la testostérone et la DHEA chez des garçons et des filles en phase de puberté (Matchock *et al.*,2007). Ces variations sont aussi observées pour la testostérone, la LH et l'oestradiol, ainsi que dans les concentrations urinaires du principal métabolite de la mélatonine, le 6-sulfatoxymélatonine chez les populations humaines exposées à une température et une photopériode extrêmes au nord et au sud du cercle arctique (pôle Nord) (Ruhayel *et al.*,2007). Un cycle saisonnier a été également rapporté pour la testostérone chez le rat du désert et la gerbille (Khammar et Brudieux,1989; 1987), le cerf

(Bubenik *et al.*,1991), et chez le bélier (Lincoln *et al.*,1990), et, ainsi que pour les gonadotrophines chez le rat du désert (Khammar et Brudieux,1991) et le cerf (Bubenik *et al.*,1991).

8-2 L'alimentation en relation avec la photopériode

Une prise alimentaire volontaire élevée est constatée durant les jours longs chez le bélier Soay intact et castré, pendant que la testostérone est diminuée chez les animaux intacts, mais elle augmente après 16 semaines d'exposition aux jours courts; ces variations sont liées avec l'expression des gènes de NPY, de la POMC qui varient respectivement positivement et négativement avec la prise alimentaire volontaire, alors que l'expression du gène codant pour le récepteur Ob-Rb de la leptine est diminuée pendant les jours courts (Anukulkitch *et al.*,2007).

II - Quelques pathologies résultant d'un dysfonctionnement surrénalien

1 - Le syndrome de Cushing

Cette pathologie correspond à un cas de résistance généralisée au cortisol ou une hyposensibilité au cortisol. Dans des cas de résistance généralisées au cortisol, les patients ont des concentrations élevées en cortisol comparées à la population saine (Lamberts *et al.*,1992). Le feed back négatif aussi bien sur la sécrétion de la CRH que l'ACTH est réduit, consécutivement à une diminution de la sensibilité aux glucocorticoïdes, ce qui entraîne une stimulation de l'axe HHS qui sécrète plus de CRH et d'ACTH, et qui se traduit par une augmentation des concentrations plasmatiques du cortisol. Cette augmentation apparaît comme une réaction compensatoire. L'hypothèse avancée est qu'au cours de la différenciation des cellules corticotropes hypophysaires, une altération génétique spontanée du locus du GR a lieu, et ces cellules deviennent insensibles au cortisol (Lamberts, 2002). Cependant les patients souffrant d'une résistance au cortisol ne montrent pas de signes ou de symptômes d'un excès de cortisol, car ils ont besoin de cette augmentation. La sensibilité aux glucocorticoïdes est diminuée au niveau hypothalamique et hypophysaire mais aussi au niveau des tissus cibles périphériques.

Le symptôme clinique observé chez les patients résistants au cortisol ne sont pas imputés à l'excès de cortisol, mais aux effets secondaires dues à l'activation de l'axe HHS et la sécrétion accrue d'ACTH qui augmente la sécrétion des minéralocorticoïdes et des androgènes surrénaliens (Lamberts *et al.*,1992). Dans d'autres cas décrits, une mutation du domaine de liaison du gène récepteur GR semble être la cause de la maladie (Ruiz *et al.*, 2001).

2 - La déficience familiale en glucocorticoïdes (FGD)

La déficience familiale en glucocorticoïdes ou l'insensibilité héréditaire à l'ACTH est une maladie autosomale récessive résultant d'une résistance du cortex surrénalien à l'action de l'ACTH. Les individus affectés par cette maladie sont déficients en cortisol et en précurseurs C19 des androgènes surrénaliens. Par contre, la production des minéralocorticoïdes régulée par le système rénine-angiotensine est normale. Cette maladie qui est observée durant la première enfance se caractérise par une hyperpigmentation, une hypoglycémie épisodique récurrente et des traces d'une déficience sévère en glucocorticoïdes, avec une croissance excessive décrite chez ces enfants. S'ils ne sont pas traités, ils succombent à une hypoglycémie ou à une infection généralisée durant la première enfance (Clark *et al.*,1993). La mutation du récepteur MC2-R compte pour environ 5% des cas souffrant de FGD appelé de type I.

Parmi ces cas, la mutation touchant le gène codant pour la protéine récepteur accessoire melanocortin 2 receptor accessory protein (MRAP). Cette protéine de 19 kDa qui appartient aux domaines des protéines transmembranaires, réagit avec MC2-R et joue un rôle dans son transfert entre le REG et la surface membranaire (Metherell *et al.*,2005). MRAP est nécessaire pour l'expression dans certains types cellulaires d'origine surrénaliennes comme les cellules Y6 et COS-3. Il est suggéré que MRAP a un rôle dans la transformation, le transfert ou la fonction de MC2-R, et que les maladies potentiellement létales causées par les mutations de MC2-R peuvent aussi être causées par des mutations du MRAP. Le FGD non accompagné de mutation du MC2-R est appelé FGD de type 2 (Naville *et al.*,1998). Dans les cas du syndrome d'Algrove appelé aussi le syndrome triple A ou ALADIN (ACTH résistance, Alacrima, Achalasia) les patients sont ACTH résistants, mais ont des mutations sur le gène AAAS qui code pour des protéines régulatrices. .

3 - L'hyperplasie surrénalienne congénitale

La différenciation et la maturation des cellules somatiques chez l'homme après la dixième semaine de gestation et après la naissance est LH/HCG dépendante, contrairement à la différenciation fonctionnelle des cellules de Leydig pendant la vie fœtale précoce qui paraît être indépendante de LH/HCG. Ceci est mis en évidence chez un patient atteint d'une mutation qui inactive le récepteur LH/HCG, causant une perte totale de la fonction de ce récepteur. Ce patient montre des organes génitaux externes féminins, mais en conservant les canaux déférents et les épидидymes (Kremer *et al.*,1995). Mais comme ces structures dérivées des canaux de Wolf ne sont formées qu'en présence des androgènes sécrétés par les cellules de Leydig durant la vie fœtal précoce, il apparaît que la fonction initiale des cellules de Leydig et leur capacité à produire la testostérone est indépendante de la HCG. De plus, il a été rapporté que la sécrétion chronique

d'ACTH stimule la production d'androgènes chez un garçon souffrant d'une hypoplasie surrénalienne-X due à une mutation dans le gène Dax I (Domenice *et al.*,2001). Dans ce cas les cellules de Leydig sont probablement la source de production d'androgènes, ce qui suggère que l'ACTH peut stimuler la stéroïdogénèse testiculaire chez l'homme dans certaines circonstances, alors que des patients souffrant d'une hyperplasie surrénalienne congénitale (CAH) développent souvent des masses testiculaires décrites comme des restes de tumeurs surrénaliennes, qui sont probablement le résultat d'un excès chronique d'ACTH. Comme les surrénales se développent dans la proximité immédiate des gonades, le tissu surrénalien aberrant adhère aux gonades et descend jusqu'aux testicules, et il est suggéré que les tumeurs gonadiques chez les patients souffrants de CAH proviennent du tissu surrénalien aberrant (Stikkelbroeck *et al.*, 2001). Ces tumeurs régressent quand les niveaux d'ACTH sont diminués par une thérapie aux glucocorticoïdes, suggérant qu'elles sont ACTH-dépendantes. Des tumeurs similaires ont été aussi rapportées chez des patients ayant d'autres désordres caractérisés par l'élévation de l'ACTH plasmatique, tels que le syndrome de Nelson (Johnson et Scheithauer,1982) ou la maladie d'Addison (Seidenwurm *et al.*,1985). D'autres auteurs montrent que les restes de tumeurs surrénaliennes testiculaires ressemblent histologiquement aux tumeurs de cellules de Leydig (Clark *et al.*,1990) et que les cellules de Leydig apparues durant la vie fœtale restent dans le testicule après la puberté, donc ces tumeurs sont identifiées comme des tumeurs gonadiques en réponse à l'ACTH plutôt que des restes de tumeurs surrénaliennes (O'Shaughnessy *et al.*, 2003).

4 - L'obésité, le syndrome métabolique et la 11 β -HSD-I (figure 34)

Toutes les études publiées s'accordent à dire que les similarités trouvées entre le syndrome métabolique et le syndrome de Cushing conduisent à l'hypothèse que l'excès de glucocorticoïdes est responsable de la pathogénèse de ces 2 maladies. Le cortisol qui est un régulateur du métabolisme du fuel au cours de la faim et du stress, et l'excès chronique en glucocorticoïdes induit l'obésité et plusieurs caractéristiques du syndrome métabolique. Ces similarités se définissent en une obésité abdominale, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline, une hypertension et une dyslipidémie. La 11 β -HSD-I qui est co-localisée avec les récepteurs aux glucocorticoïdes dans plusieurs cellules ainsi que les tissus adipeux et hépatique, et joue un rôle important dans l'amplification de l'action locale du cortisol. L'augmentation chronique de l'activité de cette enzyme augmente l'activation des récepteurs glucocorticoïdes et contribue à développer l'obésité ainsi que le syndrome métabolique, alors que sa diminution dans certains tissus contribue à inverser les complications métaboliques de l'obésité (Matsuzaki *et al.*,2001). Ainsi la souris transgénique surexprimant 11 β -HSD-I dans le tissu adipeux développe l'obésité et

les caractères du syndrome métabolique, alors que les souris KO (11 β -HSD-I^(-/-)) sont viables, fertiles et montrent une meilleure tolérance au glucose, une sensibilité à l'insuline, un profil de protection cardiaque contre les lipides et une résistance au régime DIO et ses complications; l'action des glucocorticoïdes dans les tissus adipeux et hépatiques de ces souris est réduite, et accompagnée d'une hyperplasie surrénalienne due à la stimulation de l'axe HHS. Dans ces 2 tissus qui contribuent d'environ 40 % dans le taux circulant des glucocorticoïdes chez l'homme, l'absence de la 11 β -HSD-I empêche leur régénération (Harris et *al.*,2001). Actuellement 80 firmes pharmaceutiques et organisations (Walker,2007) concentrent leurs recherches sur le développement d'inhibiteurs de la 11 β -HSD-I afin de réduire l'impact des glucocorticoïdes sur l'obésité et le diabète de type 2 (Hughes et *al.*, 2008; Saiah, 2008; Schnackenberg, 2008).

Matériels et Méthodes

Parties I et II

1- Matériel biologique

1-1 Les cellules tumorales surrénaliennes de souris ATC7-L (Adrenal tumor cells 7-left)

La lignée ATC est dérivée de tumeurs surrénaliennes obtenues en ciblant l'expression surrénalienne de l'antigène T du virus SV40 chez des souris transgéniques. Elle possède les caractéristiques de cellules de zone fasciculée avec une très bonne sensibilité à l'ACTH et exprime tous les gènes de synthèse de la corticostérone mais n'exprime pas l'aldostérone synthase (Ragazzon et al. 2006). Cette lignée a été gracieusement fournie par le docteur A. Martinez (Unité mixte 6547, CNRS, Clermont-Ferrand, France)



Figure 1 : Schéma représentant la portion de l'antigène T du simian virus 40 (SV40) exprimé dans la lignée surrénalienne ATC7-L (Razzagon et al., 2006)

1-2 Etude *in vivo* sur les surrénales de souris

Cette étude *in vivo* est réalisée sur des souris mâles de type C57BL/6J (Harlan, Le Mercoulet, France), âgées de 5 semaines et abritées à une température ambiante de 24°C avec 12 heures d'éclairement par 24 heures, et un libre accès à l'eau et à la nourriture. Les souris sont divisées en deux groupes comprenant 5 souris chacun. Le premier est nourri avec un régime standard composé de 3,1% de lipides et 16,1% en protéines et le second est nourri durant 16 semaines avec un régime riche en lipides (Diet induced obesity ou DIO) composé de 36,1% de lipides et 19,8% de protéines. Les souris de chaque groupe sont sacrifiées par dislocation cervicale, disséquées et les surrénales sont prélevées, séparées du tissu adipeux puis congelées à -80°C.

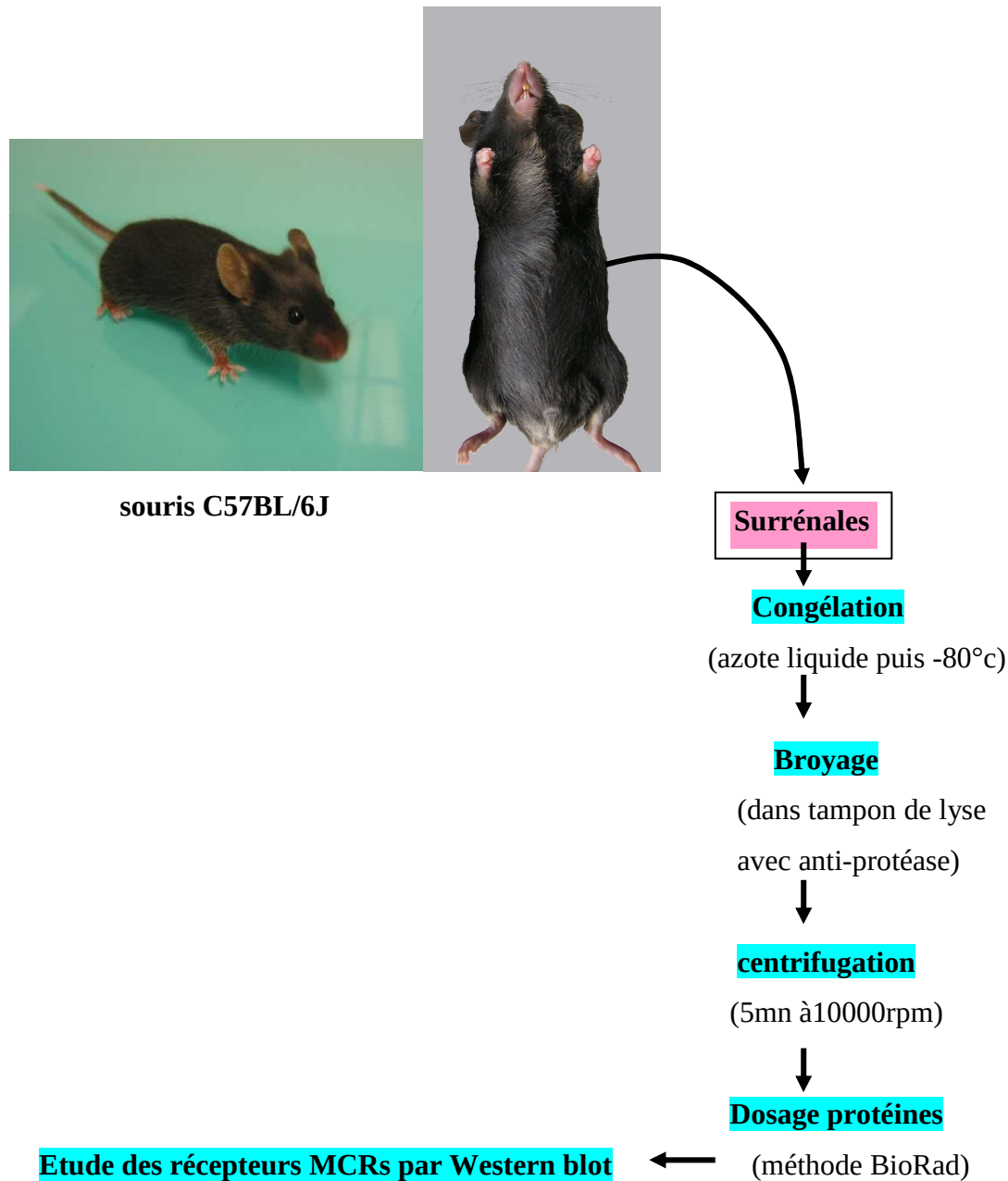


Figure 2: Prélèvement des surrénales sur les souris C57BL/6J

2- METHODES

2-1 Culture de la lignée cellulaire ATC7-L

2-1-1 Milieu de culture

La culture est réalisée sur un milieu DMEM/F12 supplémenté de 15 mM HEPES, auquel sont additionnés des éléments favorisant la croissance et la multiplication cellulaire: 1% de

pénicilline/streptomycine (P/S), 1% de L-glutamine (LGlu), 2,5% sérum de veau fœtal (SVF), 2,5% de sérum de cheval, 1% insuline-transferrine-sélénium (ITS) et 10^{-7} M de forskoline afin de maintenir les cellules dans un état différencié.

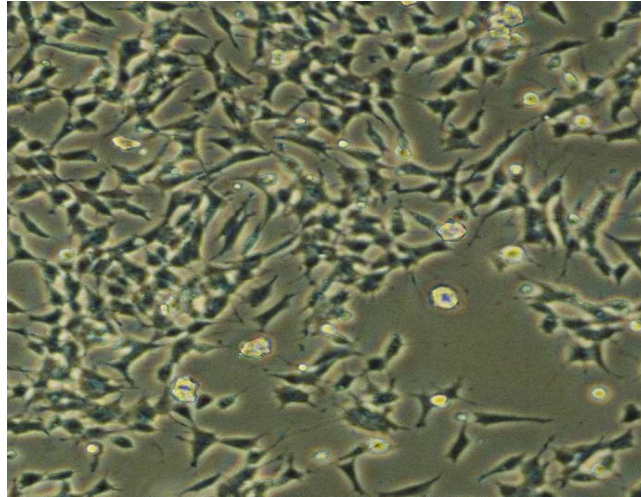


Figure 3 : Aspect des cellules surrénaliennes de la lignée ATC7-L murine en phase de multiplication dont les noyaux foncés ont une forme étirée ou triangulaire (GR:x40)

2-1-2 Conditions de culture

- Les cellules sont cultivées dans des boîtes de pétri sur poly-DLysine, à 37°C et dans une atmosphère humidifiée composée de 5% de CO₂. La poly-Dlysine constitue un support adéquat qui empêche les cellules de se décoller en favorisant leur adhésion au fond des puits.
- A 80% de confluence, les cellules sont divisées à l'aide de la trypsine-EDTA et réparties dans des boîtes à 6 puits avec une densité comprise entre 1 et $2 \cdot 10^6$ cellules par puits.
- Vingt quatre heures avant le traitement hormonal, le milieu de culture est remplacé par un milieu appauvri ne contenant que des antibiotiques (P/S à 1%) et L-Glu à 1%. Cette condition ramène les cellules à leur niveau de métabolisme basal et permet d'obtenir une réponse liée strictement aux conditions de traitement sans interférence.

2-1-3 Traitement des cellules ATC7-L

Les conditions choisies sont appliquées pendant une durée de 24heures :

- La condition contrôle est utilisée comme référence dans laquelle les cellules sont cultivées dans du milieu appauvri sans subir de traitement.

- Sept traitements sont effectués: insuline (10^{-7} M), leptine (10^{-7} M), dexaméthasone (10^{-8} M), Agrp (10^{-8} M), ACTH (10^{-8} M), NDP- α MSH (10^{-8} M) et forskoline (10^{-5} M).
- Chaque condition est testée sur 3 puits, et l'expérience est renouvelée 4 fois dans des conditions similaires.
- Après 24 heures de traitement dans certaines conditions de traitement, le milieu d'incubation est prélevé et conservé congelé à -80°C pour le dosage EIA de l'Agrp; les cellules sont immédiatement congelées dans l'azote liquide, puis conservées à -80°C jusqu'au moment de la préparation des protéines.

2-2 Extraction des protéines et analyse par Western blot

- Dans chaque puits, la lyse cellulaire est réalisée par grattage des cellules dans un tampon contenant: HEPES (20mM), DTT (0,5mM), EDTA (0,2mM), NaCl (0,42M), MgCl_2 (1,5mM), glycérol (25%), IGEPAL CA-630 (0,3%) et inhibiteur de protéases. L'extrait cellulaire ainsi récupéré est centrifugé pendant 5 minutes à 10000 rpm et la quantité de protéines dans le surnageant est estimée par la méthode colorimétrique utilisant le réactif Bio Rad (Bio Rad Holding SA, France).
- 40 à 50 μg de protéines diluées dans le tampon de lyse et le tampon échantillon sont dénaturées pendant 5 minutes à 95°C , puis déposées dans chaque puits. Une électrophorèse sur SDS-gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 10% est effectuée pour les récepteurs MC2-R, MC3-R et MC4-R. La migration est réalisée à 80V dans le gel de concentration, puis à 100V dans le gel de séparation.
- Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Immobilon P transfer, taille du pore 0,45 μm , Millipore corporation, Saint Quentin en Yvelines, France) pendant deux heures à 75V, puis colorées au rouge Ponceau
- Les sites protéiques non spécifiques sont bloqués en saturant la membrane avec du PBS-Tween 0,1% - protéines de lait 10% pendant une heure à température ambiante.
- La membrane est ensuite hybridée avec l'anticorps spécifique polyclonal IgG de lapin :
 - anti-MC2-R de souris (US Biological, Massachusetts,USA). L'immunogène est formé des 17 premiers acides aminés de l'extrémité C terminale du domaine cytoplasmique du récepteur MC2-R murin. Cette séquence est homologue à celle du rat (88%), de l'homme (82%), du porc (76%), du bovin (70%) et du poulet (64%). Cet anticorps qui ne réagit pas avec les autres récepteurs MCRs. Il est utilisé au 1:1000.

- anti-MC3R et anti-MC4-R (Abcam, Cambridge, GB) spécifiques de l'homme, du rat et de la souris. Les immunogènes sont formés respectivement de la partie C terminale de l'épitope du MC3R, et de la séquence 21-33 des acides aminés C terminaux de MC4-R. Ils n'interréagissent avec aucun des autres récepteurs. La dilution utilisée pour les deux récepteurs est 1:2000.

La membrane est incubée en présence de chacun des anticorps pendant une nuit à +4°C, ou pendant une heure à température ambiante.

- Nous avons aussi tenté de normaliser nos résultats avec un gène de référence des protéines, en hybridant la membrane avec l'anticorps anti- α ou anti- β tubuline de souris (Biotechnology, Santa Cruz, USA) dilué au 1:2000. Cependant compte-tenu des variations selon les traitements ces données n'ont pas pu être utilisées. C'est pourquoi elles ont été répétées.

- La membrane est rincée puis hybridée pendant une heure à température ambiante avec des anticorps polyclonaux IgG de chèvre anti-lapin couplée à la peroxydase à 1:2000 (Sigma).

- La chemiluminescence spécifique du complexe formé est détectée à l'aide du kit Immobilon Millipore (Millipore corporation, USA).

- L'intensité des bandes est mesurée en nombre de pixels à l'aide du programme Scion Image, et la densité de la bande correspondant à chaque traitement est comparée à celle de la bande contrôle (sans traitement) en établissant le rapport : densité bande avec traitement / densité bande sans traitement.

2-3 Extraction des ARN et RT-PCR

- Les ARN totaux des cellules ATC7-L sont extraits selon le protocole du kit Nucleospin/RNA protein fourni par Macherey-Nagel (Hoerd, France), L'intégrité des ARN est ensuite vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

- Un microgramme (μ g) d'ARN total extrait est traité avec la DNaseI pour éliminer toute trace d'ADN génomique. La transcription inverse effectuée avec la M-MLV (Moloney murine leukemia virus) reverse transcriptase (Invitrogen) est amplifiée par la Taq polymérase (Eurobio, Courtaboeuf, France). Les amorces spécifiques utilisées sont détaillées dans le tableau 1 ci-dessous.

Genes		Sequences (5'→3')
MC3-R élongation 62°C, 35cycles	Sens	CCTGGTCCTCATCATCACCT
	Antisens	CCGCAGAGAATCTCCTTGAA
MC4-R élongation 60°C, 35cycles	Sens	TCTCTATGTCCACATGTTCTG
	Antisens	GGGGCCCAGCAGACAACAAAG
AgRP élongation 55°C, 38 cycles	Sens	CTCAAGAAGACAACCTGCAGAC
	Antisens	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC
GAPDH élongation 57°C, 38cycles	Sens	ATGGGTGTGAACCACGAAATA
	Antisens	TGTCATACCAGGAAATGAGCTTG

Tableau 1 : Amorces spécifiques des gènes amplifiés par RT-PCR

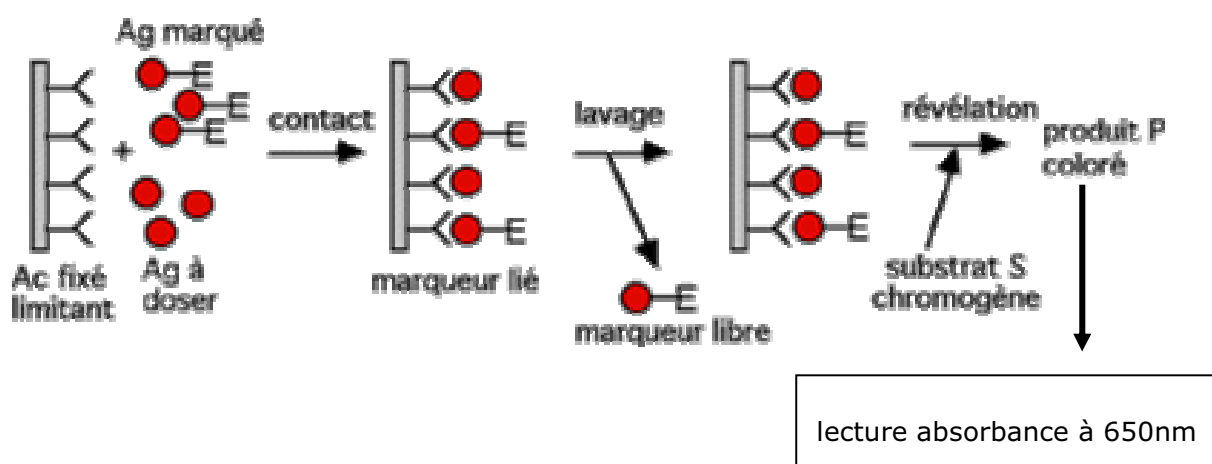
2-4 Dosages immunoenzymatiques

2-4-1 L'AgRP

Le dosage EIA de l'AgRP dans le milieu est effectué à l'aide d'un kit AgRP₍₈₃₋₁₃₂₎-NH₂ de souris conformément au protocole fourni (Phoenix Europ GmbH, Germany). L'anticorps secondaire fixé sur la paroi des puits réagit avec le fragment Fc de l'anticorps primaire dont le fragment Fab réagit de manière compétitive soit avec l'AgRP biotinylée, celle du standard ou bien celle présente dans le milieu de culture. Le peptide biotinylé réagit avec la streptavidine horseradish peroxidase (SA-HRP) qui catalyse la transformation du substrat. L'intensité de la coloration jaune lue à 450nm est directement proportionnelle à celle du peptide biotinylé mais inversement proportionnelle à la quantité d'AgRP présente dans le standard ou l'échantillon biologique. La sensibilité permet de détecter une concentration de 0,12ng/ml. La précision intra et inter dosage sont respectivement inférieures à 5% et 14%. Les réactions croisées sont estimées à 100% avec l'AgRP₍₈₃₋₁₃₂₎ humaine, de souris et avec la forme C de l'AgRP; par contre, aucune réaction n'est détectée avec l'orexine B, la leptine, α -MSH, NPY ou GLP-1 et GLP-2 (glucagon-like peptide). Chaque condition est dosée en triple (3 puits par condition) sur 4 expériences indépendantes.

2-4-2 La corticostérone

Le dosage de la corticostérone est effectué selon le protocole fourni avec le kit (Neogen corporation Absys SA, France). L'anticorps anti-corticostérone fixé dans chaque puits réagit par compétition avec l'enzyme conjuguée (corticostérone horseradish peroxydase), ou l'hormone standard ou celle de l'échantillon extraite à l'éthyl-éther. L'interaction du substrat ajouté (tétraméthyl benzidine (TMB) +H₂O₂) avec l'enzyme conjuguée donne une coloration dont l'absorbance mesurée à 650nm est inversement proportionnelle à la quantité de corticostérone. L'anticorps spécifique de la corticostérone (100%) a des réactions croisées avec la désoxycorticostérone (38%), la 6OH-corticostérone (19%), la progestérone (5,1%), le cortisol (1,1%). La limite de sensibilité est de 0,05 ng/ ml.



Substrat chromogène : tetramethylbenzidine (TMB)+ hydrogene peroxyde (H₂O₂)

Ag marqué (corticosterone enzyme conjugate) : corticosterone horseradish peroxidase

Figure 4 : Schéma simplifié du principe du dosage immunoenzymatique de la corticostérone (ELISA compétition)

1- MATERIEL ANIMAL

1-1 Provenance et caractéristiques des animaux

Les expérimentations sont effectuées sur le lapin domestique *Oryctolagus cuniculus* de race locale. Le nombre de lapins mâles adultes utilisés est respectivement de 59 pour les expérimentations avec le cortrosyn et la dexaméthasone. Les animaux dont le poids est compris entre 2,6 et 3,5 kg sont achetés à l'institut technique des élevages (ITELV, Baba Ali). Sur cet effectif de départ, et considérant le nombre prélèvements analysés nous nous sommes limités au nombre de 36 lapins pour exprimer et interpréter nos résultats.

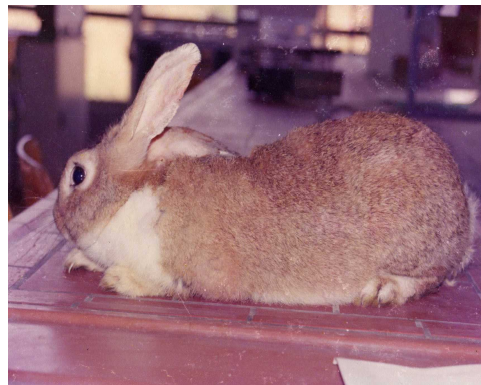


Figure 1 : Lapin expérimental : *Oryctolagus cuniculus*

1-2 Conditions d'élevage

Placés dans l'animalerie de l'USTHB, les lapins sont séparés en 3 groupes dans des salles de 12 m² de surface, pesés puis soumis à une période d'adaptation d'une dizaine de jours dans des conditions similaires.

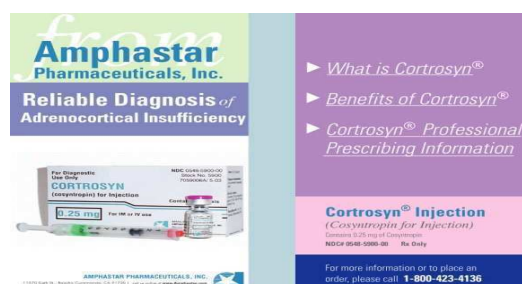
En fonction des expérimentations les lots témoins ou traités sont constitués en tenant compte du poids corporel et regroupés dans des salles de 9 m² de surface. Les variations de température et d'humidité ambiante sont relevées à l'aide d'un thermo-hygrographe. Les limites enregistrées pendant la période novembre-février sont respectivement 10-15°C et 65-75%. Les animaux sont nourris *ad libitum* avec une consommation d'eau libre. L'aliment standard (ONAB, El Kseur, Béjaia) est composé de: son (22%), orge (20%), maïs (15%), tourteaux-soja (7%), calcium (1,5%), complexe multivitaminé (1%), phosphate bicarbonate (0,5%), cellulose (13%) et des protéines (16%).

2- METHODES

2-1 Administration des substances

2-1-1 le cortrosyn

Le cortrosyn dépôt ou l'hexaacétate de tétracosactide correspond à de l'ACTH₁₋₂₄ synthétique conditionnée en solution de 1mg/ml ou 0,5 mg/ml. En dose pharmacologique 1mg de tétracosactide correspond à 10UI d'ACTH. Le premier groupe de lapins (groupe cortrosyn, n=21) reçoit une seule dose de 10µg de cortrosyn par kg de poids corporel administrée par la veine latérale de l'oreille, en accord avec des doses utilisées dans des travaux antérieurs (Pitzel *et al.*,1984; Faulborn *et al.*,1979),



2-1-2 Le sérum physiologique (NaCl 0,9%)

Le second groupe de lapins (groupe témoin, n=21) reçoit un volume approprié de NaCl 0,9%, équivalent à celui injecté au groupe cortrosyn par la veine latérale de l'oreille.

2-1-3 La dexaméthasone

Chaque lapin du troisième groupe (groupe dexta, n=17) est injecté par la veine latérale de l'oreille avec une dose unique de 100µg de dexaméthasone phosphate sodique (Unidex à 4mg/ml). Cette dose a été choisie par référence à des travaux antérieurs effectués sur le lapin (Stokes *et al.*,2002;

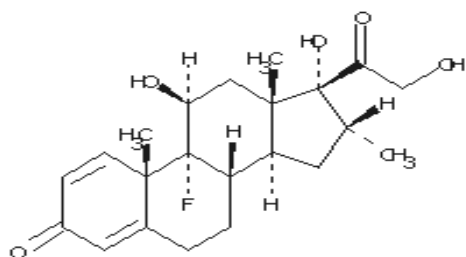


Figure 2 : Structure chimique de la dexaméthasone et molécule injectée

2-1-4 Prélèvements des échantillons biologiques

Les lapins sont sacrifiés par saignement toutes les 20 minutes pendant 100 mn entre 10h et 12h de la matinée. Le sang est prélevé et le plasma est séparé par centrifugation puis congelé à -20°C . Les surrénales et les testicules sont disséqués, isolés du tissu adipeux puis pesés et conservés à -20°C . Au moment du broyage, les testicules et les surrénales sont découpés, dilués dans un volume d'eau bidistillée (entre 0,5 et 1ml) puis broyés. Le surnageant du broyat est aliquoté et conservé à -20°C .

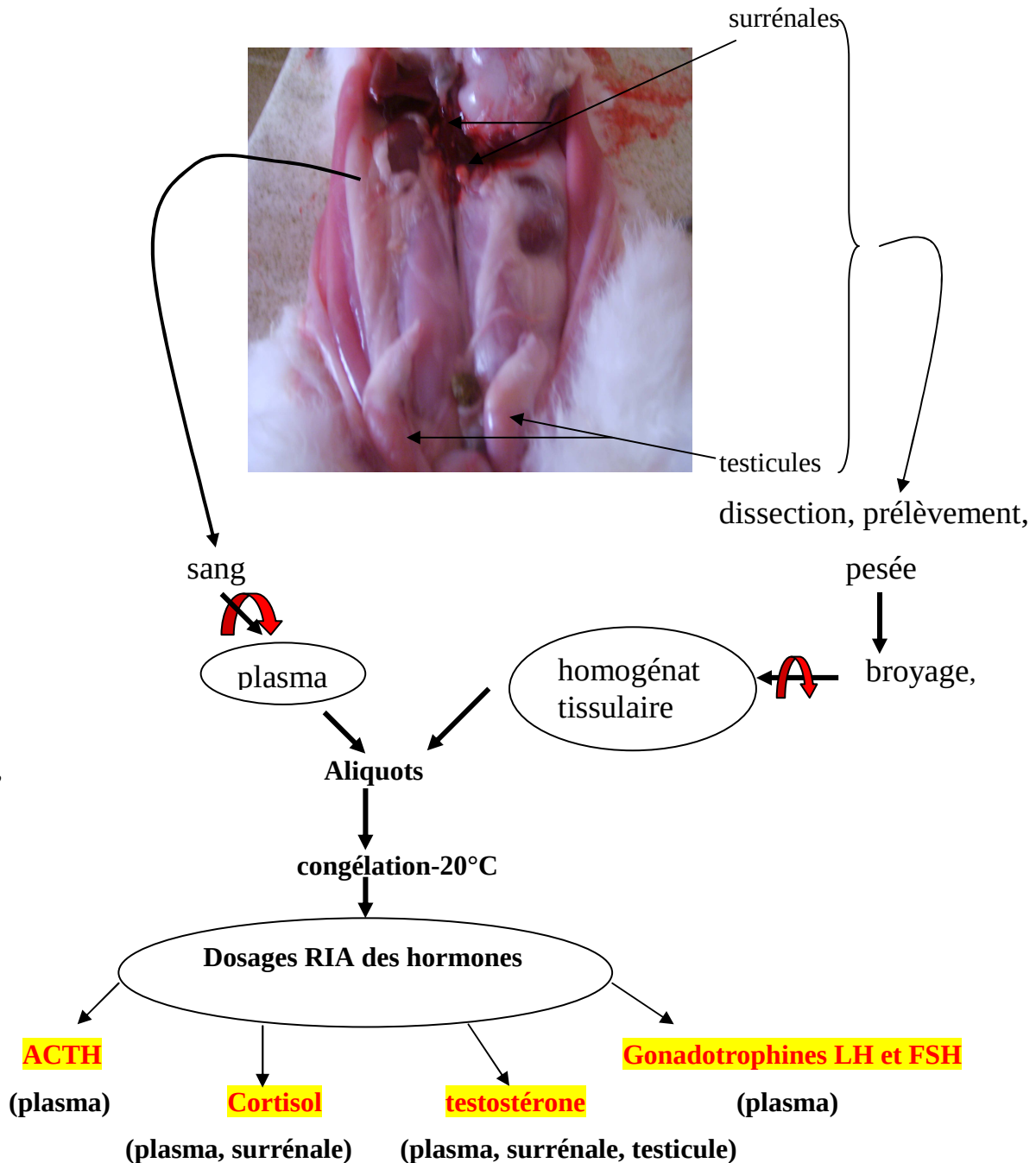


Figure 3 : Prélèvement des échantillons biologiques sur les lapins expérimentés (sang, testicules et surrénales)

2-2 Dosages hormonaux

2-2-1 le cortisol

Le cortisol sont dosés directement dans le plasma et le broyat surrénalien à l'aide d'un kit RIA (Immunotech, France), utilisant un anticorps monoclonal anti-cortisol spécifique. Des réactions croisées très basses sont notées avec l'aldostérone, la corticostérone, la cortisone, le 11-désoxycortisol et la progestérone ou vis-à-vis de substances pharmacologiques telles que la prédnisolone, la prédnisone ou la spironolactone. Les précisions intra et inter-essai sont respectivement de 5,89 % et 9,2%. L'exactitude de la technique s'échelonne entre 85 et 113%, avec une sensibilité comprise entre 10 à 2000nM

2-2-2 La testostérone

La concentration de testostérone dans le plasma, le broyat surrénalien ou testiculaire du lapin est évaluée par un dosage RIA direct à l'aide d'un kit (Immunotech, France). Les échantillons à doser et les points de la gamme étalon sont incubés dans des tubes recouverts d'anticorps en présence de testostérone marquée à l'iode 125. Une compétition s'établit entre l'hormone de l'échantillon ou celle de la gamme étalon avec l'hormone traceur radioactive pour se fixer sur l'anticorps anti-testostérone Ce dernier hautement spécifique de la testostérone montre des réactions très faibles avec la DHT et l'androstènedione. La précision intra et inter-essai sont respectivement de 14,8 % et 10% alors que l'exactitude est comprise entre 91 et 117%. La méthode est sensible jusqu'à 0,025 ng/ml

2-2-3 L'ACTH

L'ACTH endogène plasmatique est dosée par la technique radioimmunologique basée sur la méthode sandwich à l'aide d'un kit IRMA (Immunotech, France) après une étape d'acylation et deux incubations d'une heure et deux heures, respectivement avec l'anticorps anti-ACTH puis avec l'hormone traceur marquée à l'iode 125. L'anticorps monoclonal utilisé est de haute affinité contre l'ACTH humaine acylée. Cet anticorps est hautement spécifique de l'ACTH. Les interférences avec des molécules apparentées (ACTH₁₋₂₄,1-10,18-39,11-24, α -MSH et POMC) sont très faibles.(La notice d'utilisation ne mentionne aucune valeur sur ces interférences ou réactions croisées). La précision de la technique donne des coefficients de variation intra et inter-essai respectivement inférieurs ou égaux à 9,1 et 9.6%. L'exactitude estimée avec des échantillons acylés dilués ou concentrés donne des pourcentages de récupération compris entre 99 et 113%. La sensibilité permet de détecter une concentration de 1,2 pg/ml .

2-2-4 LH et FSH

Le dosage radioimmunologique des deux gonadotrophines dans le plasma est direct à l'aide d'un kit IRMA (Immunotech, France) et de type «sandwich». Il utilise des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre deux épitopes de la molécule de LH et réagissant sans compétition. Dans les tubes recouverts d'un premier anticorps monoclonal, les échantillons plasmatiques et les points de la gamme étalon sont incubés en présence d'un second anticorps monoclonal marqué à l'iode 125. L'anticorps est hautement spécifique pour la LH de souris (mLH) et réagit faiblement avec certaines hormones humaines telles que hTSH, hFSH et HCG.

Les coefficients de variations intra et inter-essai sont respectivement inférieurs ou égaux à 6,7 et 3,7%. L'exactitude est estimée à 83-113%, et la sensibilité du dosage permet de détecter des concentrations de l'ordre de 0,2UI/L.

Pour la FSH, le principe de la RIA sandwich est aussi appliqué, en utilisant des anticorps monoclonaux de souris ainsi qu'un anticorps secondaire marqué à l'iode 125. L'anticorps monoclonal spécifique de FSH des souris (mFSH) ne montre pas d'interférence notable pour hLH, hFSH et HCG. La précision intra et inter-essai est de 2,6 et 6,3%, et l'exactitude estimée par la droite de régression $Y = 1,04 X + 0,24$ avec un coefficient de corrélation de 0,98. (Y = concentration théorique et X = concentration observée). La sensibilité de la méthode permet de détecter jusqu'à 0,2UI/L.

3- calculs statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne des concentrations mesurées $\pm$ sem, et la différence entre les moyennes est évaluée par le test t de Student. La différence est considérée statistiquement significative à partir d'une valeur de probabilité $p < 0,05$.

Résultats

Parties I et II

Publications - Partie I

Publication n°1:

Titre: Role of Agouti-related protein in adrenal steroidogenesis, (2007)

Molecular and Cellular Endocrinology 265–266: 108–112

Mabrouka Doghman, Yacine Soltani, Valentine Rebuffet, Danielle Naville and Martine Bégeot

Résumé:

La glande surrénale est le second tissu où s'exprime de façon importante les ARN codant l'Agouti-related protein après l'hypothalamus ce qui soulève la question de son rôle dans la stéroïdogénèse surrénalienne. Nous avons démontré ainsi que d'autres auteurs la présence d'une population de récepteurs MC4-R couplés positivement à la stéroïdogénèse dans les cellules surrénaliennes. De plus, nous avons mis en évidence que l'Agrp inhibe la réponse stéroïdogène de ces cellules à une stimulation aigue ou à long terme avec NDP- α MSH, à travers ses effets antagonistes envers MC4-R. cependant, en dépit du fait que l'Agrp n'exerce pas une action antagoniste vis-à-vis de MC2-R et ne modifie pas la réponse stéroïdogénique en réponse à une stimulation aigue par l'ACTH, elle exerce un effet biphasique puissant sur la réponse à long terme à l'ACTH via un mécanisme alternatif indéfini. Etant donné que les cellules surrénaliennes sécrètent une quantité importante d'Agrp, cette protéine doit probablement avoir un rôle de contrôle paracrine/autocrine sur la stéroïdogénèse surrénalienne.

Publication n°2: (Journal of Endocrinological Investigation, acceptée le 29 avril 2008)

Hormonal regulation of the mouse adrenal melanocortinergic system (2008)

Y.Soltani, M.Doghman, J.Gout, V.Rebuffet, M.Vigier F, F.Hadj Bekkouche, D.Naville and M. Begeot

Résumé:

Il a été rapporté que les cellules corticosurrénales de plusieurs espèces expriment à la fois des récepteurs MC4-R et l'Agouti related protein suggérant l'existence d'un contrôle paracrine de ce dernier sur la stéroïdogénèse. Nous avons choisi d'utiliser une lignée tumorale murine de cellules surrénales ATC7-L qui présentent le phénotype complet de cellules fasciculoréticulées en augmentant leur production de base de corticostérone en réponse à l'ACTH pour étudier la régulation de l'expression de ces composantes. Nous avons tout d'abord montré que ces cellules expriment des récepteurs MC4-R fonctionnels de même que l'Agrp qu'elles sécrètent dans le milieu de culture. Par la suite nous avons montré que certains traitements hormonaux modifient la population des récepteurs aux mélanocortines de ces cellules ainsi que la sécrétion d'Agrp. Ces résultats sont en accord avec certaines données que nous avons obtenu *in vivo* dans les glandes surrénales chez la souris rendue obèse par l'administration d'un régime enrichi en lipides.

De ce travail nous pouvons tirer plusieurs conclusions. L'expression de MC4-R et de l'Agrp est une caractéristique générale des cellules corticosurrénales permettant de spéculer sur un rôle compensatoire de cette voie alternative en cas de déficit de la voie classique impliquant l'ACTH se liant aux récepteurs MC2-R. Nous montrons également que la production d'Agrp ainsi que l'expression des MCRs surrénales pourraient être modulées par des hormones impliquées directement dans le contrôle de la prise alimentaire. L'ensemble des résultats permet de suggérer l'existence d'interactions entre la fonction surrénale sous le contrôle du système mélanocortinergique et l'état métabolique, d'autant que les glucocorticoïdes exercent un rôle permissif au niveau central en favorisant la prise alimentaire et ainsi le développement de l'obésité.

Résultats

1- Expression des ARNm récepteurs MC3-R et MC4-R dans la lignée cellulaire ATC7-L

Nous montrons qu'en plus de l'ARNm qui code pour MC2-R, les cellules ATC7-L expriment l'ARNm codant pour MC4-R mais pas celui de MC3-R (figure 1A). L'analyse par RT-PCR montre sur le tissu hypothalamique de souris qui exprime les deux récepteurs, 2 bandes de 149 et 165 paires de bases (pb) correspondant respectivement aux ARNm du MC4-R et MC3-R.

Sur la lignée ATC7-L, seule la bande correspondant au MC4-R est exprimée.

L'analyse par Western blot confirme la présence des protéines MC2-R et MC4-R mais n'a pas pu détecter les protéines MC3-R dans ces cellules (figure1B). Comme cela est indiqué, les principales bandes sont observées à 43 kDa pour MC2-R et 55 kDa pour MC4-R et qui correspondent probablement à la forme glycosylée de ces récepteurs. De plus, un traitement de 6 heures de ces cellules avec NDP- α MSH (10^{-7} M) augmente la décharge de corticostérone de 2,7fois ($85,0 \pm 3,5$ ng/ 10^6 cellules) dans le milieu de culture, comparée aux cellules non stimulées ($31,5 \pm 1,2$ ng/ 10^6 cellules) ; même si cette production est plus faible que sous une stimulation par l'ACTH à 10^{-9} M ($810,7 \pm 10,4$ ng/ 10^6 cellules), cela prouve néanmoins que le récepteur MC4-R est couplé de manière positive avec la stéroïdogénèse surrénalienne.

2- Expression de l'ARNm codant l'Agrp dans la lignée ATC7-L

L'analyse par RT-PCR démontre que les cellules ATC7-L expriment aussi l'ARNm codant pour l'Agrp avec deux bandes distinctes de 720 et 326 pb (figure 1A).

Les cellules ATC7-L sécrètent aussi l'Agrp dans le milieu de culture, et comme il est montré dans le tableau 2, en absence de traitement ou de stimulation hormonale, la concentration d'Agrp évaluée dans le milieu de culture par dosage EIA est de $0,40 \pm 0,10$ nM par 10^6 cellules.

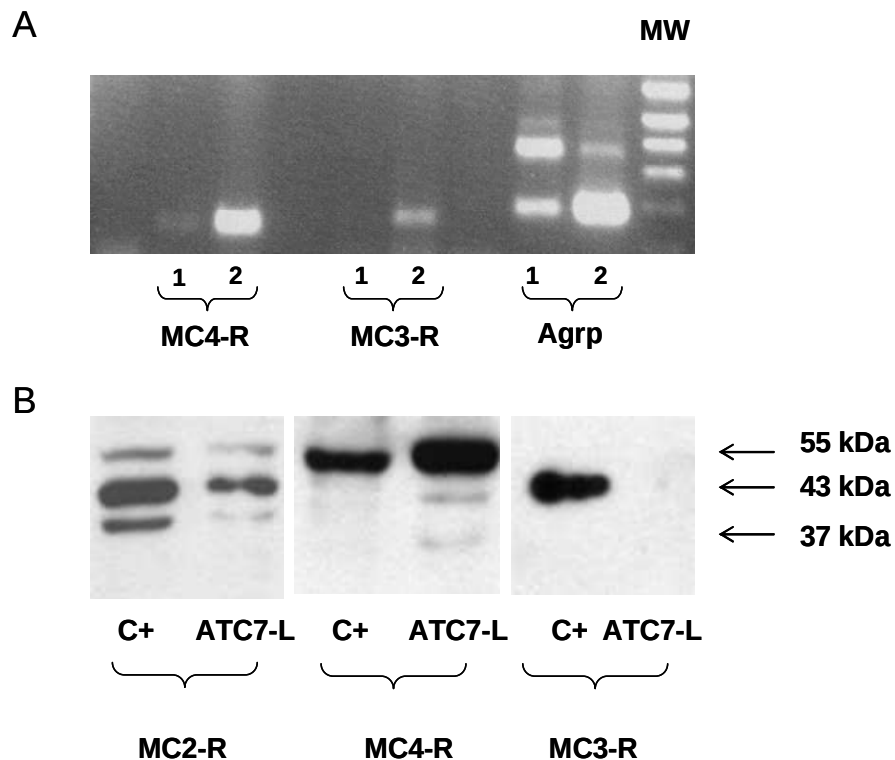


Figure 1

Figure 1: Expression des ARNm des récepteurs MC3-R et MC4-R et de l'Agrp dans la lignée surrénalienne ATC7-L.

A: RT-PCR pour les produits de MC4-R (149pb), MC3-R (165pb) et de l'Agrp (326 et 700pb) 1 : ARNm des ATC7-L, 2 : ARNm d'hypothalamus de souris (contrôle positif) Pour l'Agrp 2 bandes sont observées : la bande inférieure correspond à la taille décrite, et la bande supérieure est observée de façon majeure dans la glande surrénale de souris et ne correspond pas à l'ADN génomique, car l'ARN total est traité par la DNase avant la RT. Cette observation est relevée aussi dans plusieurs tissus de souris (Shutter *et al.* 1997).

B : Analyse Western blot pour MC2-R, MC4-R, et MC3-R dans les cellules ATC7-L. C + correspond respectivement à l'expression stable des clones MC2-R (Naville *et al.*, 1997), MC4-R ou MC3-R (Rached *et al.*, 2003)

3- Régulation de l'expression du récepteur MC2-R dans la lignée ATC7-L

Les figures 2A et B montrent une diminution de 28% du niveau de la protéine MC2-R après un traitement des cellules ATC7-L pendant 24 heures avec de la leptine (10^{-7} M). Au contraire, aucune modification significative n'est observée après un traitement à l'insuline (10^{-7} M), la dexaméthasone (10^{-8} M), l'Agrp (10^{-7} M) ou la forskoline (10^{-5} M) qui active directement l'adénylate cyclase. On note que le traitement à l'ACTH induit une légère diminution non significative du niveau de la protéine MC2-R.

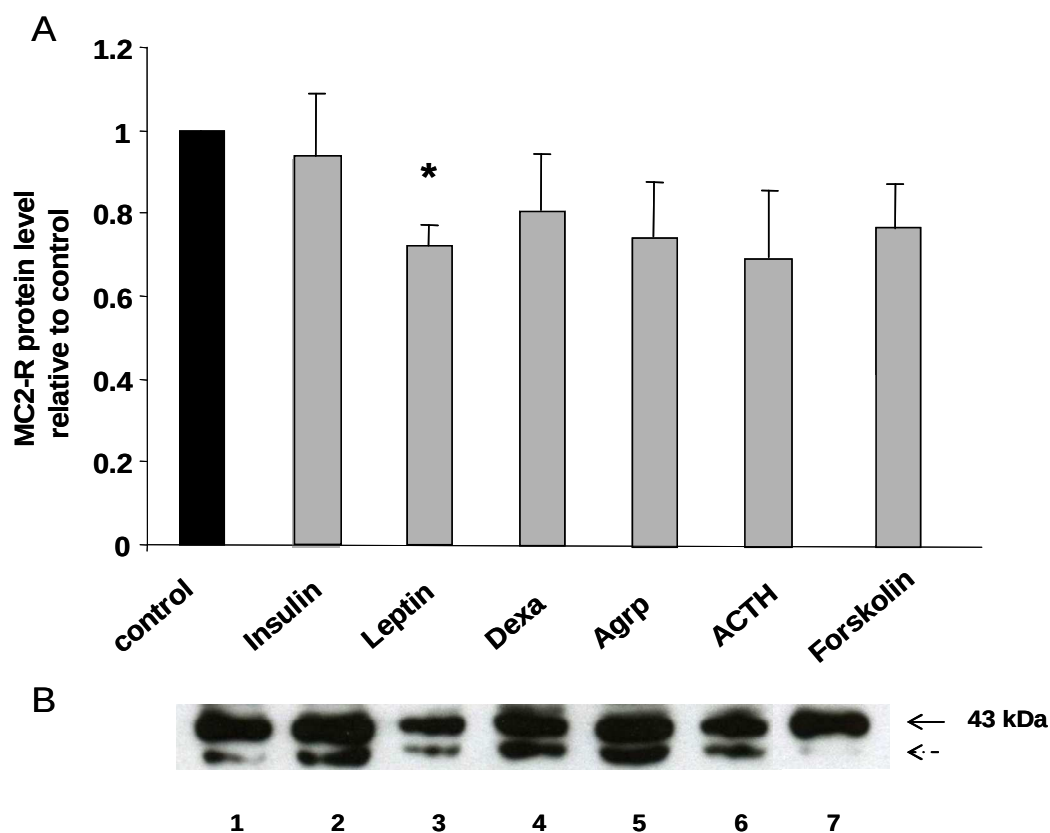


Figure 2

Figure 2 : Effets des traitements des cellules ATC7-L avec les hormones: insuline (10^{-7} M), leptine (10^{-7} M), dexamethasone (10^{-8} M), ACTH (10^{-8} M), ou avec la forskoline (10^{-5} M) et l'Agrp (10^{-7} M) sur le niveau de la protéine MC2-R mesuré par Western blot.

A : niveau de protéine exprimé en valeur relative par rapport au contrôle (cellules non traitées) et représente la moyenne $\pm$ ESM de 4 expériences indépendantes.

B : Représentation de l'expérience: 1: contrôle, 2: insuline, 3: leptine, 4: dexaméthasone, 5: Agrp, 6: ACTH, 7: forskoline (*: $p < 0,05$ par rapport au contrôle)

4- Régulation de l'expression du récepteur MC4-R dans la lignée ATC7-L

Les variations de l'ARNm codant pour MC4-R et de la protéine sont étudiées après un traitement de 24 heures avec des hormones intervenant dans l'activation de la stéroïdogénèse, telles que l'ACTH (10^{-8} M), NDP- α MSH (10^{-8} M) et la forskoline (10^{-5} M).

L'analyse par Western blot montre une diminution significative de la protéine MC4-R avec le traitement au NDP- α MSH (35%), ou à la forskoline (55%) (Figures 3A et B), mais aucun effet n'est observé avec l'ACTH.

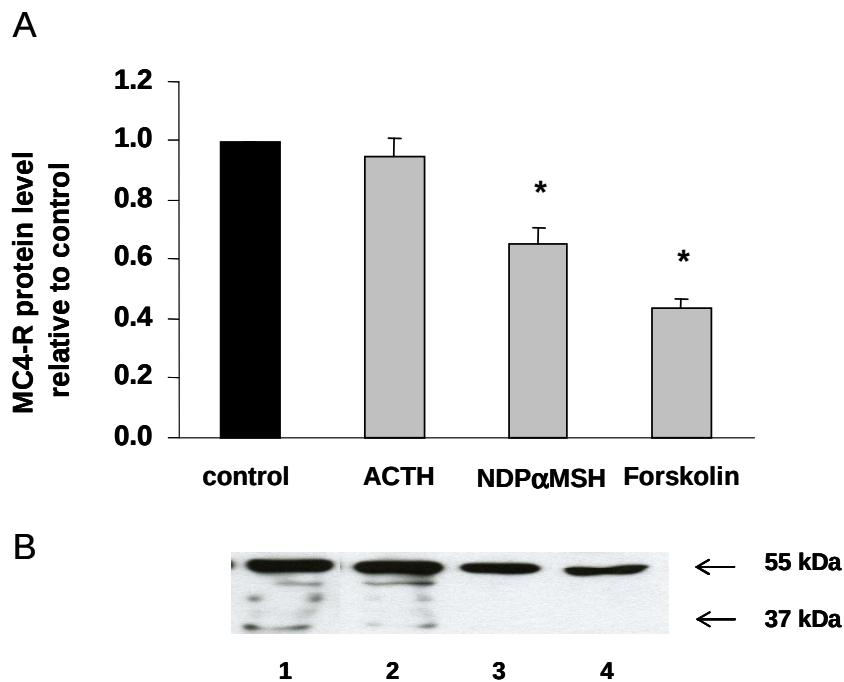


Figure 3

Figure 3: Effet des traitements des cellules ATC7-L avec ACTH (10^{-8} M), NDP- α MSH (10^{-8} M) et forskoline (10^{-5} M), sur le niveau de protéine MC4-R mesuré par Western blot.

A: niveau de protéine exprimé en valeur relative par rapport au contrôle (cellules non traitées) et représente la moyenne $\pm$ ESM de 4 expériences indépendantes

B: Représentation de l'expérience : 1:contrôle, 2: ACTH, 3: NDP- α MSH, 4: forskoline.

(*: $p < 0,05$ par rapport au contrôle)

Nous avons aussi étudié les effets des traitements sur les cellules ATC7-L avec des hormones impliquées dans la prise alimentaire telles que l'insuline (10^{-7} M), la leptine (10^{-7} M) et la dexaméthasone (10^{-8} M). ainsi que par le peptide orexigène Agrp (10^{-7} M). Nous n'observons pas d'effet sur le niveau de MC4-R avec l'insuline ou la leptine. Par contre le niveau de la protéine MC4-R est significativement diminué (33%) par l'Agrp. Le traitement à la dexaméthasone induit aussi une diminution significative moins intense (de l'ordre de 20%) (Figures 4A et B).

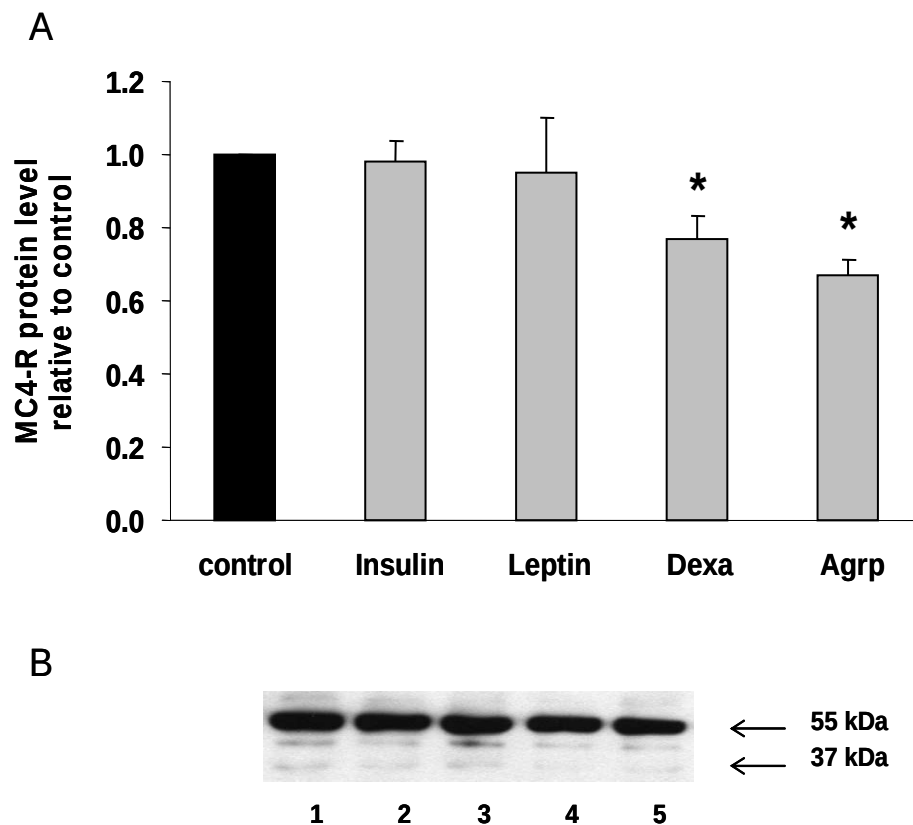


Figure 4

Figure 4: Effets des traitements des cellules ATC7-L avec les hormones: insuline (10^{-7} M), leptine (10^{-7} M), la dexaméthasone (10^{-8} M) et avec le peptide orexigène Agrp (10^{-7} M), sur le niveau de la protéine MC4-R mesuré par Western blot.

A : niveau de protéine (moyenne $\pm$ sem) exprimé en valeur relative par rapport aux contrôles (cellules non traitées)

B : représentation de l'expérience: 1: contrôle; 2: insuline; 3: leptine, 4:dexaméthasone ;

5: Agrp (*: $p < 0,05$ par rapport au contrôle)

5- Régulation hormonale de la sécrétion d'Agrp dans la lignée cellulaire ATC7-L

Comme il est montré dans le tableau 2, un traitement hormonal de 24 h des cellules ATC7-L avec l'insuline (10^{-7} M), la leptine (10^{-7} M) ou la dexaméthasone (10^{-8} M) induit une augmentation de la sécrétion d'Agrp. Le dosage EIA d'Agrp dans le milieu de culture montre des concentrations multipliées par 7,5, 12,5 et 11,3 fois respectivement pour l'insuline, la leptine et la dexaméthasone comparées à celle des cellules non traitées (contrôle).

Tableau 2: Effets des traitements hormonaux sur la sécrétion d'Agrp par la lignée surrénalienne ATC7-L

Traitement	Agrp (nM)/ 10^6 cellules	facteur d'augmentation
Contrôle	$0,4 \pm 0,1$	-
Insuline	$3,0 \pm 0,5$	7,5
Leptine	$5,0 \pm 0,4$	12,5
Dexaméthasone	$4,5 \pm 0,3$	11,3

6- Expression de MC2-R dans la glande surrénale de souris DIO

L'analyse par Western blot montre une diminution significative (28%) du niveau des protéines MC2-R dans les surrénales prélevées sur des souris nourries pendant 16 semaines avec un régime riche en lipides (DIO), comparé à des souris contrôles de même âge (figure 5A et B).

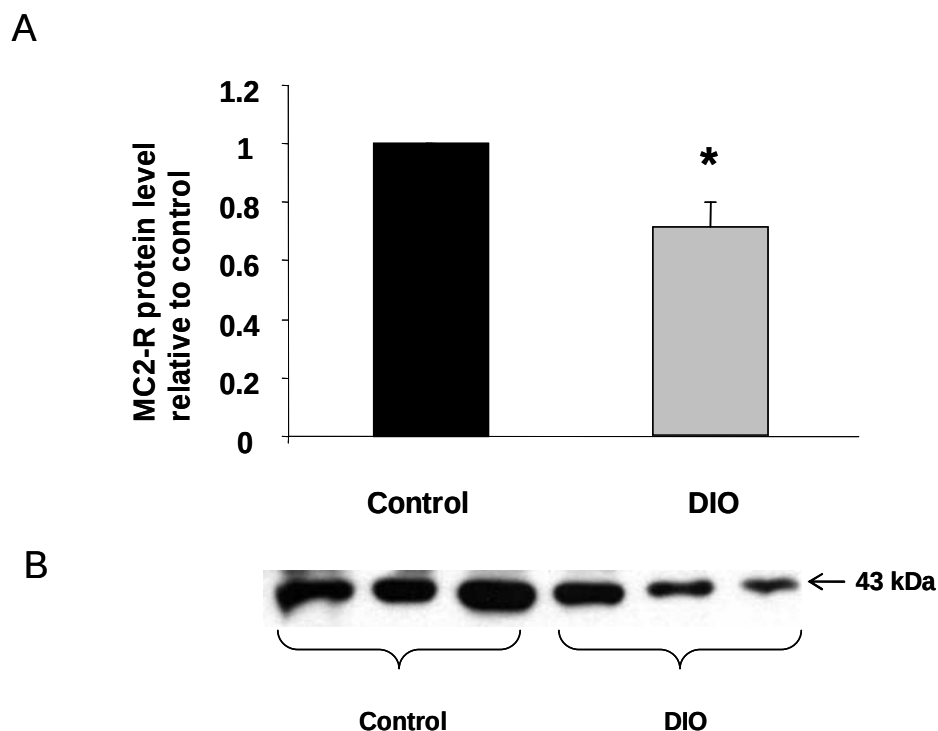


Figure 5

Figure 5 : A et B Mesure par Western blot du niveau de la protéine MC2-R dans les glandes surrénales prélevées sur des souris contrôles et DIO. Le niveau de protéine chez les souris DIO est exprimé en valeur relative par rapport aux souris contrôle par la moyenne $\pm$ sem pour 3 souris (*: $p < 0,05$ par rapport au contrôle)

7- Expression de MC4-R dans la glande surrénale de souris DIO

Le niveau des protéines MC4-R est fortement diminué (85%) dans les surrénales de souris DIO comparées aux souris contrôle (figure 6A et B), mais comme dans les cellules ATC7-L nous n'avons pu détecter aucune expression protéique de MC3-R dans les surrénales prélevées sur les souris contrôles ou DIO.

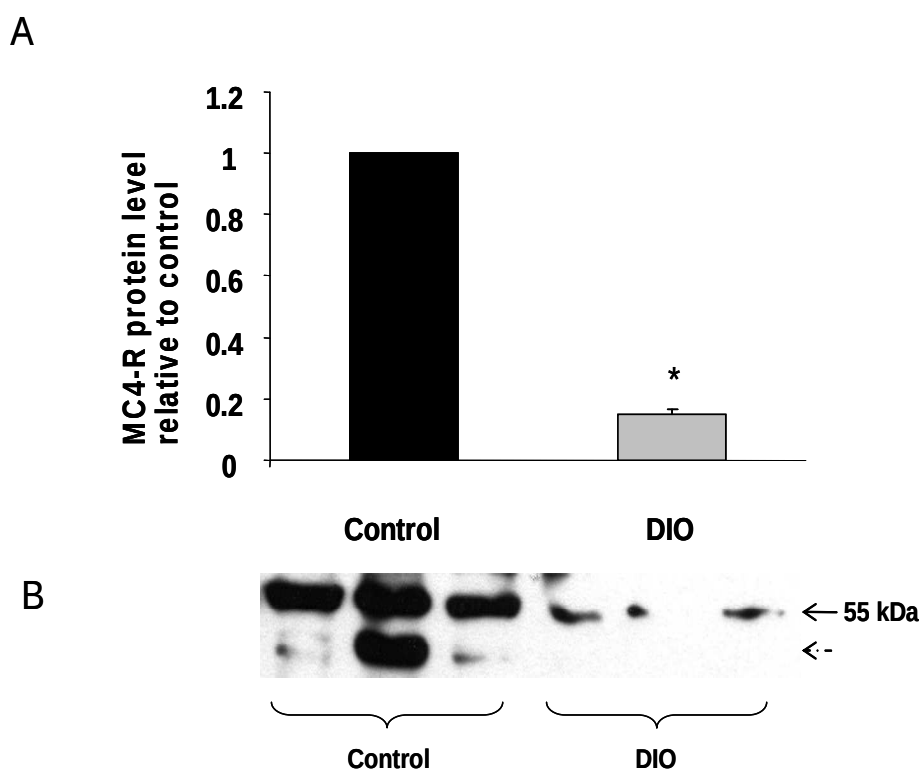


Figure 6

Figure 6 : A et B Mesure par Western blot du niveau de la protéine MC4-R dans les glandes surrénales prélevées sur des souris contrôles ou soumises au régime DIO pendant 16 semaines. Le niveau de protéine chez les souris DIO est exprimé en valeur relative par rapport aux souris contrôle par la moyenne $\pm$ sem pour 3 souris .
(*: $p < 0,05$ par rapport au contrôle)

8- Expression de l'ARNm codant pour l'Agrp dans la surrénale des souris DIO

Comme le montre la RT-PCR, le niveau d'ARNm codant pour l'Agrp est significativement augmenté (38%) chez les souris DIO par rapport aux souris contrôles (figure 7).

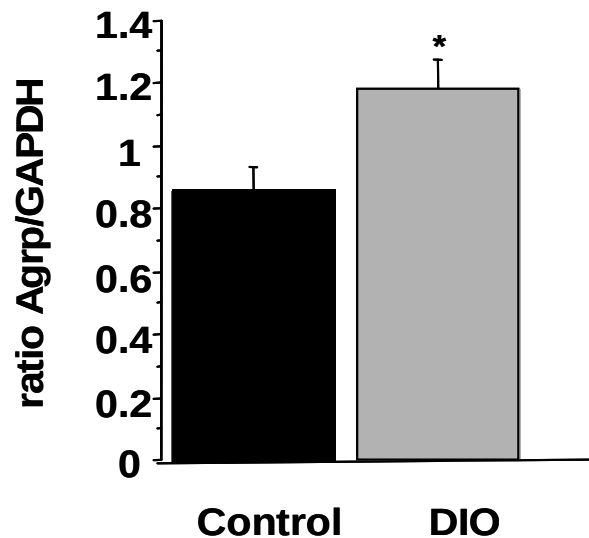


Figure 7

Figure7: Evaluation par analyse RT-PCR du niveau d'expression de l'ARNm codant l'Agrp par rapport à celui de la GAPDH dans les glandes surrénales prélevées sur des souris contrôles ou soumises au régime DIO pendant 16 semaines. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ sem pour 3 souris

Publication n°3 : soumise à la revue Domestic Animal Endocrinology le 15 mars 2008

Adrenal cortex regulation and influence on the gonadotrope axis in the male rabbit

Y Soltani, F Hadj Bekkouche

Résumé :

Le but de cette étude est d'étudier la régulation de la fonction corticosurrénale à travers les variations cinétiques du cortisol dans le plasma et la glande surrénale ainsi que l'ACTH chez le lapin mâle en réponse au cortrosyn (ACTH₁₋₂₄) (10µg/kg) ou à la dexaméthasone 100 µg/animal. Ces variations sont corrélées avec celles d'hormones de l'axe gonadique LH, FSH et testostérone. Les hormones sont dosées par RIA et comparées à celles du lot témoin (NaCl 0,9%). Nous montrons que le cortrosyn diminue l'ACTH et augmente le cortisol dans le plasma après 20mn alors que la dexaméthasone fait aussi chuter l'ACTH et le cortisol dans le plasma mais augmente significativement le cortisol dans la surrénale après 80mn. La testostérone dans le plasma et le testicule augmente de façon concomitante dès 20mn avec le cortrosyn, mais diminue significativement dans la surrénale, alors que la dexaméthasone diminue la testostérone plasmatique mais ne modifie pas les contenus testiculaire et surrénalien. La LH et la FSH sont augmentées respectivement 20 et 80mn après l'administration du cortrosyn, tandis que la dexaméthasone cause une chute simultanée des deux hormones. A partir de ces résultats, il semble peu probable que le cortrosyn agisse directement sur le testicule, mais il pourrait agir à 2 niveaux, pour stimuler la sécrétion du cortisol et de la testostérone par la glande surrénale ainsi que la sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse. Le cortisol circulant régule aussi la sécrétion de l'ACTH endogène par un rétrocontrôle sur l'hypothalamus ou sur l'hypophyse. De même, la dexaméthasone qui ne montre pas d'effet notable sur la stéroïdogénèse testiculaire, inhibe de manière caractéristique les gonadotrophines chez le lapin.

Il est aussi probable que l'interaction de la surrénale avec le testicule intervient via les récepteurs aux glucocorticoïdes et/ou aux mélanocortines au niveau du testicule, particulièrement les récepteurs MC2-R à l'ACTH, et MC4-R qui intervient dans le fonctionnement érectile. De ce fait une investigation de l'expression de ces récepteurs est nécessaire afin d'apporter une interprétation exhaustive aux mécanismes de régulation de l'activité corticosurrénalienne liée à la fonction testiculaire.

Publication n°3 : soumise à la revue Domestic Animal Endocrinology le 15 mars 2008

Adrenal cortex regulation and influence on the gonadotrope axis in the male rabbit

Y Soltani, F Hadj Bekkouche

Résumé :

Le but de cette étude est d'étudier la régulation de la fonction corticosurrénale à travers les variations cinétiques du cortisol dans le plasma et la glande surrénale ainsi que l'ACTH chez le lapin mâle en réponse au cortrosyn (ACTH₁₋₂₄) (10µg/kg) ou à la dexaméthasone 100 µg/animal. Ces variations sont corrélées avec celles d'hormones de l'axe gonadique LH, FSH et testostérone. Les hormones sont dosées par RIA et comparées à celles du lot témoin (NaCl 0,9%). Nous montrons que le cortrosyn diminue l'ACTH et augmente le cortisol dans le plasma après 20mn alors que la dexaméthasone fait aussi chuter l'ACTH et le cortisol dans le plasma mais augmente significativement le cortisol dans la surrénale après 80mn. La testostérone dans le plasma et le testicule augmente de façon concomitante dès 20mn avec le cortrosyn, mais diminue significativement dans la surrénale, alors que la dexaméthasone diminue la testostérone plasmatique mais ne modifie pas les contenus testiculaire et surrénalien. La LH et la FSH sont augmentées respectivement 20 et 80mn après l'administration du cortrosyn, tandis que la dexaméthasone cause une chute simultanée des deux hormones. A partir de ces résultats, il semble peu probable que le cortrosyn agisse directement sur le testicule, mais il pourrait agir à 2 niveaux, pour stimuler la sécrétion du cortisol et de la testostérone par la glande surrénale ainsi que la sécrétion des gonadotrophines par l'hypophyse. Le cortisol circulant régule aussi la sécrétion de l'ACTH endogène par un rétrocontrôle sur l'hypothalamus ou sur l'hypophyse. De même, la dexaméthasone qui ne montre pas d'effet notable sur la stéroïdogénèse testiculaire, inhibe de manière caractéristique les gonadotrophines chez le lapin.

Il est aussi probable que l'interaction de la surrénale avec le testicule intervient via les récepteurs aux glucocorticoïdes et/ou aux mélanocortines au niveau du testicule, particulièrement les récepteurs MC2-R à l'ACTH, et MC4-R qui intervient dans le fonctionnement érectile. De ce fait une investigation de l'expression de ces récepteurs est nécessaire afin d'apporter une interprétation exhaustive aux mécanismes de régulation de l'activité corticosurrénalienne liée à la fonction testiculaire.

Communications internationales

1°) “Effect of single injection of ACTH (Cortrosyn) in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): Cinetic of plasma concentrations of cortisol (F), corticosterone (B) and F/B ratio” (2000) European Journal of Physiology (Pflügen Archiv), Octobre 2000, vol 440, N°6, pages R217-R228

Y.Soltani, Z.Hamouli, K.Khalfoun, N.Kabèche, M.Ouchabane, F.Abboura and F. Hadj Bekkouche

2°) “ACTH effects on plasma androgens, corticoids, ACTH and on adrenal and testis testosterone in the rabbit”. 3ème Congrès de la Federation of European Physiological Societies (Nice, France, du 28 juin au 3 Juillet 2003). Edité par Monduzzi Editore SpA-MEDIMOND Inc. 2003. pp229-233, (N° D628C0004)

Y.Soltani and F.Hadj Bekkouche

3°) “Effects of metopirone on plasma testosterone and glucocorticoids in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)” (2001), 69ème congrès de la Société de physiologie, Montpellier, 5-7 septembre 2001 Abstract dans la revue European Journal of Physiology (Pflügers Archiv), Août 2001, vol 442, N°5, page RI06

Y.Soltani, Z.Hamouli, R. Ablaoui, K.Bourkaib, S.Reghal, A. Belhocine and F. Hadj Bekkouche

4°) “Cinetic changes in plasma and testis androgens after ACTH administration in the domestic rabbit (*Oryctolagus Cuniculus*)”, (2001) 69^{ème} congrès de la Société de physiologie, Montpellier, 5-7 septembre 2001 Abstract dans la revue European Journal of Physiology (Pflügers Archiv), Août 2001, Vol 442, N°S, page RI07

Y. Soltani, H.Boumaza, N. Boucenna and F. Hadj Bekkouche.

Résultats

1 - Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux d'ACTH plasmatique

Comme le montre la figure 1, les taux d'ACTH plasmatique sont relativement constants chez les animaux témoins avec une moyenne de $19,6 \pm 1,95$ pg/ml. L'injection du cortrosyn induit rapidement dès 20 mn une diminution significative de ces taux (-84% , $p < 0,01$) par rapport aux témoins. Cet effet du cortrosyn se maintient jusqu'à 80 mn après l'injection puis disparaît comme l'indiquent les résultats obtenus après 100 mn d'injection (Figure 1).

L'injection de dexaméthasone entraîne également une diminution significative ($58,6\%$, $p < 0,01$) des taux circulants d'ACTH 20 mn après l'injection (Figure 1). Cet effet persiste pendant les premières 80 mn pour disparaître comme le montrent les valeurs mesurées après 100 mn d'injection.

Tableau 1 : Concentrations d'ACTH dans le plasma des lapins témoins et traités au cortrosyn ou à la dexaméthasone
(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

ACTH plasmatique (pg/ml $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M $\pm$ SEM
Témoin +NaCl 0,9%	23,5 $\pm$ 0,5	21,7 $\pm$ 3,81	18,66 $\pm$ 0,39	14,54 $\pm$ 2,9	19,6 $\pm$ 1,95
+ Cortrosyn 10 μ g/kg	5,53 $\pm$ 0,87	5,01 $\pm$ 0,099	7,57 $\pm$ 0,38	12,4 $\pm$ 3,08	
+Dexaméthasone 100 μ g/animal	9,72 $\pm$ 1,03	9,93 $\pm$ 2,59	10,02 $\pm$ 2,01	8,4 $\pm$ 1,08	
Test de Student	T-C < 0,01	T-C < 0,05	T-C < 0,01	T-C=NS	
Probabilité p	T-D < 0,01	T-D=0,054	T-D < 0,05	T-D=NS	

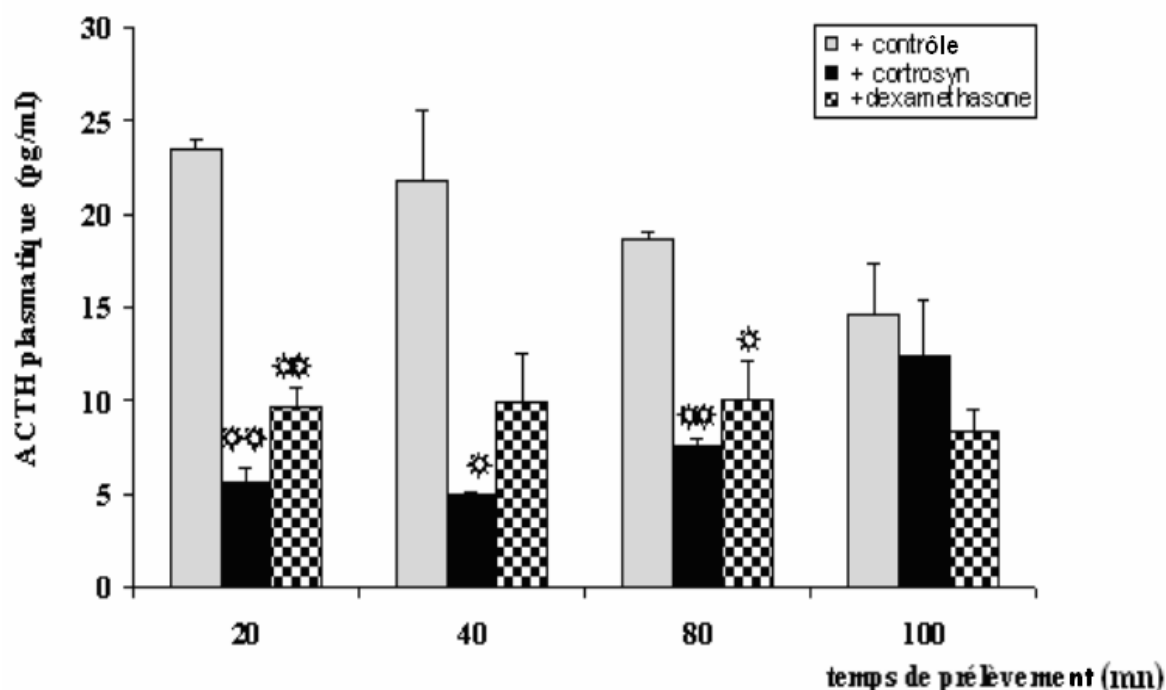


Figure 1: Effet du cortrosyn (10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur l'ACTH plasmatique chez le lapin mâle

2 : Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de cortisol plasmatique

Comme le montre la figure 2, les taux de cortisol chez les témoins sont relativement constants avec une moyenne de $202 \pm 57,6$ pg/ml. L'injection de cortrosyn augmente de façon rapide et très significative ($\times 8$) (+730%, $p < 0,01$) le taux de cortisol plasmatique dès 20 mn par rapport aux témoins. Cet effet ne persiste pas car aucune différence significative par rapport aux témoins n'est observée par la suite de 40 mn jusqu'à 100 mn après l'injection.

L'injection de dexaméthasone n'a pas d'effet significatif car le taux d'ACTH reste à un niveau équivalent aux témoins. A partir de 80mn, on note une baisse significative (-65,4%, $p < 0,05$) et qui se maintient jusqu'à 100mn après l'injection (Figure 2).

**Tableau 2 : Concentrations de cortisol dans le plasma des lapins témoins
et traités au cortrosyn ou à la dexaméthasone**

(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

Cortisol plasmatique (pg/ml $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M $\pm$ SEM
Témoin +NaCl 0,9%	95,4 $\pm$ 20	116 $\pm$ 18,3	263 $\pm$ 102	334 $\pm$ 155	202 $\pm$ 57,6
+ Cortrosyn 10 μ g/kg	789,7 $\pm$ 37	257 $\pm$ 36,5	343 $\pm$ 139	259 $\pm$ 62,6	
+Dexaméthasone 100 μ g/animal	167 $\pm$ 42,7	124 $\pm$ 34	91 $\pm$ 6,6	66 $\pm$ 12,3	
Test de Student Probabilité p	T-C < 0,01 T-D=NS	T-C=NS T-D=NS	T-C=NS T-D= NS	T-C=NS T-D < 0,05	

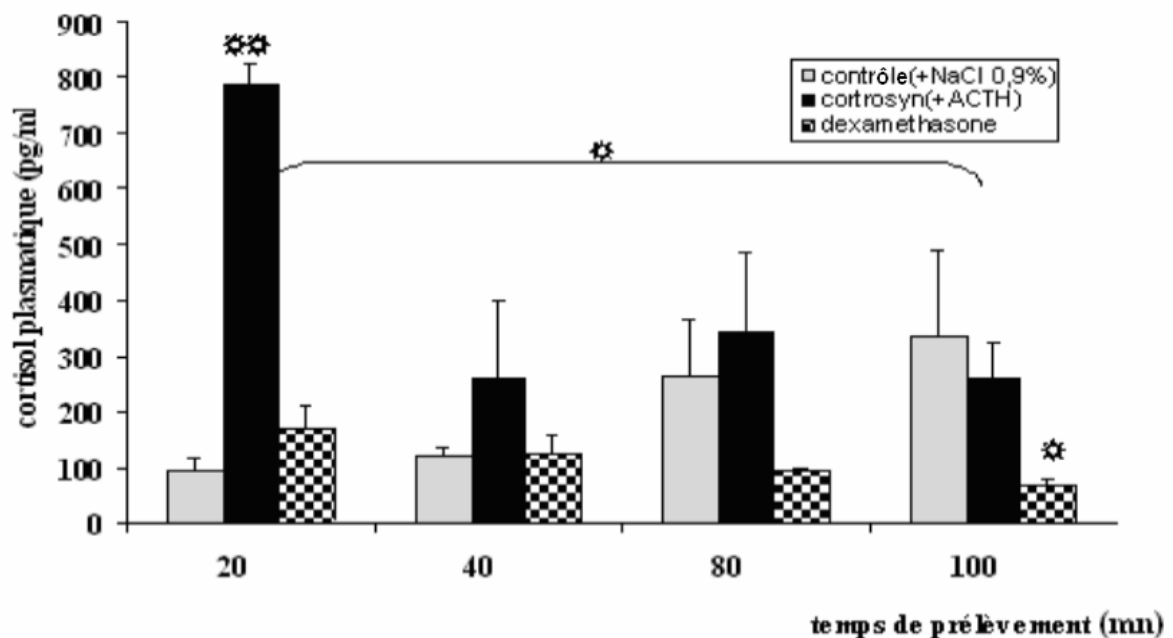


Figure 2: Effet du cortrosyn (10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur le cortisol plasmatique

3: Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de cortisol dans la glande surrénale

Comme le montre la figure 3, les taux de cortisol surrénalien chez les témoins ne varie pas de manière significative, avec moyenne estimée à $6,99 \pm 1,19$ ng/g de tissu. L'injection de cortrosyn entraîne une augmentation significative (+200%, $p < 0,01$) du taux de cortisol surrénalien 40 mn après l'injection alors que ce taux est abaissé 20 min (-40%, $p < 0,05$) après l'injection par rapport aux témoins. Après 40 mn ce taux se stabilise et reste équivalent à la valeur des témoins.

L'injection de dexaméthasone entraîne une augmentation très significative (+311%, $p < 0,01$) du taux de cortisol surrénalien seulement après 80 mn d'injection, qui retourne après 100mn à une valeur équivalente à celle des témoins

Tableau 3 : Concentrations de cortisol dans la glande surrénale des lapins témoins et injectés au cortrosyn ou à la dexaméthasone

(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

Cortisol surrénalien (ng/g $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M $\pm$ SEM
Témoin +NaCl 0,9%	6,41 $\pm$ 0,58	10,25 $\pm$ 0,91	6,81 $\pm$ 1,16	4,52 $\pm$ 0,86	6,99 $\pm$ 1,19
+ Cortrosyn 10μg/kg	3,8 $\pm$ 0,79	30,8 $\pm$ 1,97	5,69 $\pm$ 1,19	7,75 $\pm$ 1,43	
+Dexaméthasone 100 μg/animal	3,61 $\pm$ 0,12	10,27 $\pm$ 0,56	27,98 $\pm$ 3,7	5,64 $\pm$ 0,38	
Test de Student	T-C < 0,05	T-C < 0,01	T-C=NS	T-C=NS	
Probabilité p	T-D < 0,05	T-D=NS	T-D0 < 0,01	T-D=NS	

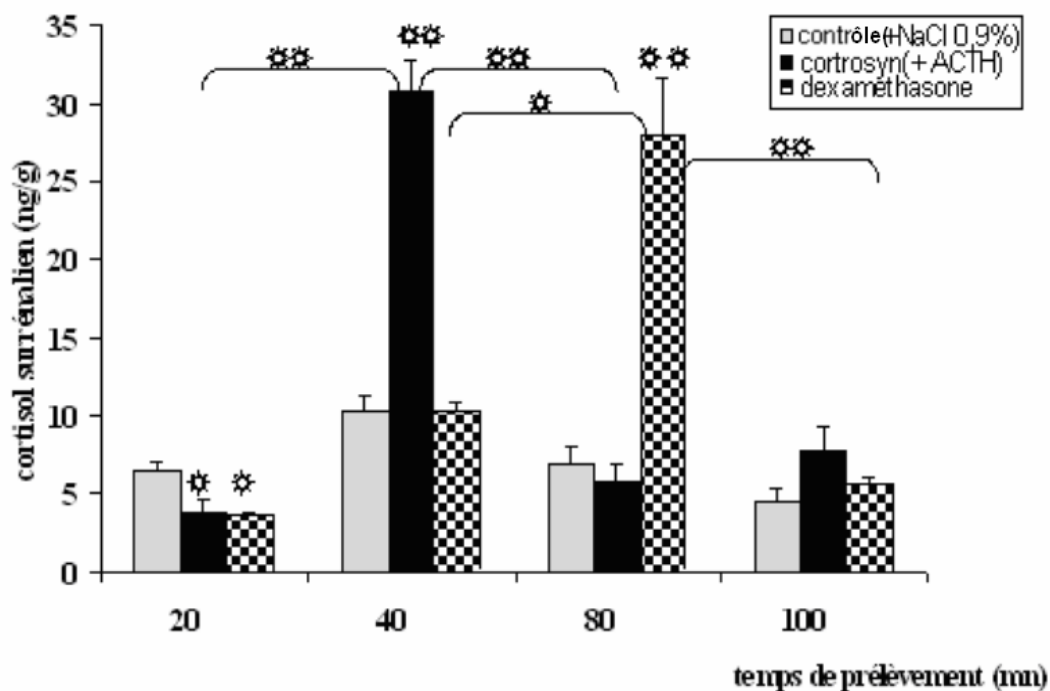


Figure 3: Effet du cortrosyn (10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur le cortisol surrénalien chez le lapin mâle

4 : Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de testostérone plasmatique

Avec une moyenne de 602 ± 70 pg/ml, la testostérone ne montre pas de fluctuations significatives chez les témoins. Elle augmente de manière très significative (+ 338%, $p < 0,01$), 20mn après l'injection du cortrosyn avant de retourner à des valeurs proches des témoins, pour augmenter significativement (+256%, $p < 0,05$) de nouveau 100mn après l'injection du cortrosyn.

L'injection de la dexaméthasone fait chuter la testostérone de manière significative (-70%, $p < 0,05$) après 20mn, qui revient se stabiliser entre 40mn et 10mn à une valeur proche de celle des témoins.(figure 4).

Tableau 4 : Concentrations de testostérone dans le plasma des lapins témoins et injectés au cortrosyn ou à la dexaméthasone
(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

Testostérone plasmatique (pg/ml $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M $\pm$ SEM
Témoin +NaCl 0,9%	468 $\pm$ 65	630 $\pm$ 56	788 $\pm$ 47	522 $\pm$ 226	602 $\pm$ 70,5
+ Cortrosyn 10 μ g/kg	2053 $\pm$ 169,5	1274 $\pm$ 231	1037 $\pm$ 435	1863 $\pm$ 248	
+Dexaméthasone 100 μ g/animal	138 $\pm$ 46	464 $\pm$ 65	585 $\pm$ 88	546 $\pm$ 145	
Test de Student	T-C< 0,01	T-C= NS	T-C = NS	T-C< 0.05	
Probabilité p	T-D< 0,05	T-D = NS	T-D = NS	T-D = NS	

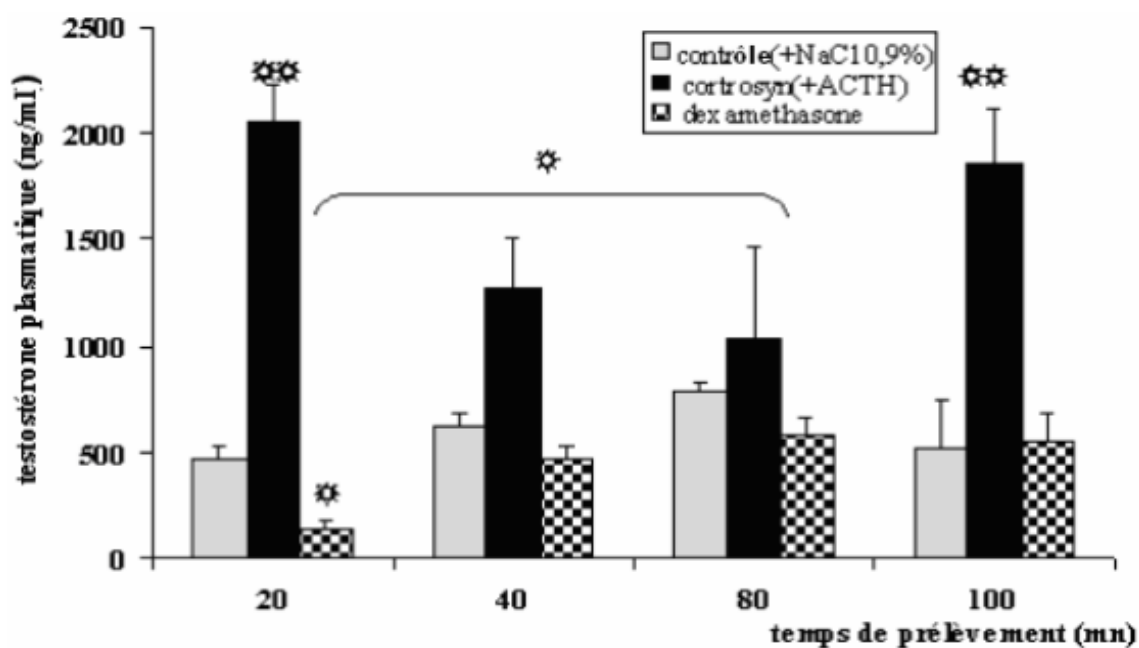


Figure 4: Effet du cortrosyn(10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur la testostérone plasmatique chez le lapin mâle

5 : Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de testostérone testiculaire

Le testostérone est stable chez les témoins avec une moyenne de $2,13 \pm 0,84$ ng/g de tissu..Elle augmente très significativement ($+338\%$, $p < 0,01$) 20mn, puis 80mn ($+766\%$, $p < 0,01$) après l'administration du cortrosyn.

L'injection de dexaméthasone diminue la testostérone de manière non significative après 20mn, , mais l'augmente significativement après 80mn ($+326\%$; $p < 0,01$), rejoint des taux de même niveau que ceux des témoins.

Tableau 5:Concentrations de testostérone dans le testicule des lapins témoins et injectés au cortrosyn ou à la dexaméthasone
(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

Testostérone testiculaire (ng/g $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M$\pm$SEM
Témoin +NaCl 0,9%	1,34 $\pm$ 0,22	1,21 $\pm$ 0,55	1,32 $\pm$ 0,37	4,67 $\pm$ 0,38	2,13 $\pm$ 0,84
+ Cortrosyn 10μg/kg	5,84 $\pm$ 1,34	2,49 $\pm$ 0,1	11,4 $\pm$ 0,38	4,1 $\pm$ 0,88	
+Dexaméthasone 100 μg/animal	0,55 $\pm$ 0,05	1,73 $\pm$ 0,12	5,63 $\pm$ 0,38	3,8 $\pm$ 0,97	
Test de Student Probabilité p	T-C < 0,05 T-D = NS	T-C =NS T-D = NS	T-C < 0,01 T-D < 0,05	T-C= NS T-D= NS	

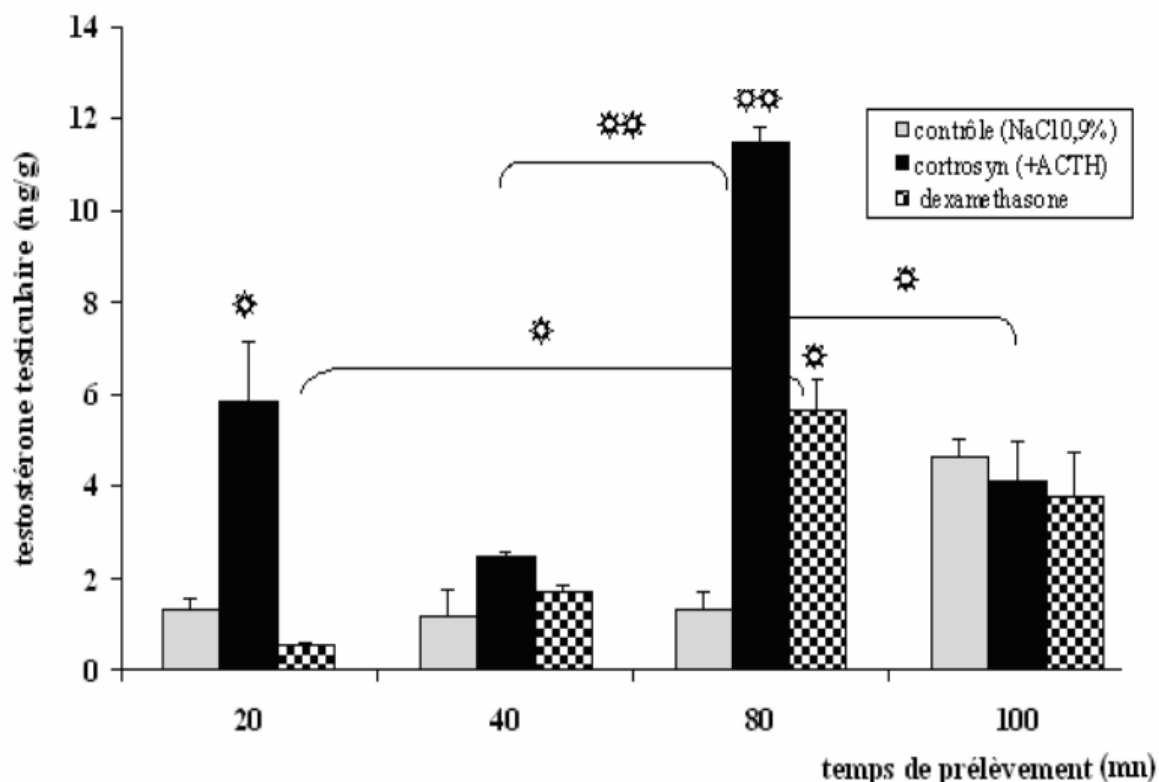


Figure 5: Effet du cortrosyn (10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur la testostérone testiculaire chez le lapin

6 : Etude cinétique des effets du cortrosyl et de la dexaméthasone sur les taux de testostérone surrénalienne

Les concentrations de testostérone ne sont pas significativement différentes chez les témoins et enregistrent une moyenne de $2,22 \pm 0,56$ ng/g. Elles chutent fortement de 73% ($p < 0,01$) 20mn après l'injection du cortrosyn, retournent aux valeurs basales des témoins à 40mn, puis sont multipliées par 3 ($p < 0,05$) 100mn après l'injection (figure 6)

La figure 6 montre aussi que comparées aux témoins les teneurs de testostérone ne sont pas modifiées par la dexaméthasone durant les 40mn qui suivent son injection, mais elles sont remarquablement augmentées ($p < 0,05$) 100 mn après l'injection.

Tableau 6 : Concentrations de testostérone dans la glande surrénale des lapins témoins et injectés au cortrosyn ou à la dexaméthasone
(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

Testostérone surrénalienne (ng/g $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M $\pm$ SEM
Témoin +NaCl 0,9%	3,57 $\pm$ 0,28	2,72 $\pm$ 0,58	1,21 $\pm$ 0,3	1,41 $\pm$ 0,38	2,22 $\pm$ 0,558
+ Cortrosyn 10 μ g/kg	0,957 $\pm$ 0,17	2,37 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,17	4,28 $\pm$ 0,49	
+Dexaméthasone 100 μ g/animal	2,57 $\pm$ 0,39	3,38 $\pm$ 0,6	2,39 $\pm$ 0,09	3,75 $\pm$ 0,37	
Test de Student	T-C < 0,01	T-C= NS	T-C < 0,05	T-C < 0,05	
Probabilité p	T-D= NS	T-D=NS	T-D < 0,05	T-D < 0,01	

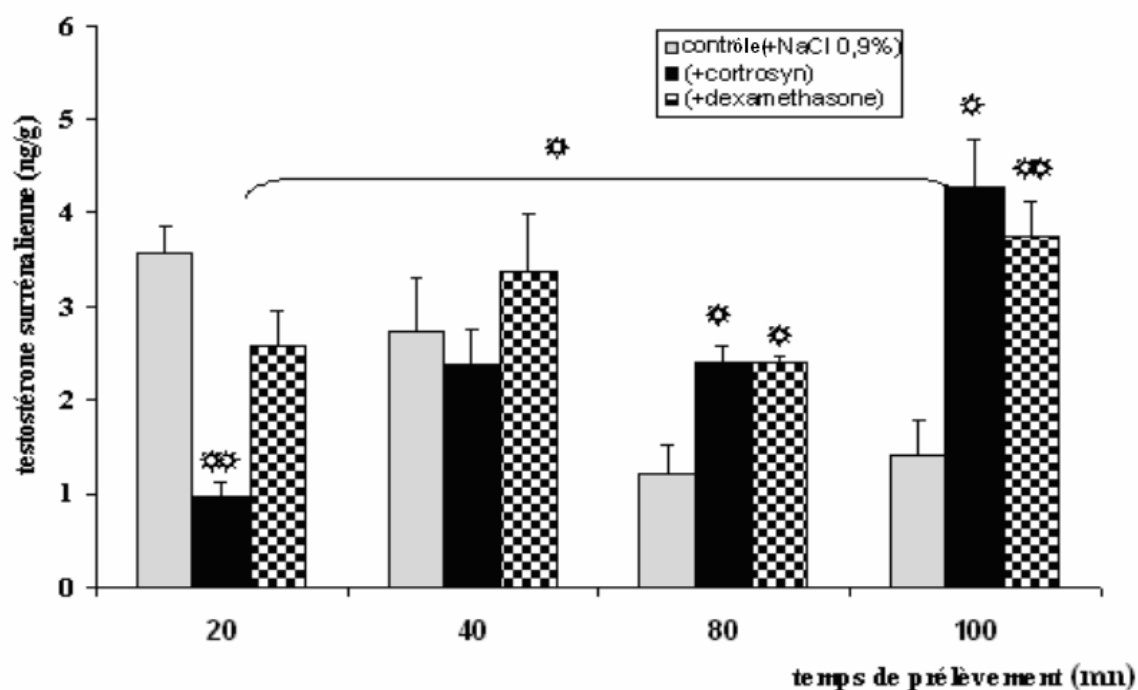


Figure 6: Effet du cortrosyn(10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur la testostérone surrénalienne chez le lapin

7 : Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de LH plasmatique

D'après la figure 7, on observe une stabilité des concentrations de LH chez les témoins, avec une moyenne de $0,52 \pm 0,19$ mUI/ml.

Après l'injection du cortrosyn la LH augmente très significativement (+2380%, $p < 0,01$) au bout de 20mn. Cette augmentation persiste jusqu'à 40mn puis revient à des valeurs basales à partir de 80mn. De manière similaire, la dexaméthasone provoque une élévation significative de la LH au bout de 20mn (720%; $p < 0,01$) mais les valeurs restent significativement élevées jusqu'à 80mn. (Figure 7)

Tableau 7 : Concentrations de LH dans le plasma des lapins
témoins et injectés au cortrosyn ou à la dexaméthasone
(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

LH plasmatique (mUI/ml $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M$\pm$SEM
Témoin +NaCl 0,9%	0,15 $\pm$ 0,017	0,61 $\pm$ 0,057	0,29 $\pm$ 0,08	1,03 $\pm$ 0,042	
+ Cortrosyn 10μg/kg	3,72 $\pm$ 0,045	2,84 $\pm$ 0,23	0,32 $\pm$ 0,04	0,27 $\pm$ 0,075	
+Dexaméthasone 100 μg/animal	1,22 $\pm$ 0,044	1,298 $\pm$ 0,21	1,32 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,11	
Test de Student Probabilité p	T-C < 0,01 T-D < 0,01	T-C < 0,01 T-D < 0,05	T-C < 0,05 T-D < 0,01	T-C < 0,05 T-D = NS	

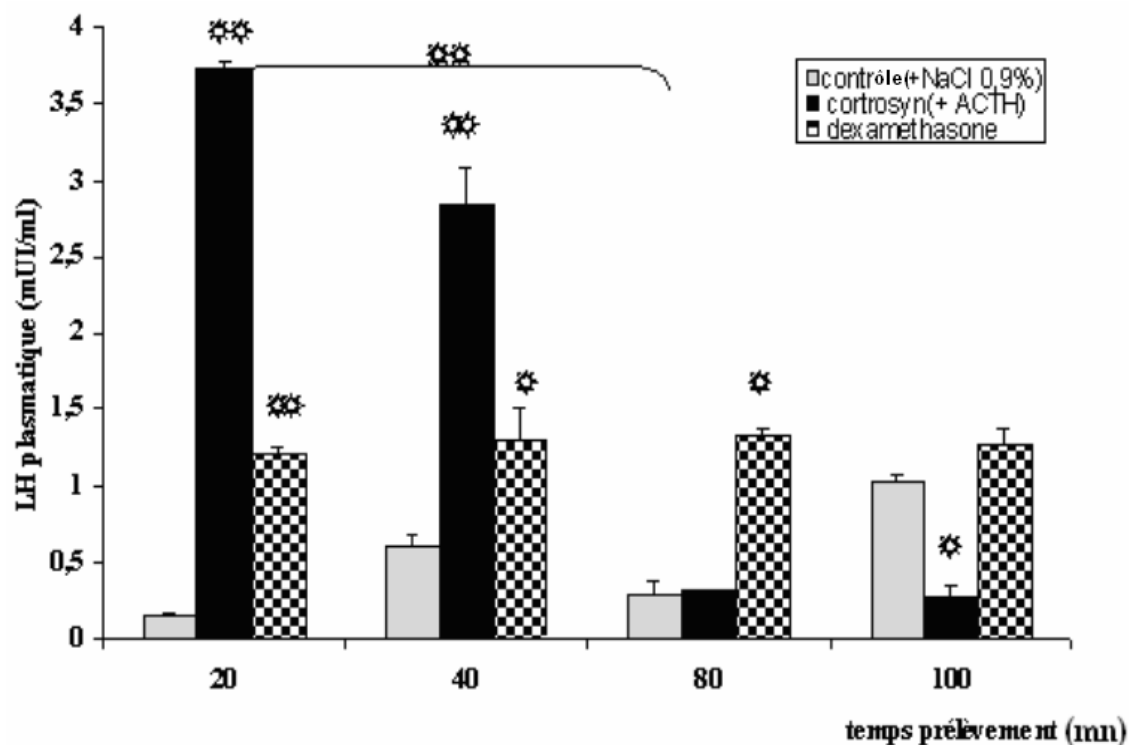


Figure 7: Effet du cortrosyn (10ug/kg) et de la dexaméthasone (100ug) sur la LH plasmatic chez le lapin mâle

8 : Etude cinétique des effets du cortrosyn et de la dexaméthasone sur les taux de FSH plasmatic

La figure 8 montre de légères fluctuations de la FSH chez les témoins avec une concentration moyenne de $29,6 \pm 6,85$ mUI/ml. Comme pour la LH, le cortrosyn augmente fortement la FSH à partir de 40mn (+206%; $p < 0,01$) par rapport aux témoins. Cette augmentation s'atténue et devient non significative 80mn puis 100mn après l'injection.

Par contre l'injection de dexaméthasone fait chuter rapidement la FSH de manière drastique (-95,6%, $p < 0,01$) dès 20mn. Cet effondrement persiste et montre des valeurs de FSH qui stagnent au même niveau bas jusqu'à 100mn.

Tableau 8 : Concentrations de FSH dans le plasma des lapins témoins et injectés au cortrosyn ou à la dexaméthasone
(chaque moyenne est calculée avec un effectif de 3 lapins)

FSH plasmatique (mUI/ml $\pm$ esm)					
Temps de prélèvement	20mn	40mn	80mn	100mn	M $\pm$ SEM
Témoin +NaCl 0,9%	33,99 $\pm$ 5,14	13,67 $\pm$ 0,13	46 $\pm$ 9,28	25 $\pm$ 1,17	29,6 $\pm$ 6,85
+ Cortrosyn 10 μ g/kg	42,43 $\pm$ 0,17	41,89 $\pm$ 1,07	63,8 $\pm$ 1,83	47,9 $\pm$ 0,32	
+Dexaméthasone 100 μ g/animal	1,472 $\pm$ 0,04	1,45 $\pm$ 0,048	1,40 $\pm$ 0,098	1,48 $\pm$ 0,056	
Test de Student	T-C < 0,057	T-C < 0,01	T-C= NS	T-C < 0,01	
Probabilité p	T-D < 0,01	T-D < 0,01	T-D < 0,01	T-D < 0,01	

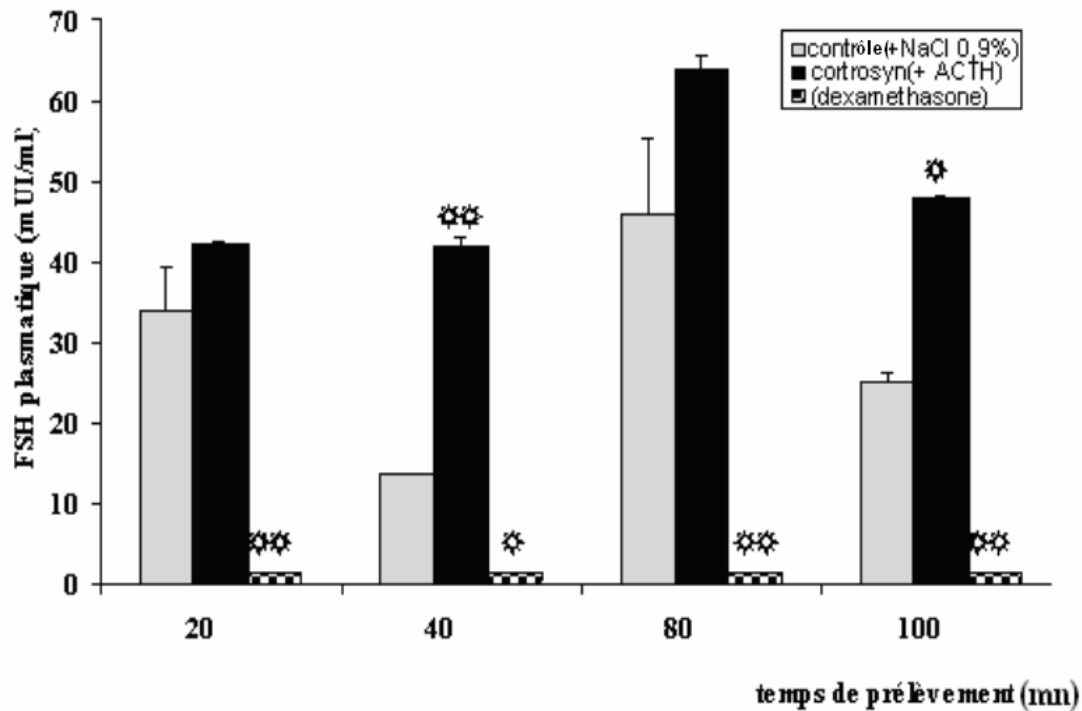


Figure 8: Effet du cortrosyn (10 μ g/kg) et de la dexaméthasone (100 μ g) sur la FSH plasmatique chez le lapin mâle

Discussion

Parties I et II

Discussion

Dans cette étude, nous avons utilisé la lignée tumorale de souris ATC7-L, qui décrit un phénotype complet des cellules fasciculée et réticulée, car elles expriment l'ARNm de MC2R et produisent la corticostérone après une stimulation par l'ACTH comme il a été décrit (Ragazzon *et al.*, 2006). Nous avons confirmé par Western blot que ces cellules expriment les protéines MC2-R et montré que la forme majeure correspond à un poids moléculaire de 43 kDa, qui est plus élevé que celui défini par sa séquence en acide aminés. Ceci pourrait être expliqué par des modifications post-transcriptionnelles des protéines natives, dans la mesure où ces récepteurs possèdent plusieurs sites potentiels de N-glycosylation ou de phosphorylation par les protéines kinases (Mountjoy *et al.*, 1992), et il est reconnu que ces modifications pourraient augmenter la stabilité de protéines telles que les récepteurs. Nous avons aussi montré que le niveau des protéines MC2-R est diminué mais de manière non significative par le traitement des cellules à l'ACTH. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de travaux antérieurs sur des cellules surrénaliennes bovines et humaines qui montrent que le niveau d'ARNm qui code pour MC2-R ainsi que le nombre de sites de liaison à l'ACTH augmentent en réponse à un traitement chronique à l'ACTH (Lebrethon *et al.*, 1994 ; Penhoat *et al.*, 1994). Ceci pourrait être dû à des différences d'espèces, car comme il a été rapporté sur des cellules tumorales surrénaliennes Y1 de souris, le traitement à l'ACTH désensibilise la réponse de l'AMPc de ses propres récepteurs (Baig *et al.*, 2001). Nos résultats montrent aussi que le traitement à la leptine cause une chute modérée mais significative du niveau de la protéine MC2-R sans modification des niveaux d'ARNm, ce qui démontre que la leptine affecterait plutôt la stabilité de la protéine. Cette observation révèle la présence de récepteurs à la leptine fonctionnels sur ces cellules. De plus, elle constitue une donnée intéressante dans la mesure où des travaux antérieurs ont montré que la leptine régule négativement la stéroïdogénèse aussi bien dans les conditions basales que sous une stimulation par l'ACTH (Bornstein *et al.*, 1997, Pralong *et al.*, 1998; Doghman *et al.*, 2005). Ceci pourrait être dû à une diminution du niveau de MC2-R induit par la leptine étant donné que le nombre de sites de liaisons à la surface de la cellule est déjà réduit dans les cellules contrôles chez toutes les espèces (Bégeot *et al.*, 1984). Ces résultats obtenus *in vitro* sur les cellules ATC7-L sont corrélés avec les résultats obtenus sur des surrénales de souris DIO chez lesquelles le niveau des protéines MC2-R est réduit comparé à celui des souris contrôles, en tenant compte que la souris DIO affiche un taux élevé de leptine plasmatique consécutif à un développement

excessif du tissu adipeux après 8 semaines de régime riche en lipides (Moraes *et al.*, 2003). Ceci pourrait en partie expliquer la diminution du niveau de MC2-R chez les souris obèses, considérant que la surrénale reste sensible à l'action de la leptine chez ces souris, contrairement à ce qui est observé au niveau central où l'on note une leptino-résistance (Moraes *et al.*, 2003).

Nous n'avons pu détecter d'expression de MC3-R aussi bien dans les cellules ATC7-L que dans les surrénales prélevées sur des souris contrôles et DIO, contrairement aux travaux qui ont mis en évidence l'expression de l'ARNm codant pour MC3-R aussi bien dans la lignée de cellules tumorales surrénaliennes humaines H295R (Doghman *et al.*, 2004), chez le rat (Dhillon *et al.*, 2003) que chez le poulet (Takeuchi *et al.*, 1999). La présence de ces récepteurs pourrait dépendre de l'espèce.

Cependant les cellules ATC7-L expriment le récepteur MC4-R qui est couplé à la stéroïdogénèse, comme cela a été montré par l'activation de l'agoniste de α -MSH. Ces résultats prouvent que la présence de MC4-R fonctionnel constitue la caractéristique des cellules surrénaliennes quelle que soit leur origine, vu que les récepteurs ou leurs ARNm ont été déjà détectés chez plusieurs espèces telles que l'homme, le rat et le poulet (Doghman *et al.*, 2005; Dhillon *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 1999). Pour la première fois nous rapportons que l'expression de MC4-R est négativement régulée par le traitement des cellules avec NDP- α MSH ou l'Agrp. Ceci est en accord avec les travaux de Doghman *et al.*, (2005) qui démontrent qu'un traitement à long terme de cellules surrénaliennes bovines isolées avec de l'Agrp induit une forte inhibition de la production de cortisol stimulée par NDP- α MSH. Ce résultat pourrait être expliqué par une diminution de la concentration du récepteur MC4-R à la surface cellulaire. De plus ces résultats sont corrélés avec ceux des surrénales prélevées sur les souris DIO, qui montrent un effondrement des niveaux de MC4-R comparés aux animaux contrôles. En effet, il a été montré chez des sujets obèses que le niveau de α -MSH et d'Agrp sont augmentés (Katsuki *et al.*, 2000; 2001), et cela pourrait expliquer les effets sur MC4-R observés chez les souris obèses.

A côté de l'expression de MC4-R, nous avons montré que les cellules ATC7-L expriment et sécrètent son antagoniste, l'Agrp comme il a été rapporté sur les cellules surrénaliennes normales ou tumorales de la plupart des espèces (Bicknell *et al.* 2000; Dhillon *et al.*, 2003; Doghman *et al.* 2004). A partir de ces résultats, il devient évident que chez les mammifères l'Agrp est exprimé dans le cortex surrénalien plutôt que dans la médulla (Ollmann *et al.*, 1997) et ceci contrairement au poulet, où l'immunoréactivité de l'Agrp est détectée dans les cellules

de la médulla (Mirabella *et al.*,2004). De ce fait, nous avons montré pour la première fois que la sécrétion d'Agrp dans le milieu de culture est augmenté après un traitement des cellules à la leptine, mais le taux de production en terme de concentration reste au niveau d'une nanomolaire. Par contre, aucun effet de la leptine sur les cellules H295-R et les cellules tumorales Y1 n'a été relevé sur le niveau d'ARNm codant pour l'Agrp (Charbonneau *et al.*, 2004).

La production d'Agrp par les cellules ATC7-L est aussi augmentée après un traitement à l'insuline ou la dexaméthasone. Ces résultats sont en plus corrélés par le fait que le taux d'ARNm codant pour l'Agrp est augmenté dans les surrénales de souris DIO en comparaison avec les contrôles. Aussi nous pouvons suggérer l'hypothèse que l'augmentation des niveaux plasmatiques de leptine, d'insuline ou de corticostérone chez les souris obèses comme décrit précédemment (Moraes *et al.*,2003) pourrait agir localement pour augmenter la décharge d'Agrp par la surrénale. Cela aurait pour conséquence une diminution de MC4R comme il a été observé dans les surrénales des souris DIO.

Conclusion

A partir de nos résultats, nous concluons que l'expression de MC4-R et de l'Agrp est la caractéristique générale des cellules surrénaliennes et il reste plausible de spéculer sur un éventuel rôle compensatoire de ce système mélanocortinergique qui prendrait le relais dans la production des glucocorticoïdes, notamment dans le cas où la voie classique qui fait intervenir MC2-R et l'ACTH soit déficiente. Nous montrons pour la première fois que la production d'Agrp pourrait être modulée par des hormones qui interviennent de manière primordiale dans la prise alimentaire. En plus, nous avons rapporté que la leptine et l'Agrp qui atteignent des taux élevés dans l'obésité sont capables de réguler négativement respectivement MC2-R et MC4-R. Ceci suggère l'existence de mécanismes de régulation qui interagissent entre l'état métabolique et la production de glucocorticoïdes, qui exercent au niveau central un rôle permissif favorisant le développement de l'obésité.

Discussion

Nous montrons dans cette étude que l'administration de 10µg/kg de cortrosyn ou 100µg de dexaméthasone entraîne chez le lapin mâle une diminution significative synchrone et dès 20mn de l'ACTH plasmatique qui persiste jusqu'à 80mn après l'injection du cortrosyn ou de la dexaméthasone, mais qui s'atténue complètement après 100mn. L'ACTH plasmatique qui croise très faiblement avec le cortrosyn (ACTH₁₋₂₄) dans le dosage RIA, diminue après 20mn, suggérant une stimulation directe de la glande surrénale par le cortrosyn pour sécréter le cortisol, mais aussi à travers la chute du cortisol surrénalien au même moment. Cette hypercortisolémie actionnerait un rétrocontrôle négatif sur l'hypothalamus ou sur l'hypophyse pour inhiber la sécrétion de l'ACTH endogène qui se traduit par sa chute prononcée dans le plasma après 20mn. Après 40mn, la synthèse *de novo* est reprise dans la surrénale, entretenue par l'augmentation concomitante de l'ACTH plasmatique qui stimule la stéroïdogénèse 80 et 100mn après l'injection du cortrosyn. Ce rétrocontrôle du cortisol au niveau hypophysaire ou hypothalamique a été aussi rapporté (Breen et Karsch, 2004; Kamel and Kubajak, 1987, Gore et al., 2006). L'augmentation des glucocorticoïdes en réponse à l'ACTH est confirmée par les travaux de Faulborn et al., 1979) chez le lapin *in vivo* avec des doses de 2,5, 5 et 10µg/kg de tétracosactide, et *in vitro* avec 200µg d'ACTH₁₋₂₄ et qui affecte l'expression de l'ARNm codant pour des enzymes stéroïdogènes notamment la P450c21 et la P450c17, alors que la P450scc, la 3β-HSD et la P450c11 ne sont pas modifiées (Kolanowski et al., 1985). Cet effet est aussi observé chez le sanglier avec 1UI/kg d'ACTH (Liptrap et Raeside, 1975), chez le rat avec 50µg ou 100µg par jour de synacthène dépôt pendant 10 jours (Vreeburg et al., 1984); par contre chez le porc l'ACTH diminue l'expression d'ARNm de la P450c21 et la P450c17, mais n'affecte pas celles de la P450scc, la 3β-HSD et la P450c11 (Provencher et al., 1992). Cette augmentation est aussi constatée chez les animaux sauvages tels que le cerf à queue blanche avec 10, 20 et 40UI d'ACTH (Smith et Bubenick, 1990) et le rat du désert *Psammomys obesus*, chez lequel l'élévation saisonnière de l'ACTH plasmatique et hypophysaire en été est synchrone à la stimulation de la synthèse du cortisol (Amirat et Brudieux., 1993). L'augmentation rapide de la LH dès 20mn et celle plus tardive de la FSH à 80mn en réponse au cortrosyn laisse penser que le cortrosyn stimule directement l'hypophyse antérieure et induit la sécrétion des gonadotrophines. Cet effet a été aussi mis en évidence *in vitro* par l'action biphasique de l'ACTH sur les cellules gonadotropes, en réponse à la GnRH (Fuquay et Moberg, 1983),

et sur des cellules hypophysaires ovines traitées avec la molécule entière d'ACTH₁₋₃₉ et son fragment ACTH₁₈₋₃₉ à 5.10^{-7} M qui stimulent la sécrétion de LH en réponse à la GnRH (10^{-9} M); par contre le synacthène à la même dose diminue la sécrétion de LH (Matteri et al.,1984) suggérant que l'ACTH s'exprime par un effet direct sur les gonadotrophines hypophysaires, indépendamment de la sécrétion des stéroïdes surrénaliens. L'augmentation de testostérone dans le plasma 20mn après l'injection du cortrosyn de manière synchrone avec le cortisol et qui est concomitante à sa diminution avec le cortisol dans la surrénale, suggère que ces deux hormones sont sécrétées conjointement par la décharge glandulaire, alors que la dexaméthasone diminue le taux de testostérone plasmatique mais ne semble pas influencer la synthèse de testostérone par la surrénale de façon significative 40mn après son injection. Parallèlement, la testostérone testiculaire qui s'élève aussi dès 20mn coïncidant avec celle des taux plasmatique de LH, serait la conséquence d'une stimulation de la stéroïdogénèse testiculaire par la LH qui atteint son maximum 80mn après l'injection du cortrosyn, mais son effet ne dure pas puisque la testostérone qui reste élevée dans le plasma par rapport aux témoins causerait ensuite la chute de la LH à 80mn par un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse. Par contre, la stagnation de la FSH 80mn après l'injection du cortrosyn, montre qu'elle ne semble pas directement impliquée dans la stéroïdogénèse testiculaire. Une stimulation analogue de la testostérone est observée aussi chez le lapin *in vitro* avec 24,2µg/jour d'ACTH₁₋₂₄ (Kolanowski et al.,1987), chez le rat avec 0,2µg/ml d'ACTH, mais n'est pas modifiée en présence de LH ou FSH (Vinson et al.,1976). Pitzel et al.,(1984) avancent que l'ACTH peut stimuler un type de cellules testiculaires autres que les cellules de Leydig pour sécréter un facteur ou un messenger, probablement un ACTH-like peptide (Valenca et Negro-Vilar,1988) lui aussi stimulé par l'ACTH endogène et qui induirait à son tour la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig. Cependant les données récentes qui montrent la présence de récepteurs de l'ACTH (MC2R) spécifiques au niveau testiculaire accordent un rôle important à ces récepteurs au cours du développement testiculaire chez le fœtus, (O'shaughnessy et al., 2003; Johnston et al.,2007), et justifient un effet direct de l'ACTH sur le testicule. Compte tenu des variations de l'ACTH et de la LH endogènes et celles du cortisol surrénalien et plasmatique, il est peu probable que le cortrosyn agisse directement sur le testicule. Toutefois, seule une étude des variations d'expression des récepteurs testiculaires à l'ACTH chez le lapin pourrait vérifier cette hypothèse. Le récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4-R) qui est aussi impliqué dans le contrôle de la fonction érectile pourrait aussi avoir un rôle additif dans cette régulation. La baisse de l'ACTH plasmatique après 20mn en réponse à la dexaméthasone, suggère que sa sécrétion est inhibée par une rétroaction négative analogue à

celle du cortisol, et s'accompagne d'une chute du cortisol surrénalien. Cela pourrait être expliqué par une modification dans la fonctionnalité des récepteurs GR (Spiga et al.,2007); La nouvelle augmentation du cortisol surrénalien après 80mn serait due à une recrudescence de la stéroïdogénèse consécutivement à une surrégulation des récepteurs à l'ACTH, et par une stimulation de la production l'AMPc (Darbeida et Durand, 1988;1990), malgré les taux de l'ACTH qui restent bas après 80 et 100mn. Une étude récente a aussi rapporté que le méthylprédnisolone (MPL), un glucocorticoïde de synthèse diminue rapidement la sécrétion basale de corticostérone chez le rat mâle, et cet effet n'est pas empêché par un antagoniste aux récepteurs GR, Org 34850; cependant leur blocage par Org 34850 empêche l'inhibition de la sécrétion de corticostérone 4 et 12 h après l'administration de MPL, suggérant que les récepteurs GR interviennent dans la modulation de l'action inhibitrice retardée mais pas l'action rapide de MPL sur la sécrétion de corticostérone (Spiga et al.,2008). La diminution de FSH en réponse à la dexaméthasone qui est confirmée chez le rat (Gore et al., 2006) pourrait être due à une sensibilité moindre au feed back positif consécutif au faible taux plasmatique de testostérone, et confirme ainsi que FSH intervient spécifiquement dans le contrôle de la spermatogénèse mais pas de façon directe dans la stéroïdogénèse testiculaire. L'effet stimulateur de la dexaméthasone sur la LH est aussi observé chez le singe (Hayashi et Moberg,1990), mais pas chez le cobaye avec 2 μ mole de dexaméthasone plus 20UI d'ACTH (Fenske,1997), et chez le rat avec 500 ou 2000 μ g de dexaméthasone (Tohei et al.,1997). Avec de fortes doses de cortisol (100mg deux fois par jour),la sensibilité hypophysaire à la GnRH est diminuée ainsi que la testostéronémie (Sapolsky, 1985), suggérant que le site d'action primordial des glucocorticoïdes se situe au niveau de l'hypothalamus (Hayashi et Moberg,1990). Les taux stagnants de testostérone testiculaire 40mn après son injection confirme que même si la dexaméthasone se lie aux récepteurs des cellules de Leydig, elle n'a pas d'effet intrinsèque sur la stéroïdogénèse testiculaire (Fenske,1997). La baisse de la testostérone plasmatique en réponse à la dexaméthasone, confirmée in vitro chez le rat, serait consécutive à la diminution du taux d'AMPc ainsi qu'à l'activité de la 17 α -hydroxylase sans altérer l'activité de la 17-20 lyase (Bambino et Hsueh,1981;Welsh et al.,1982).

Conclusion

Les variations cinétiques hormonales enregistrées chez le lapin mâle en réponse au cortrosyn plaideraient en faveur d'une action double du cortrosyn, la première en stimulant la décharge du cortisol et de la testostérone par la glande surrénale, ensuite relayée par la sécrétion de l'ACTH endogène qui stimulerait la stéroïdogénèse dans cette glande. Ce mécanisme mettrait en évidence l'intervention de la glande surrénale dans la régulation du pool de la testostérone circulante. Par ailleurs, le cortrosyn induirait la décharge des gonadotrophines, et de façon primordiale la LH qui stimulerait la stéroïdogénèse testiculaire via ses récepteurs sur les cellules de Leydig. Les variations des niveaux de testostérone dans la glande surrénale sont également contrôlées par les taux du cortisol et de l'ACTH circulants à travers un rétrocontrôle sur la sécrétion de l'ACTH endogène. La dexaméthasone ne semble pas influencer la stéroïdogénèse testiculaire, mais montre par contre un effet spécifique chez le lapin en augmentant la LH et en diminuant la FSH. Il est aussi probable que l'interaction de la surrénale avec le testicule intervient via les récepteurs aux glucocorticoïdes et/ou aux mélanocortines au niveau du testicule, particulièrement les récepteurs MC2-R à l'ACTH, et MC4-R qui intervient dans le fonctionnement érectile. De ce fait une investigation de l'expression de ces récepteurs est nécessaire afin d'apporter une interprétation exhaustive aux mécanismes de régulation de l'activité corticosurrénalienne liée à la fonction testiculaire.



Perspectives

Il est certain que «l'appétit» est ouvert (c'est le cas de le dire) dans la perspective de trouver un prolongement à ce travail, car il est question de lien entre l'obésité et la surexpression de la 11 β -HSD-I qui induit l'augmentation du taux de glucocorticoïdes actifs, en l'occurrence le cortisol ou la corticostérone. Et à la lumière des recherches très récentes qui sont axées sur la 11 β -HSD-I, il serait intéressant d'aborder une approche thérapeutique par l'utilisation d'inhibiteurs de cette enzyme sur des animaux soumis à un régime high fat en évaluant :

- Les variations d'expression de la 11 β -HSDI dans le tissu adipeux avant et après l'administration d'inhibiteurs aux animaux obèses, comparés aux animaux contrôles non traités.
- Les variations d'expression de l'Agrp et du récepteur MC4R dans l'hypothalamus et la surrénale dans les 2 lots d'animaux
- Les paramètres endocriniens impliqués dans la régulation de la prise alimentaire telles: la leptine, l'Agrp, l'insuline, les glucocorticoïdes actifs et inactifs. Ces paramètres seront dosés dans le sang, le tissu adipeux (périssurrénalien, péritesticulaire), et dans la surrénale.
- Les répercussions sur le poids des animaux

Une étude comparée peut être envisagée sur des espèces comme le rat des sables *Psammomys obesus* et la souris C57BL/6J,

D'autre part, il serait intéressant d'enregistrer sur ces animaux les répercussions sur la fonction testiculaire, notamment les variations d'expression des récepteurs MC2R et MC4R, et la sécrétion de testostérone.

Souhaitons que ce projet puisse trouver les moyens d'être concrétisé :

- D'une part, par le biais d'un appui financier conséquent dans le cadre de l'aide apportée par l'Etat à la recherche nationale.
- D'autre part, qu'il soit conforté par des projets de collaborations scientifiques..

BIBLIOGRAPHIE

Abdel-Malek ZA (2001) Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 58(3):434-41. Review.

Abney TO (1999) The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids.* 64(9):610-7.

Adam CL, Archer ZA, Findlay PA & Thomas L Marie M (2002) Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology.* 75(4):250-6.

Adan RA, Hillebrand JJ, De Rijke C, Nijenhuis W, Vink T, Garner KM & Kas MJ (2003) Melanocortin system and eating disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 994:267-74.

Adcock IM & Ito K (2005) Glucocorticoid pathways in chronic obstructive pulmonary disease therapy. *Proc Am Thorac Soc.* 2(4):313-9; discussion 340-1. Review.

Agular BM, Vinggaard AM & Vind C (1992) Regulation by dexamethasone of the 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in adult rat Leydig cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43:565-71.

Ahima RS & Harlan RE (1992) Glucocorticoid receptors in LHRH neurons. *Neuroendocrinology.* 56(6):845-50.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E & Flier JS (1996) Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 382(6588):250-2

Air EL, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ & Woods SC (2002) Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology.* 143(6):2449-52.

Al-Barazanji KA, Miller JE, Rice SQ, Arch JR & Chambers JK (2001) C-terminal fragments of ACTH stimulate feeding in fasted rats. *Horm Metab Res.* 33(8):480-5

Albert DH, Ascoli M, Puett D & Coniglio JG (1980) Lipid composition and gonadotropin-mediated lipid metabolism of the M5480 murine Leydig cell tumor. *J Lipid Res.* 21(7):862-7.

Al-Obeidi F, Castrucci AM, Hadley ME & Hruby VJ (1989) Potent and prolonged acting cyclic lactam analogues of alpha-melanotropin: design based on molecular dynamics. *J Med Chem.* 32(12):2555-61.

Alpy F & Tomasetto C (2006) MLN64 and MENTHO, two mediators of endosomal cholesterol transport. *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 3):343-5. Review.

Alvaro JD, Tatro JB, Quillan JM, Fogliano M, Eisenhard M, Lerner MR, Nestler EJ & Duman RS (1996) Morphine down-regulates melanocortin-4 receptor expression in brain regions that mediate opiate addiction. *Mol Pharmacol.* 50(3):583-91

Amirat Z & Brudieux R (1993) Seasonal changes in in vivo cortisol response to ACTH and in plasma and pituitary concentrations of ACTH in a desert rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 104(1):29-34.

Amirat Z, Khammar F & Brudieux R (1980) Seasonal changes in plasma and adrenal concentrations of cortisol, corticosterone, aldosterone, and electrolytes in the adult male sand rat (*Psammomys obesus*). *Gen Comp Endocrinol.* 40(1):36-43.

Amsterdam A & Suh BS (1991) An inducible functional peripheral benzodiazepine receptor in mitochondria of steroidogenic granulosa cells. *Endocrinology.* 129(1):503-10.

Anbalagan M & Rao AJ (2004) Collagen IV-mediated signalling is involved in progenitor Leydig cell proliferation *Reprod Biomed Online.* 9(4):391-403

- Anubhuti A S (2006)** Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity *Neuropeptides*. 40(6):375-401
- Anukulkitch C, Rao A, Dunshea FR, Blache D, Lincoln GA & Clarke IJ (2007)** Influence of photoperiod and gonadal status on food intake, adiposity, and gene expression of hypothalamic appetite regulators in a seasonal mammal. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(1):R242-52.
- Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS & Kahn CR (1994)** Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*.372(6502):186-90.
- Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SM & Mason JI (2000)** Effects of tri-iodothyronine on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal Rat. *Biol Reprod*. 63(2):493-502.
- Asakawa A, Inui A, Ueno N, Makino S, Fujino MA & Kasuga M (1999)** Urocortin reduces food intake and gastric emptying in lean and ob/ob obese mice. *Gastroenterology*. 116(6):1287-92.
- Attardi B, Tsujii T, Friedman R, Zeng Z, Roberts JL, Dellovade T, Pfaff DW, Chandran UR, Sullivan MW & DeFranco DB (1997)** Glucocorticoid repression of gonadotropin-releasing hormone gene expression and secretion in morphologically distinct subpopulations of GT1-7 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 131(2):241-55.
- Badrinarayanan R, Rengarajan S, Nithya P & Balasubramanian K (2006)** Corticosterone impairs the mRNA expression and activity of 3 β - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in adult rat Leydig cells. *Biochem Cell Biol*.84(5):745-54
- Bagdade JD, Bierman EL & Porte D Jr (1967)** The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects.*J Clin Invest.*;46(10):1549-57.
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS & Watson SJ (1999)** Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci*.19(18):RC26
- Bai H & Castonguay TW (2001)** Effects of adrenalectomy and hormone replacement on B6C3F1 mice fed a high-fat diet. *Physiol Behav*. 72(4):493-8.
- Baig AH, Swords FM, Noon LA, King PJ, Hunyady L & Clark AJ (2001)** Desensitization of the Y1 cell adrenocorticotropin receptor: evidence for a restricted heterologous mechanism implying a role for receptor-effector complexes. *J Biol Chem*. 276(48):44792-7.
- Baker PJ & O'Shaughnessy PJ (2001)** Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 122:227–34
- Bambino TH & Hsueh AJ (1981)** Direct inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro.*Endocrinology* 108(6):2142-8.
- Banks WA (2003)** Is obesity a disease of the blood-brain barrier? Physiological, pathological, and evolutionary considerations. *Curr Pharm Des*. 9(10):801-9. Review
- Banks WA (2004)**The source of cerebral insulin.*Eur J Pharmacol*. 19;490(1-3):5-12. Review.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB & Maness LM (1996)** Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin.*Peptides*.;17(2):305-11.
- Barsh GS, Ollmann MM, Wilson BD, Miller KA & Gunn TM (1999)** Molecular pharmacology of Agouti protein in vitro and in vivo.*Ann N Y Acad Sci*. 20;885:143-52. Review.
- Baskin DG, Schwartz MW, Sipols AJ, D'Alessio DA, Goldstein BJ & White MF (1994)** Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain.*Endocrinology*.;134(4):1952-5.

Baura GD, Foster DM, Porte D Jr, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C & Schwartz MW (1993) Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J Clin Invest.*;92(4):1824-30.

Bégeot M, Langlois D & Saez JM (1989) Insulin-like growth factor-I and insulin increase the stimulatory guanine nucleotide binding protein (Gs) in cultured bovine adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol.* 66(1):53-7.

Bégeot M, Langlois D, Spiegel AM & Saez JM (1991) Regulation of guanine nucleotide binding regulatory proteins in cultured adrenal cells by adrenocorticotropin and angiotensin-II. *Endocrinology.* 128(6):3162-8.

Bégeot M & Saez JM (2000) Melanocortins and Adrenocortical Function. *The Melanocortin Receptors* Ed: R.D Cone. Humana Press Inc, Totowa, NJ. 75-107.

Bégeot M (2003) Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology.* 144(11):4773-82.

Beltramo M, Campanella M, Tarozzo G, Fredduzzi S, Corradini L, Forlani A, Bertorelli R & Reggiani A (2003) Gene expression profiling of melanocortin system in neuropathic rats supports a role in nociception. *Brain Res Mol Brain Res.*;118(1-2):111-8.

Benoit SC, Air EL, Coolen LM, Strauss R, Jackman A, Clegg DJ, Seeley RJ & Woods SC (2002) The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci.* 22(20):9048-52.

Bénit L, Dessen P & Heidmann T (2001) Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes. *J Virol.*75(23):11709-19.

Berger M, Corre M, Jean-Faucher C, De Turckheim M, Veyssiere G & Jean C (1979) Changes in the testosterone to dihydrotestosterone ratio in plasma and testes of maturing rabbits. *Endocrinology.* 104(5):1450-4.

Berger M, Jean-Faucher C, de Turckheim M, Veyssiere G, Blanc MR, Poirier JC & Jean C (1982) Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. *Acta Endocrinol.*,99(3):459-65.

Bicknell AB, Lomthaisong K, Gladwell RT & Lowry PJ (2000) Agouti related protein in the rat adrenal cortex: implications for novel autocrine mechanisms modulating the actions of pro-opiomelanocortin peptides. *J Neuroendocrinol.*12(10):977-82.

Bicknell AB, Lomthaisong K, Woods RJ, Hutchinson EG, Bennett HP, Gladwell RT & Lowry PJ (2001) Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. *Cell.* 105(7):903-12.

Björntorp P & Rosmond R (2000) Obesity and cortisol. *Nutrition.*16(10):924-36. Review.

Blache D, Adam CL & Martin GB (2002) The mature male sheep: a model to study the effects of nutrition on the reproductive axis, *Reprod Suppl* 59. 219–33.

Blank MS, Fabbri A, Catt KJ & Dufau ML (1986) Inhibition of luteinizing hormone release by morphine and endogenous opiates in cultured pituitary cells. *Endocrinology.* 118(5):2097-101.

Bodker A, Bruun J, Balslev E, Iversen HG, Meyhoff H.H & Andersson K.E (1999) Estrogen receptors in the human male prostatic urethra and prostate in prostatic cancer and benign prostatic hyperplasia, *Scand. J. Urol. Nephrol.* 33, 237–42.

Boitani C, Chen CL, Margioris AN, Gerendai I, Morris PL & Bardin CW (1986) Pro-opiomelanocortin-derived peptides in the testis: evidence for a possible role in Leydig and Sertoli cell function. *Med Biol.* 63(5-6):251-8

Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M & Scherbaum WA (1997) Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly.

Diabetes. 46(7):1235-8.

Bornstein SR, Rutkowski H & Vrezas I (2004) Cytokines and steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol. 215(1-2) : 135-41. Review.

Boston B (1999), The role of melanocortins in adipocyte function Ann N Y Acad Sci. 885:75-84.

Boswell T, Li Q & Takeuchi S (2002) Neurons expressing neuropeptide Y mRNA in the infundibular hypothalamus of Japanese quail are activated by fasting and co-express agouti-related protein mRNA. Brain Res Mol Brain Res.;100(1-2):31-42.

Brand C, Bailly S, Defaye G, Chambaz EM & Feige JJ (1998) Differential implication of StAR and P450c17 in TGFbeta1-induced decrease of adrenocortical steroidogenesis. Endocr Res. 24(3-4):763-8.

Breen KM, Stackpole CA, Clarke IJ, Pytiak AV, Tilbrook AJ, Wagenmaker ER, Young EA & Karsch FJ (2004) Does the type II glucocorticoid receptor mediate cortisol-induced suppression in pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone? Endocrinology. 145(6):2739-46.

Breen KM & Karsch FJ (2004) Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? Endocrinology. 145(2):692-8.

Briski KP, Vogel KL & McIntyre AR (1995) The antiglucocorticoid, RU 486, attenuates stress-induced decreases in plasma-luteinizing hormone concentrations in male rats. Neuroendocrinology 61 (6) 638–45.

Brito LF, Barth AD, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr, Boisclair YR, Ehrhardt RA & Kastelic JP (2007) Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. Reproduction. 134(1):171-81.

Brown AS & Hall PF (1991) Stimulation by endozepine of the side-chain cleavage of cholesterol in a reconstituted enzyme system. Biochem Biophys Res Commun. 180(2):609-14.

Brown AM, Mayfield DK, Volaufova J & Argyropoulos G (2001) The gene structure and minimal promoter of the human agouti related protein. Gene. 277(1-2):231-8.

Bruhn TO, Sutton RE & Rivier CL Vale WW (1984) Corticotropin-releasing factor regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo. Neuroendocrinology. 39(2):170-5

Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D & Kahn CR (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science. 22;289 (5487):2122-5.

Bubenik GA, Brown RD & Schams D (1991) Antler cycle and endocrine parameters in male axis deer (Axis axis): seasonal levels of LH, FSH, testosterone, and prolactin and results of GnRH and ACTH challenge tests. Comp Biochem Physiol A. 99(4):645-50.

Bubenik GA, Smith JH, Pomerantz DK & Schams D (1990) Plasma LH, FSH, testosterone, prolactin and androstenedione in male white-tailed deer after ACTH and dexamethasone administration. Comp Biochem Physiol A.;95(1):163-9.

Bultman SJ, Michaud EJ & Woychik RP (1992) Molecular characterization of the mouse agouti locus. Cell. 71(7):1195-204.

Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL & White MF (2000) IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. Nature. 21;407(6802): 377-82

Bussolino F, DiRenzo M, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tomagnone L, Coffey A & Comoglio P (1992) Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. Journal of Cell Biology 119 629–641.

Butler AA, Kesterson RA, Khong K, Cullen MJ, Pellemounter MA, Dekoning J, Baetscher M & Cone RD (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology*. 141(9):3518-21.

Butnev VIu, Goncharov NP & (1983) Characteristics of the androgenic function of steroid-producing glands of baboons in the metapyrone test] *Biull Eksp Biol Med.*, 96(11):99-102

Buyse M, Ovesjö ML, Goïot H, Guilmeau S, Péranzi G, Moizo L, Walker F, Lewin MJ, Meister B & Bado A (2001) Expression and regulation of leptin receptor proteins in afferent and efferent neurons of the vagus nerve. *Eur J Neurosci*.14(1):64-72.

Cailleau J, Vermeire S & Verhoeven G (1990) Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol*. 69(1):79-89.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R & Burn P (1995) Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 28;269(5223):546-9

Contreras LN, Masini AM, Danna MM, Kral M, Bruno OD, Rossi MA & Andrada JA (1996) Glucocorticoids: their role on gonadal function and LH secretion. *Minerva Endocrinol*. 21(2):43-6.

Capponi AM, Lew PD, Jornot L & Vallotton MB (1984) Correlation between cytosolic free Ca²⁺ and aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. Evidence for a difference in the mode of action of angiotensin II and potassium. *J Biol Chem*. 259(14):8863-9.

Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ & Parker KL (1997) Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(21):11540-5.

Carpino A, Rago V, Pezzi V, Carani C & Andò S (2007) Detection of aromatase and estrogen receptors (ERalpha, ERbeta1, ERbeta2) in human Leydig cell tumor. *Eur J Endocrinol.*,157(2):239-44.

Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C & Levallet J (2004) Reproductive system: aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol*. 193:137–143.

Carreau S, Genissel C, Bilinska B & Levallet J (1999) The oestrogen sources in the testis and the reproductive tract of the male. *Inter J Androl.*, 22:211–213.

Castro MG & Morrison E (1997) Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain. *Crit Rev Neurobiol*.11(1):35-57.

Catania F, Colombo C, Marzegalli M, Borghi G & Pincirolis F (2004) Service level web monitoring in the field management of emergencies. *Stud Health Technol Inform*.106:123-35.

Catizone A, Ricci G & Galdieri M (2001) Expression and a functional role of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) during postnatal rat testis development. *Endocrinology* 142 1828–1834

Chagnon YC, Chen WJ, Pérusse L, Chagnon M, Nadeau A, Wilkison WO & Bouchard C (1997) Linkage and association studies between the melanocortin receptors 4 and 5 genes and obesity-related phenotypes in the Québec Family Study. *Mol Med*. 3(10):663-73.

Chai B, Li JY, Zhang W, Ammori JB & Mulholland MW (2007) Melanocortin-3 receptor activates MAP kinase via PI3 kinase. *Regul Pept*. 139(1-3):115-21.

Chalmers DT, Lovenberg TW, Grigoriadis DE, Behan DP & De Souza EB (1996) Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci*. 17(4):166-72. Review

Chan YF, O WS & Tang F (2007) Adrenomedullin in the Rat Testis. I: Its Production, Actions on Testosterone Secretion, Regulation by Human Chorionic Gonadotropin, and Its Interaction with Endothelin 1 in the Leydig Cell. *Biol Reprod.* [Epub ahead of print]

Chanderbhan RF, Kharroubi AT, Noland BJ, Scallen TJ & Vahouny GV (1986) Sterol carrier protein2: further evidence for its role in adrenal steroidogenesis. *Endocr Res.* 12(4):351-70.

Chandran UR, Attardi B, Friedman R, Dong KW, Roberts JL & DeFranco DB (1994) Glucocorticoid receptor-mediated repression of gonadotropin-releasing hormone promoter activity in GT1 hypothalamic cell lines. *Endocrinology.* 134(3):1467-74.

Charbonneau C, Bai F, Richards BS & Argyropoulos G (2004) Central and peripheral interactions between the agouti-related protein and leptin. *Biochem Biophys Res Commun.* 319(2):518-24.

Charpenet G, Taché Y, Bernier M, Ducharme JR & Collu R (1982) Stress-induced testicular hyposensitivity to gonadotropin in rats. Role of the pituitary gland. *Biol Reprod.* 27(3):616-23.

Chehab FF, Lim ME & Lu RH (1996) Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 12, 318-20

Chen M, Aprahamian CJ, Celik A, Georgeson KE, Garvey WT, Harmon CM & Yang Y (2006) Molecular characterization of human melanocortin-3 receptor ligand-receptor interaction. *Biochemistry.* 45(4):1128-37.

Chen CL, Chang CC, Krieger DT & Bardin CW (1986) Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in the ovary and placenta: comparison with the testis. *Endocrinology.* 118(6):2382-9.

Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Gopal-Truter S, MacIntyre DE, Chen HY & Van der Ploeg LH (2000) Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet.* 26(1):97-102.

Chelikani PK, Glimm DR, Keisler DH & Kennelly JJ (2004) Effects of feeding or abomasal infusion of canola oil in Holstein cows. 2. Gene expression and plasma concentrations of cholecystokinin and leptin. *J Dairy Res.*;71(3):288-96.

Cherradi N, Capponi AM, Gaillard RC & Pralong FP (2001) Decreased expression of steroidogenic acute regulatory protein: a novel mechanism participating in the leptin-induced inhibition of glucocorticoid biosynthesis. *Endocrinology.*;142(8):3302-8.

Chhajlani V (1996) Distribution of cDNA for melanocortin receptor subtypes in human tissues. *Biochem Mol Biol Int.* 38(1):73-80.

Chrousos GP, Torpy DJ & Gold PW (1998) Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med.* 129(3):229-40. Review.

Clark RV, Albertson BD, Munabi A, Cassorla F, Aguilera G, Warren DW, Sherins RJ & Loriaux DL (1990) Steroidogenic enzyme activities, morphology, and receptor studies of a testicular adrenal rest in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 70:1408-1413

Clark AJ, McLoughlin L & Grossman A (1993) Familial glucocorticoid deficiency associated with point mutation in the adrenocorticotropin receptor. *Lancet.* 341(8843):461-2.

Clark AJ, Metherell L, Swords FM & Elias LL (2001) The molecular pathogenesis of ACTH insensitivity syndromes. *Ann Endocrinol (Paris).* 62(2):207-11. Review.

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). *J Biol Chem.* 269(45):28314-22.

Coleman DL & Burkart DL (1977) Plasma corticosterone concentrations in diabetic (db) mice *Diabetologica.*;13(1):25-6

- Cone RD (2006)** Studies on the physiological functions of the melanocortin system. *Endocr Rev.* 27(7):736-49.
- Cone RD (2000)** Haploinsufficiency of the melanocortin-4 receptor: part of a thrifty genotype? *J Clin Invest.* 106(2):185-7.
- Conn PM, Crowley WF Jr (1991)** Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med.* 324(2):93-103.
- Conti B, Sugama S, Kim Y, Tinti C, Kim H, Baker H, Volpe B, Attardi B & Joh T (2000)** Modulation of IL-18 production in the adrenal cortex following acute ACTH or chronic corticosterone treatment. *Neuroimmunomodulation.* 8(1):1-7.
- Corp ES, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM, Figlewicz DP & Baskin DG (1986)** Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. *Neurosci Lett.* 25;70(1):17-22.
- Cooke BA (1999)** Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 151(1-2):25-35.
- Costa E & Guidotti A (1991)** Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions. *Life Sci.* 49(5):325-44. Review.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD & Low MJ (2001)** Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature.* 411(6836):480-4.
- Creemers JW, Pritchard LE, Gyte A, Le Rouzic P, Meulemans S, Wardlaw SL, Zhu X, Steiner DF, Davies N, Armstrong D, Lawrence CB, Luckman SM, Schmitz CA, Davies RA, Brennand JC & White A (2006)** Agouti-related protein is posttranslationally cleaved by proprotein convertase 1 to generate agouti-related protein (AGRP)83-132: interaction between AGRP83-132 and melanocortin receptors cannot be influenced by syndecan-3. *Endocrinology.* 47(4):1621-31
- Crespi EJ, Vaudry H & Denver RJ (2004)** Roles of corticotropin-releasing factor, neuropeptide Y and corticosterone in the regulation of food intake in *Xenopus laevis*. *J Neuroendocrinol.* 16(3):279-88.
- Cunningham MJ, Clifton DK & Steiner RA (1999)** Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod.* 60(2):216-22.
- Dallman MF, Strack AM, Akana SF, Bradbury MJ, Hanson ES, Scribner KA & Smith M (1993)** Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol.* 14(4):303-47
- Dandona P, Mohiuddin J & Prentice HG (1985)** Non-suppression of cortisol secretion by long term treatment with ketoconazole in patients with acute leukaemia. *J Clin Pathol.* 38(6):677-8.
- Darbeida H & Durand P (1988)** Glucocorticoid enhancement of glucocorticoid production by cultured ovine adrenocortical cells. *Biochim Biophys Acta.* 972(2):200-8.
- Darbeida H & Durand P (1990)** Mechanism of glucocorticoid enhancement of the responsiveness of ovine adrenocortical cells to adrenocorticotropin. *Biochem Biophys Res Commun.* 166(3):1183-91.
- Deaver DR, Glass JD, Grieger DM & Reeves JJ (1988)** Effects of estradiol on secretion of LH, hypothalamic function and testicular development in bull calves. *Domest Anim Endocrinol.* 5(4):307-16.
- Del Bravo J, Catizone A, Ricci G & Galdieri M (2007)** Hepatocyte growth factor modulates rat Leydig cell functions. *Journal of Andrology* 28(6):866-74.
- De Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS 2nd, Frankel WN, van den Pol AN, Bloom FE, Gautvik KM & Sutcliffe JG (1998)** The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(1):322-7.

- De Vos P, Saladin R, Auwerx J & Staels B (1995)** Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem*, 270(27):15958-61.
- Devenport L, Knehans A, Sundstrom A & Thomas T (1989)** Corticosterone's dual metabolic actions. *Life Sci* 45(15):1389-96
- Dhillon WS, Small CJ, Gardiner JV, Bewick GA, Whitworth EJ, Jethwa PH, Seal LJ, Ghatei MA, Hinson JP & Bloom SR (2003)** Agouti-related protein has an inhibitory paracrine role in the rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun*.301(1):102-7.
- Diaz ES, Pellizzari E, Meroni S, Cigorraga S, Lustig L & Denduchis B (2002)** Effect of extracellular matrix proteins on in vitro testosterone production by rat Leydig cells. *Mol Reprod Dev.*,61(4):493-503
- Doerr P & Pirke KM (1976)** Cortisol-induced suppression of plasma testosterone in normal adult males.*J Clin Endocrinol Metab.*, 43(3):622-9
- Doghman M, Delagrangre P, Berthelon MC, Durand P, Naville D & Bégeot M (2005)** Sustained inhibitory effect of Agouti Related Protein on the ACTH-induced cortisol production by bovine cultured adrenal cells.*Regul Pept.*;124(1-3):215-9.
- Doghman M, Delagrangre P, Blondet A, Berthelon MC, Durand P, Naville D & Bégeot M(2004)** Agouti-related protein antagonizes glucocorticoid production induced through melanocortin 4 receptor activation in bovine adrenal cells: a possible autocrine control.*Endocrinology.*;145(2):541-7.
- Doghman M, Soltani Y, Rebuffet V, Naville D & Bégeot M (2007)** Role of Agouti-related protein in adrenal steroidogenesis.*Mol Cell Endocrinol*. 265-266:108-12.
- Domenice S, Latronico AC, Brito VN, Arnhold IJ, Kok F & Mendonca BB (2001)** Adrenocorticotropin-dependent precocious puberty of testicular origin in a boy with X-linked adrenal hypoplasia congenita due to a novel mutation in the DAX1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4068–4071
- Draper N & Stewart PM (2005)** 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol*.186(2):251-71. Review.
- Drouin J & Goodman HM (1980)** Most of the coding region of rat ACTH beta--LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature*. 288(5791):610-3.
- Dufau ML, Tinajero JC & Fabbri A (1993)** Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J*. 7(2):299-307. Review.
- Dufau ML, Tsai-Morris C, Tang P & Khanum A (2001)** Regulation of steroidogenic enzymes and a novel testicular RNA helicase. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 76(1-5):187-97.
- Dupouy G.P, Boissin J, Deschaux P & Legrand C et Picon L.O (1992)** Hormone et glandes fonctions.Tome I. 352 pages. Edit Ellipses.
- Dupouy G.P, Friminet A, Garel J.M, Husson A, Lahou B, Legrand C, Magre S, Maltier J.P, Picon L.O, Roze C & Verdett J (1993)** Hormone et grandes fontions. Tome II. 512 pages. Edit Ellipses.
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA & Vinson GP (1998)** Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis.*Endocr Rev*. 1998 Apr;19(2):101-43. Review . No abstract available. Erratum in: *Endocr Rev* 19(3):301.
- El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C & Flier JS (2000)** Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest*.105(12):1827-32.
- Ellacott KL & Cone RD (2004)** The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis.*Recent Prog Horm Res.*;59:395-408. Review.

Engel W & Frowein J (1974) Glucocorticoids and hCG sensitivity of rat testicular Leydig cells. *Nature*, 251:146-148

Engler D, Pham T, Fullerton MJ, Ooi G, Funder JW & Clarke IJ(1989) Studies of the secretion of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin into the hypophysial-portal circulation of the conscious sheep. I. Effect of an audiovisual stimulus and insulin-induced hypoglycemia. *Neuroendocrinology*. 49(4):367-81.

Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL & Cowley MA(2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab*.5(3):181-94

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ & Cone RD (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*.;385(6612):165-8.

Fan ZC, Sartin JL & Tao YX (2008) Molecular cloning and pharmacological characterization of porcine melanocortin-3 receptor. *J Endocrinol*. 196(1):139-48

Farese RV, Sabir MA, Larson RE & Trudeau W 3rd(1983) Further observations on the increases in inositide phospholipids after stimulation by ACTH, cAMP and insulin, and on discrepancies in phosphatidylinositol mass and ³²PO₄-labeling during inhibition of hormonal effects by cycloheximide. *Cell Calcium*. 4(3):195-218.

Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA & O'Rahilly S (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 341(12):879-84.

Faulborn KW, Fenske M, Pitzel L & König A (1979) Effects of an intravenous injection of tetracosactid on plasma corticosteroid and testosterone levels in unstressed male rabbits. *Acta Endocrinol.*, 91(3):511-8

Fausser BC, Baird A & Hsueh AJ (1988) Fibroblast growth factor inhibits luteinizing hormone-stimulated androgen production by cultured rat testicular cells. *Endocrinology*. 123(6):2935-41.

Feek CM, Tuzi NL & Edwards CR (1989) Adrenalectomy does not influence basal secretion of testosterone in rat in vivo. *J Steroid Biochem.*, 32(5):725-8.

Feige JJ, Lafeuillade B, Cochet C & Chambaz EM (1991) [Autocrine regulation of adrenal steroidogenesis by growth factor transforming TGF-beta 1] *Ann Endocrinol (Paris)*. 52(6):451-5. Review.

Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC & Lechan RM (2002) Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology*. 143(10):3846-53.

Fenske M (1997) Role of cortisol in the ACTH-induced suppression of testicular steroidogenesis in guinea pigs. *J Endocrinol*. 154(3):407-14.

Fenster L, Katz DF, Wyrobek AJ, Pieper C, Rempel DM & Oman D (1997) Effects of psychological stress on human semen quality. *J Androl*. 18(2):194-202.

Finkelstein M, Weidenfeld J, Ne'eman Y, Samuni A, Mizrachi Y & Ben-Uzilio R (1981) Comparative studies of the aromatization of testosterone and epitestosterone by human placental aromatase. *Endocrinology*. 108(3):943-7.

Fleck BA, Ling N & Chen C (2007) Substituted NDP-MSH peptides paired with mutant melanocortin-4 receptors demonstrate the role of transmembrane 6 in receptor activation. *Biochemistry*. 46(37):10473-83.

Fong TM, Mao C, MacNeil T, Kalyani R, Smith T, Weinberg D, Tota MR & Van der Ploeg LH (1997) ART (protein product of agouti-related transcript) as an antagonist of MC-3 and MC-4 receptors. *Biochem Biophys Res Commun.*;237(3):629-31.

Freedman MR, Horwitz BA & Stern JS (1986) Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *Am J Physiol.* 250(4 Pt 2):R595-607.

Frühbeck G (2006) Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J.* 393: 7-20

Fujii H, Iida S, Tsugawa M, Gomi M, Moriwaki K & Tarui S (1990) Inhibitory effect of somatomedin C/insulin-like growth factor I on adrenocorticotropin- or forskolin-induced steroidogenesis in isolated rat adrenocortical cells. *Endocrinology.* 126(1):26-30.

Fuquay JW & Moberg GP (1983)-Influence of the pituitary-adrenal axis on the induced release of luteinizing hormone in rams. *Endocrinology.* 99(1):151-5

Gaigé S, Abysique A & Bouvier M (2002) Effects of leptin on cat intestinal vagal mechanoreceptors. *J Physiol.* 543(Pt 2):679-89.

Gallo-Payet N, Grazzini E, Côté M, Chouinard L, Chorvátová A, Bilodeau L, Payet MD & Guillon G (1996) Role of Ca²⁺ in the action of adrenocorticotropin in cultured human adrenal glomerulosa cells. *J Clin Invest.* 98(2):460-6.

Gantz I & Fong TM (2003) The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 284(3):E468-74.

Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ, DelValle J & Yamada T (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem.* 268(20):15174-9.

Gantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ & Yamada T (1994) Molecular cloning, expression, and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 16;200(3):1214-20.

Garthwaite TL, Martinson DR, Tseng LF, Hagen TC & Menahan LA (1980) A longitudinal hormonal profile of the genetically obese mouse. *Endocrinology.* 107(3):671-6.

Gao HB, Ge RS, Lakshmi V, Marandici A & Hardy MP (1997) Hormonal regulation of oxidative and reductive activities 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 138:156–161

Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge R & Hardy MP (2002) Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. *Endocrinology.* 143(1):130-8.

Ge RS, Hardy DO, Catterall JF & Hardy MP (1997) Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 138(12):5089-95.

Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Latif SA, Morris DJ & Hardy MP (2005) Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Mol Cell Endocrinol.* 243(1-2):35-42.

Gerendai I, Nemeskéri A, Faivre-Bauman A, Grouselle D & Tixier-Vidal A (1985) Effect of unilateral or bilateral thyroidectomy on TRH content of hypothalamus halves. *J Endocrinol Invest.* 8(4):321-3.

Getting SJ, Christian HC, Flower RJ & Perretti M. (2002) Activation of melanocortin type 3 receptor as a molecular mechanism for adrenocorticotropic hormone efficacy in gouty arthritis. *Arthritis Rheum.* 46(10):2765-75.

Getting SJ, Gibbs L, Clark AJ, Flower RJ & Perretti M (1999) POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. *J Immunol.* 162(12):7446-53.

Glasow A & Bornstein SR (2000) Leptin and the adrenal gland. *Eur J Clin Invest.*, 30 Suppl 3:39-45. Review

Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP & Bornstein SR (1998) Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(12):4459-66.

Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morita H, Foecking MF & Gomez-Sanchez EP (1997) Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 138(8) 3369-73.

González-Hernández JA, Ehrhart-Bornstein M, Späth-Schwalbe E, Scherbaum WA & Bornstein SR (1996) Human adrenal cells express tumor necrosis factor- α messenger ribonucleic acid: evidence for paracrine control of adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 81(2):807-13.

Gore AC (2002) Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 192(1-2):157-70.

Gore AC, Attardi B & DeFranco DB (2006) Glucocorticoid repression of the reproductive axis: Effects on GnRH and gonadotropin subunit mRNA levels *Mol Cell Endocrinol.* 256(1-2):40-8.

Goulis DG & Tarlatzis BC (2008) Metabolic syndrome and reproduction: I. Testicular function. *Gynecol. Endocrinol.* 24(1):33-9.

Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I & Stark KL (1997) Overexpression of Agtr leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet.* 17(3):273-4.

Gray TS, Carney ME & Magnuson DJ (1989) Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. *Neuroendocrinology.* 50(4):433-46.

Grieco P, Balse PM, Weinberg D, MacNeil T & Hruby VJ (2000) D-Amino acid scan of gamma-melanocyte-stimulating hormone: importance of Trp(8) on human MC3 receptor selectivity. *J Med Chem.* 43(26):4998-5002.

Grieco P, Lavecchia A, Cai M, Trivedi D, Weinberg D, MacNeil T, Van der Ploeg LH & Hruby VJ (2002) Structure-activity studies of the melanocortin peptides: discovery of potent and selective affinity antagonists for the hMC3 and hMC4 receptors. *J Med Chem.* 45(24):5287-94.

Grumbach M.M & Styne D.M (1992) Puberty : Ontogeny, neuroendocrinology, physiology and disorders; in Wilson J.D, Foster D.W, Williams Textbook of endocrinology. WB Sanders company edit, 8^{ème} édition: 1139-1221.

Guan XM, Hess JF, Yu H, Hey PJ & van der Ploeg LH (1997) Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol.* 133(1):1-7.

Guarini S, Schiöth HB, Mioni C, Cainazzo M, Ferrazza G, Giuliani D, Wikberg JE, Bertolini A & Bazzani C (2002) MC(3) receptors are involved in the protective effect of melanocortins in myocardial ischemia/reperfusion-induced arrhythmias. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 366(2):177-82.

Gwynne JT, Mahaffee D, Brewer HB Jr & Ney RL (1976) Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: regulation by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73(12):4329-33.

Habib KE, Gold PW & Chrousos GP (2001) Neuroendocrinology of stress. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 30(3):695-728; Review.

Hagan MM, Rushing PA, Pritchard LM, Schwartz MW, Strack AM, Van Der Ploeg LH, Woods SC & Seeley RJ (2000) Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279(1):R47-52.

Hair WM, Gubbay O, Jabbour HN & Lincoln GA (2002) Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. *Mol Hum Reprod.* 8(7):606-11

Håkansson ML, Brown H, Ghilardi N, Skoda RC & Meister B (1998) Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J Neurosci.* 18(1):559-72.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK & Friedman JM (1995) Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 269(5223):543-6.

Hales DB (1992) Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology*. 131(5):2165-72.

Hales DB & Greene R (1998) Arginine vasopressin inhibition of cytochrome P450c17 and testosterone production in mouse Leydig cells. *Endocrine*. 8(1):19-28.

Hales DB & Payne AH (1989) Glucocorticoid-mediated repression of P450SCC mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells. *Endocrinology* 124 () 2099–2104.

Halverson MJ, Donelan KJ, Granholm NH, Cheesbrough TM, Westby CA & Marshall DM (2002) Rapid communication: sequencing of the porcine agouti-related protein (AGRP) gene. *J Anim Sci*. 80(5):1388-9.

Hammond GL, Smith CL, Paterson NA & Sibbald WJ (1990) A role for corticosteroid-binding globulin in delivery of cortisol to activated neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab*. 71(1):34-9.

Hanukoglu I, Feuchtwanger R & Hanukoglu A (1990) Mechanism of corticotropin and cAMP induction of mitochondrial cytochrome P450 system enzymes in adrenal cortex cells. *J Biol Chem*. 265(33):20602-8.

Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X & Sottas C (2005) Stress hormone and male reproductive function *Cell Tissue Res*. 322(1):147-53.. Review

Harmer SC & Bicknell AB (2005) Role of gamma-MSH peptides in the regulation of adrenal steroidogenesis. *Peptides*. 26(10):1944-51. Review.

Harris HJ, Kotelevtsev Y, Mullins JJ, Seckl JR & Holmes MC (2001) Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11 β -HSD-1-deficient mice. *Endocrinology* 142:114–120

Haskell-Luevano C & Monck EK (2001) Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept*. 99(1):1-7.

Hayashi KT & Moberg GP (1990) Influence of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis on the menstrual cycle and the pituitary responsiveness to estradiol in the female rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Biol Reprod*. 42(2): 260-5

Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW & Flier JS (1997) Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology*, 138 (9):3859-63.

Heinrichs SC, Menzaghi F & Koob GF (1998) Neuropeptide Y-induced feeding and its control. *Vitam Horm*; 54:51-66.

Hirakawa T, Galet C & Ascoli M (2002) MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology*. 143(3):1026-35.

Hiwatashi A & Ichikawa Y (1979) Physicochemical properties of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P-450 reductase from bovine adrenocortical microsomes. *Biochim Biophys Acta*. 580(1):44-63.

Ho WK, Ng TB, Yeung HW & Wen HL (1985) Ginseng saponin treatment does not alter brain or pituitary levels of beta-endorphin and dynorphin. *Biochem Pharmacol*. 34(11):2044-6

Hogan K, Peluso S, Gould S, Parsons I, Ryan D, Wu L & Visiers I (2006) Mapping the binding site of melanocortin 4 receptor agonists: a hydrophobic pocket formed by I3.28(125), I3.32(129), and I7.42(291) is critical for receptor activation. *J Med Chem*. 49(3):911-22.

Hoggard N, Mercer JG, Rayner DV, Moar K, Trayhurn P & Williams LM (1997) Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization. *Biochem Biophys Res Commun.* 232(2):383-7.

Hoggard N, Rayner DV, Johnston SL & Speakman JR (2004) Peripherally administered [Nle⁴,D-Phe⁷]-alpha-melanocyte stimulating hormone increases resting metabolic rate, while peripheral agouti-related protein has no effect, in wild type C57BL/6 and ob/ob mice. *J Mol Endocrinol.* 33(3):693-703.

Holmes MC, Kotelevtsev Y, Mullins JJ & Seckl JR (2001) Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2 genes. *Mol Cell Endocrinol.* 171 15–20.

Howard J.K, Cave, B.J, Oksanen L.J, Tzamelis I., Bjorbaek C & Flier J.S (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med* 10(7): 734-38.

Hruby VJ, Lu D, Sharma SD, Castrucci AL, Kesterson RA, al-Obeidi FA & Hadley ME & Cone RD (1995) Cyclic lactam alpha-melanotropin analogues of Ac-Nle⁴-cyclo[Asp⁵, D-Phe⁷,Lys¹⁰] alpha-melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH₂ with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors. *J Med Chem.* 38(18):3454-61.

Hsu HT, Chang YC, Chiu YN, Liu CL, Chang KJ & Guo IC (2006) Leptin interferes with adrenocorticotropin /3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling, possibly through a Janus kinase 2-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-phosphodiesterase 3-cAMP pathway, to down-regulate cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme in human adrenocortical NCI-H295 cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 91 (7): 2761-9.

Hu GX, Lin H, Sottas CM, Morris DJ, Hardy MP & Ge RS (2008) Inhibition of 11beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Enzymatic Activities by Glycyrrhetic Acid In Vivo Supports Direct Glucocorticoid-Mediated Suppression of Steroidogenesis in Leydig Cells. *J Androl.* Jan 9; [Epub ahead of print]

Hube F, Lietz U, Igel M, Jensen PB, Tornqvist H, Joost HG & Hauner H (1996) Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Horm Metab Res.* 28 (12):690-3.

Huebner A, Elias LL & Clark AJ (1999) ACTH resistance syndromes. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 12 Suppl 1:277-93.Review.

Hughes KA, Webster SP, Walker BR (2008) 11-Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11beta-HSD1) inhibitors in type 2 diabetes mellitus and obesity. *Expert Opin Investig Drugs.* 17(4):481-96

Hundertmark S, Buhler H, Ragosch V, Dinkelborg L, Arabin B & Weitzel HK (1995) Correlation of surfactant phosphatidylcholine synthesis and 11β-hydroxysteroid dehydrogenase in the fetal lung. *Endocrinology* 136:2573–2578

Huo L, Gamber KM, Grill HJ & Bjørbaek C (2008) Divergent Leptin Signaling in Proglucagon NTS Neurons in Mice and Rats. *Endocrinology.* 149(2):492-497.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P & Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell.* 88(1):131-41.

Iakovlev TV, Karkaeva NR, Shevchenko AIu, Makarova EN & Bazhan NM (2004) Overproduction of agouti-protein did not affect cAMP level but increased steroidogenesis in adrenal glands under forskolin stimulation *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova.* 90(9):1170-7.

Idelman S (1994) *Endocrinologie:fondements physiologiques.* Edit.Office des publications universitaires, 138pp

Imaki T, Naruse M & Takano K (2004) Adrenocortical hyperplasia associated with ACTH-dependent Cushing's syndrome: comparison of the size of adrenal glands with clinical and endocrinological data. *Endocr J.* 51(1):89-95.

Jabbour HN & Lincoln GA (1999) Prolactin receptor expression in the testis of the ram: localisation, functional activation and the influence of gonadotrophins. *Mol Cell Endocrinol.* 148(1-2):151-61.

Jackson PJ, Douglas NR, Chai B, Binkley J, Sidow A, Barsh GS & Millhauser GL (2006) Structural and molecular evolutionary analysis of Agouti and Agouti-related proteins. *Chem Biol.*;13(12):1297-305.

Jackson GL, Kuehl D & Rhim TJ (1991) Testosterone inhibits gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in the male sheep. *Biol Reprod.* 45(1):188-94.

Jégou B (1993) The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol.*147:25-96. Review

Jéquier E (2002) Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.*;967:379-88.

Jessop DS, Dallman MF, Fleming D & Lightman SL (2001) Resistance to glucocorticoid feedback in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(9):4109-14.

Johnson BH, Welsh TH Jr & Juniewicz PE (1982) Suppression of luteinizing hormone and testosterone secretion in bulls following adrenocorticotropin hormone treatment. *Biol Reprod.*;26(2):305-10

Johnson RE & Scheithauer B (1982) Massive hyperplasia of testicular adrenal rests in a patient with Nelson's syndrome. *Am J Clin Pathol.*, 77:501-507

Johnston H, King PJ & O'Shaughnessy PJ (2007) Effects of ACTH and expression of the melanocortin-2 receptor in the neonatal mouse testis. *Reproduction.* 133(6):1181-7.

Johnson RE & Scheithauer B (1982) Massive hyperplasia of testicular adrenal rests in a patient with Nelson's syndrome. *Am J Clin Pathol.*, 77:501-507

Johnson WJ, Mahlberg FH, Rothblat GH & Phillips MC (1991) Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta.* 1085(3):273-98. Review.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H & Herrlich P (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62:11189-11204

Joseph CG, Bauzo RM, Xiang Z, Shaw AM, Millard WJ & Haskell-Luevano C (2003) Elongation studies of the human agouti-related protein (AGRP) core decapeptide (Yc[CRFFNAFC]Y) results in antagonism at the mouse melanocortin-3 receptor. *Peptides.*;24(2):263-70.

Joseph SA, Pilcher WH & Bennett-Clarke C (1983) Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. *Neurosci Lett.* 38(3):221-5.

Jöhren O, Neidert SJ, Kummer M, Dendorfer A & Dominiak P (2001) Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats.

Juniewicz PE & Johnson BH (1981) Influence of adrenal steroids upon testosterone secretion by the boar testis. *Biol Reprod.* 25(4):725-33.

Juniewicz PE, Johnson BH & Bolt DJ (1987) Effect of adrenal steroids on testosterone and luteinizing hormone secretion in the ram. *J Androl.* 8(3):190-6.

Juniewicz PE, Keeney DS & Ewing LL (1988) Effect of adrenocorticotropin and other proopiomelanocortin-derived peptides on testosterone secretion by the in vitro perfused testis. *Endocrinology*, 1988 Mar;122(3):891-8.

Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A & Chin WW (1997) Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology.* 138(3):1224-31.

Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A & Chin WW (1993) Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 133(2):931-4.

Kalra S (1993) Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocrine Reviews* 14;507-38.

Kamel F & Kubajak CL (1987) Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonadal steroids and mechanism of action. *Endocrinology*. 121(2):561-8.

Kapas S, Cameron LA, Puddefoot JR & Hinson JP (1996) Studies on endothelin receptors in the zona fasciculata/reticularis of the rat adrenal cortex: contrast with the zona glomerulosa. *FEBS Lett.* 18;397(2-3):186-90.

Kalra SP, Sahu A & Kalra PS (1993) Ageing of the neuropeptidergic signals in rats. *J Reprod Fertil Suppl.* 46:11-9. Review.

Kastin AJ & Pan W (2000) Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul Pept.* 92(1-3):37-43. Review.

Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Tanaka T, Furuta M, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. (2001) Plasma levels of agouti-related protein are increased in obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(5):1921-4.

Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Furuta M, Araki-Sasaki R, Tsuchihashi K, Hori Y, Yano Y, Adachi Y. (2000) Elevated plasma levels of alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH) are correlated with insulin resistance in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 24(10):1260-4.

Keeney DS, Sprando RL, Robaire B, Zirkin BR & Ewing LL (1990) Reversal of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *J Endocrinol.* 127(1):47-58.

Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI & Camper SA (1995) Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone α -subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. *Gene Dev* 9:2007-2019

Keramidas M, Bourgarit JJ, Tabone E, Corticelli P, Chambaz EM & Feige JJ (1991) Immunolocalization of transforming growth factor-beta 1 in the bovine adrenal cortex using antipeptide antibodies. *Endocrinology.* 129(1):517-26.

Kerr JB & Knell CM (1986) The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103:535-544

Khammar F & Brudieux R (1991) Seasonal changes in plasma concentrations of gonadotropins and in the responsiveness of the pituitary and testis to GnRH in a desert rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). *Reprod Nutr Dev.* 31(6):675-82.

Khammar F & Brudieux R (1989) Seasonal changes in plasma testosterone concentrations in response to administration of hCG in a desert rodent, the sand rat (*Psammomys obesus*). *J Reprod Fertil.* 85(1):171-5.

Khammar F & Brudieux R (1987) Seasonal changes in testicular contents and plasma concentrations of androgens in the desert gerbil (*Gerbillus gerbillus*). *J Reprod Fertil.* 80(2):589-94.

Kim MS, Rossi M, Abbott CR, AlAhmed SH, Smith DM & Bloom SR (2002) Sustained orexigenic effect of Agouti related protein may be not mediated by the melanocortin 4 receptor. *Peptides*;23(6):1069-76.

King SR, Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, Clark BJ, Orly J & Stocco DM (1995) Steroid production after in vitro transcription, translation, and mitochondrial processing of protein products of complementary deoxyribonucleic acid for steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology.* 136(11):5165-76.

King BM & Smith RL (1985) Hypothalamic obesity after hypophysectomy or adrenalectomy: dependence on corticosterone. *Am J Physiol*, 249(5 Pt 2):R522-R6.

Kirchgessner AL & Liu M (1999) Orexin synthesis and response in the gut. *Neuron.* 24(4):941-51.

- Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB & Elmquist JK (2003)** Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 457(3):213-35.
- Kistler-Heer V, Lauber ME & Lichtensteiger W (1998)** Different developmental patterns of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNA: predominance of Mc4 in fetal rat nervous system. *J Neuroendocrinol.* 10(2):133-46.
- Klemcke HG, Amador AG & Bartke A (1990)** Hormonal regulation of testicular prolactin receptors and testosterone synthesis in golden hamsters. *Biol Reprod.* 43(1):162-8.
- Klovins J, Haitina T, Fridmanis D, Kilianova Z, Kapa I, Fredriksson R, Gallo-Payet N & Schiöth HB (2004)** The melanocortin system in Fugu: determination of POMC/AGRP/MCR gene repertoire and synteny, as well as pharmacology and anatomical distribution of the MCRs. *Mol Biol Evol.*;21(3):563-79.
- Kononen J, Honkaniemi J, Gustafsson JA & Peltö-Huikko M (1993)** Glucocorticoid receptor colocalization with pituitary hormones in the rat pituitary gland. *Mol Cell Endocrinol.* 93(1):97-103.
- Korbonits M, Trainer PJ, Little JA, Edwards R, Kopelman PG, Besser GM, Svec F & Grossman AB (1997)** Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol.* 6(6):751-7.
- Kotsuji F, Winters SJ, Attardi B, Keeping HS, Oshima H & Troen P (1988a)** Effects of gonadal steroids on gonadotropin secretion in males: studies with perfused rat pituitary cells. *Endocrinology.* 123(6):2683-9.
- Kotsuji F, Winters SJ, Keeping HS, Attardi B, Oshima H & Troen P (1988b)** Effects of inhibin from primate Sertoli cells on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by perfused rat pituitary cells. *Endocrinology.* 122(6):2796-802.
- Kremer H, Kraaij R, Toledo SP, Post M, Fridman JB, Hayashida CY, van Reen M, Milgrom E, Ropers HH, Mariman E, Themmen APN & Brunner HG (1995)** Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. *Nat Genet* 9:160–164
- Kruse R, Geilenkeuser WJ & Röhle G (1998)** Overview: quality control of tumor marker assays. *Int J Biol Markers.* 13(4):238-40.
- Kugu K, Kohda K, Taketani Y & Mizuno M (1989)** Danazol stimulates the release of follicle-stimulating hormone and inhibits the release of prolactin in vitro studies on rat pituitary cell cultures. *Arch Gynecol Obstet.* 244(3):157-62.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N & Matzuk MM (1997)** Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 15(2):201-4.
- Labbé O, Desarnaud F, Eggerickx D, Vassart G & Parmentier M (1994)** Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry.* 19;33(15):4543-9.
- Lalau JD, Aubert ML, Carmignac DE, Gregoire I & Dupouy JP (1990)** Reduction in testicular function in rats. II. Reduction by dexamethasone in fetal and neonatal rats. *Neuroendocrinology* 51() 289–93.
- Lamberts SW (2002)** Glucocorticoid receptors and Cushing's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 197(1-2):69-72. Review.
- Lamberts SW, Koper JW & de Jong FH (1992)** Familial and iatrogenic cortisol receptor resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 43(5):385-8. Review.
- Lamberts SW, Verleun T, Oosterom R, de Jong F & Hackeng WH (1984)** Corticotropin-releasing factor (ovine) and vasopressin exert a synergistic effect on adrenocorticotropin release in man. *J Clin Endocrinol Metab.* 58(2):298-303.

- Landers JP & Spelsberg TC (1992)** New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2(1):19-63. Review.
- Lebrethon MC, Naville D, Begeot M & Saez JM (1994)** Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *J Clin Invest.* 93(4):1828-33.
- Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI & Friedman JM (1996)** Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 379(6566):632-5.
- Lee YC, Ko YH, Hsu YP & Ho LT (2006)** Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements. *Life Sci.* 78(11):1155-62. Epub
- Lehoux JG & Lefebvre A (2006)** Novel protein kinase C-epsilon inhibits human CYP11B2 gene expression through ERK1/2 signalling pathway and JunB. *J Mol Endocrinol.* 36(1):51-64.
- Lehoux JG, Mathieu A, Lavigne P & Fleury A (2003)** Adrenocorticotropin regulation of steroidogenic acute regulatory protein. *Microsc Res Tech.* 61(3):288-99. Review.
- Lejeune H, Chuzel F, Thomas T, Avallet O, Habert R, Durand P & Saez J (1996)** [Paracrine regulation of Leydig cells] *Ann Endocrinol (Paris).* 57(1):55-63. Review.
- Levine AS, Rogers B, Kneip J, Grace M & Morley JE (1983)** Effect of centrally administered corticotropin releasing factor (CRF) on multiple feeding paradigms. *Neuropharmacology.* 22(3):337-9.
- Li H, Brochu M, Wang SP, Rochdi L, Côté M, Mitchell G & Gallo-Payet N (2002)** Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes lipid storage in the adrenal cortex and impaired corticosterone response to corticotropin stimulation. *Endocrinology.* 143(9):3333-40.
- Li JY, Finniss S, Yang YK, Zeng Q, Qu SY, Barsh G, Dickinson C & Gantz I (2000)** Agouti-related protein-like immunoreactivity: characterization of release from hypothalamic tissue and presence in serum. *Endocrinology.* 141(6):1942-50.
- Li PS (1991)** Effect of cortisol on testosterone production by immature pig Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 38(2):205-12.
- Li SJ, Varga K, Archer P, Hruby VJ, Sharma SD, Kesterson RA, Cone RD & Kunos G (1996)** Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. *J Neurosci.* 16(16):5182-8.
- Liakos P, Chambaz EM, Feige JJ & Defaye G (1998)** Expression of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticularis zones of bovine adrenal cortex. *Endocr Res.* 24(3-4):427-32.
- Liakos P, Lenz D, Bernhardt R, Feige JJ & Defaye G (2003)** Transforming growth factor beta1 inhibits aldosterone and cortisol production in the human adrenocortical cell line NCI-H295R through inhibition of CYP11B1 and CYP11B2 expression. *J Endocrinol.* 176(1):69-82.
- Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, Krauss RM, Veldhuis JD, Wagner AJ, DePaoli AM, McCann SM & Wong ML (2004)** Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(13):4531-6
- Lin T, Calkins JK, Morris PL, Vale W & Bardin CW (1989)** Regulation of Leydig cell function in primary culture by inhibin and activin. *Endocrinology.* 125(4):2134-40.
- Lin D, Sugawara T, Strauss JF 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A & Miller WL (1995)** Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science.* 267(5205):1828-31.

Lin T, Wang D, Calkins JH, Guo H, Chi R & Hausley PR (1990) Regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid expression in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.*, 73:147–152.

Lin T, Wang D, Nagpal ML, Chang W & Calkins JH (1992) Down-regulation of Leydig cell insulin-like growth factor-I gene expression by interleukin-1. *Endocrinology.* 130(3):1217-24.

Lincoln GA, Lincoln CE & McNeilly AS (1990) Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. *J Reprod Fertil.* 88(2):623-33.

Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M & Guillemin R (1986) A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 138(3):1129-37.

Liptrap RM & Raeside JI (1975) Increase in plasma testosterone concentrations after injection of adrenocorticotrophin into the boar. *J Endocrinol.*,66(1):123-31.

Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ & Walker BR (2000) Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats *Endocrinology*,141(2):560-3.

Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, Friedman JM & Elmquist JK (2003) Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *Neurosci.* 23(18):7143-54.

Logan DW, Bryson-Richardson RJ, Taylor MS, Currie P & Jackson IJ (2003) Sequence characterization of teleost fish melanocortin receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 994:319-30.

López M, Seoane L, Señaris RM & Diéguez C (2001) Prepro-orexin mRNA levels in the rat hypothalamus, and orexin receptors mRNA levels in the rat hypothalamus and adrenal gland are not influenced by the thyroid status. *Neurosci Lett.* 300(3):171-5.

López M, Señaris R, Gallego R, García-Caballero T, Lago F, Seoane L, Casanueva F & Diéguez C (1999) Orexin receptors are expressed in the adrenal medulla of the rat. *Endocrinology.*140(12):5991-4.

Loose DS, Do YS, Chen TL, Feldman D. (1980) Demonstration of glucocorticoid receptors in the adrenal cortex: evidence for a direct dexamethasone suppressive effect on the rat adrenal gland. *Endocrinology.* 107(1):137-46.

Lotfi CF, Armelin HA (1998) c-Fos protein is a mediator in mitogenic response to ACTH. *Endocr Res.* 24(3-4):421-4.

Lu XY, Shieh KR, Kabbaj M, Barsh GS, Akil H & Watson SJ (2002) Diurnal rhythm of agouti-related protein and its relation to corticosterone and food intake. *Endocrinology.*143 (10):3905-15.

Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP & Wilkison WO (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *et al. Nature.* 371 (6500):799-802.

Lupo C (1993) Testosterons binding in the rabbit amygdale after cold stress and dexamethasone treatment *Med.Sci.*, 21: 913-14.

MacKenzie SM, Clark CJ, Fraser R, Gomez-Sanchez CE, Connell JM & Davies E (2000) Expression of 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *Journal of Molecular Endocrinology* 24(3): 321–328

MacLusky NJ, Naftolin F & Leranth C (1988) Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res.* 439(1-2):391-5.

MacNeil DJ, Howard AD, Guan X, Fong TM, Nargund RP, Bednarek MA, Goulet MT, Weinberg DH, Strack AM, Marsh DJ, Chen HY, Shen CP, Chen AS, Rosenblum CI, MacNeil T, Tota M & MacIntyre ED & Van der Ploeg LH (2002) The role of melanocortins in body weight regulation: opportunities for the treatment of obesity. *Eur J Pharmacol.* 450(1):93-109. Review.

Magenis RE, Smith L, Nadeau JH, Johnson KR, Mountjoy KG & Cone RD (1994) Mapping of the ACTH, MSH, and neural (MC3 and MC4) melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome.* 5(8):503-8.

Makela S, Strauss L, Kuiper G, Valve E, Salmi S, Santti R & Gustafsson J-A (2000) Erratum to "differential expression of estrogen receptors [alpha] and [beta] in adult rat accessory sex glands and lower urinary tract": [*Mol. Cell. Endocrinol.* 164 (2000) 109–116], *Mol. Cell. Endocrinol.* 170, 217–29

Makimura H, Mizuno TM, Beasley J, Silverstein JH & Mobbs CV (2003) Adrenalectomy stimulates hypothalamic proopiomelanocortin expression but does not correct diet-induced obesity. *BMC Physiol.* 3:4.

Makimura H, Mizuno TM, Roberts J, Silverstein J, Beasley J & Mobbs CV (2000) Adrenalectomy reverses obese phenotype and restores hypothalamic melanocortin tone in leptin-deficient ob/ob mice. *Diabetes.* 49(11):1917-23.

Malendowicz LK, Neri G, Markowska A, Hochol A, Nussdorfer GG & Majchrzak M (2003) Effects of leptin and leptin fragments on steroid secretion of freshly dispersed rat adrenocortical cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 87(4-5):265-8.

Malendowicz LK, Nussdorfer GG & Markowska A (1997) Effects of recombinant murine leptin on steroid secretion of dispersed rat adrenocortical cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1997 Sep-Oct; 63(1-3):123-5.

Malendowicz LK, Spinazzi R, Tortorella C, Nussdorfer GG, Ziolkowska A & Rucinski M (2004) Effects of leptin and leptin fragments on corticosterone secretion and growth of cultured rat adrenocortical cells. *Int J Mol Med.* 14(5):873-7.

Malinowska KW, Hardy RN & Nathanielsz PW (1972) Plasma adrenocorticosteroid concentrations immediately after birth in the rat, rabbit and guinea-pig. *Experientia.* 28(11):1366-7.

Manna PR, Jo Y & Stocco DM (2007) Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J Endocrinol.* 193(1):53-63.

Manna PR, Chandrala SP, Jo Y & Stocco DM (2006) cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J Mol Endocrinol.* 37(1):81-95

Maran RR (2003) Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. *Arch Androl.* 49(5):375-88 Review

Markowska A, Neri G, Hochol A, Nowak M, Nussdorfer GG & Malendowicz LK (2004) Effects of leptin and leptin fragments on steroid secretion and proliferative activity of regenerating rat adrenal cortex. *Int J Mol Med.* 13(1):139-41.

Marks DL, Hruby V, Brookhart G & Cone RD (2006) The regulation of food intake by selective stimulation of the type 3 melanocortin receptor (MC3R). *Peptides.* 27(2):259-64

Marks JL, Porte D Jr, Stahl WL & Baskin DG (1990) Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology.* 127(6):3234-6.

Martin WJ & MacIntyre DE (2004) Melanocortin receptors and erectile function. *Eur Urol.* 45(6):706-13.

Martinez V, Barquist E, Rivier J & Taché Y (1998) Central CRF inhibits gastric emptying of a nutrient solid meal in rats: the role of CRF2 receptors. *Am J Physiol.* 274(5 Pt 1):G965-70.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T & Nakao K (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 3(9):1029-33

- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR & Flier JS (2001)** A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science*. 294(5549):2166-70.
- Matchock RL, Dorn LD & Susman EJ (2007)** Diurnal and seasonal cortisol, testosterone, and DHEA rhythms in boys and girls during puberty. *Chronobiol Int*. 24(5):969-90.
- Matteri RL, Moberg GP & Watson JG (1986)** Adrenocorticotropin-induced changes in ovine pituitary gonadotropin secretion in vitro. *Endocrinology*, 118(5):2091-6
- Mauduit C, Chauvin MA, Hartmann DJ, Revol A, Morera AM & Benahmed M (1992)** Interleukin-1 alpha as a potent inhibitor of gonadotropin action in porcine Leydig cells: site(s) of action. *Biol Reprod*. 46(6):1119-26.
- Mauduit C, Chauvin MA, de Peretti E, Morera AM & Benahmed M (1991)** Effect of activin A on dehydroepiandrosterone and testosterone secretion by primary immature porcine Leydig cells. *Biol Reprod*. 45(1):101-9.
- Mazzocchi G, Malendowicz LK, Gottardo L, Aragona F & Nussdorfer GG (2001)** Orexin A stimulates cortisol secretion from human adrenocortical cells through activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade. *J Clin Endocrinol Metab*. 86(2):778-82.
- McEvoy AN, Bresnihan B, Fitzgerald O & Murphy EP (2002)** Corticotropin-releasing hormone signaling in synovial tissue vascular endothelium is mediated through the cAMP/CREB pathway. *Ann N Y Acad Sci*. 966:119-30.
- McKenna TJ, Lorber D, Lacroix A & Rabin D (1979)** Testicular activity in Cushing's disease. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 91(3):501-10.
- McLachlan RI, Dahl KD, Bremner WJ, Schwall R, Schmelzer CH, Mason AJ & Steiner RA (1989)** Recombinant human activin-A stimulates basal FSH and GnRH-stimulated FSH and LH release in the adult male macaque, *Macaca fascicularis*. *Endocrinology*. 125(5):2787-9.
- McLachlan RI, Robertson DM, De Kretser DM & Burger HG (1988)** Advances in the physiology of inhibin and inhibin-related peptides. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 29(1):77-112. Review.
- McLean C & Lowry PJ (1981)** Natural occurrence but lack of melanotrophic activity of gamma-MSH in fish. *Nature*. 290(5804):341-3.
- McNamara BC & Jefcoate CR (1990)** Heterogeneous pools of cholesterol side-chain cleavage activity in adrenal mitochondria from adrenocorticotrophic hormone-treated rats: reconstitution of the isocitrate response with succinate and low concentrations of isocitrate. *Arch Biochem Biophys*. 283(2):464-71.
- McNamara BC & Jefcoate CR (1989)** The role of sterol carrier protein 2 in stimulation of steroidogenesis in rat adrenal mitochondria by adrenal cytosol. *Arch Biochem Biophys*. 275(1):53-62.
- Means AR, Fakunding JL, Tindall DJ (1976)** Follicle stimulating hormone regulation of protein kinase activity and protein synthesis in testis. *Biol Reprod*. 14(1):54-63.
- Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL & Weiner RI (1990)** Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron*. 5(1):1-10.
- Mendis-Handagama SM, Siril Ariyaratne HB (2005)** Leydig cells, thyroid hormones and steroidogenesis. *Indian J Exp Biol*. 43(11):939-62.
- Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT & Trayhurn P (1996)** Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett*. 387(2-3):113-6.
- Metherell LA, Chapple JP, Cooray S, David A, Becker C, Rüschenclorf F, Naville D, Begeot M, Khoo B, Nürnberg P, Huebner A, Cheetham ME & Clark AJ (2005)** Mutations in MRAP, encoding a new interacting partner of the ACTH receptor, cause familial glucocorticoid deficiency type 2. *Nat Genet*. 37(2):166-70.

- Mialot JP, Toublanc JE, Castanier M, Nahoul K, Thibier M, Canlorbe P & Scholler R (1984)** Dynamics of plasma testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione and 17-hydroxyprogesterone after stimulation with hCG and tetracosactide in the male dog during puberty. *Pathol Biol (Paris)*.32(8):863-6.
- Miller WL (1987)** Structure of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Steroid Biochem*.27(4-6):759-66.
- Miller SC, Bowman BM & Rowland HG (1983)** Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am J Anat*. 168(1):1-13.
- Mirabella N, Esposito V, Squillacioti C, De Luca A & Paino G (2004)** Expression of agouti-related protein (AgRP) in the hypothalamus and adrenal gland of the duck (*Anas platyrhynchos*). *Anat Embryol (Berl)*. 209(2):137-41.
- Monder C, Miroff Y, Marandici A & Hardy MP (1994)** 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology*, 134:1199–1204
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD & O'Rahilly S (1998)** Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes*. 47(9):1384-91.
- Moore A, Krummen LA & Mather JP (1994)** Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol*. 100(1-2):81-6. Review.
- Moore CC, Mellon SH, Murai J, Siiteri PK & Miller WL (1993)** Structure and function of the hepatic form of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the squirrel monkey, an animal model of glucocorticoid resistance. *Endocrinology*, 133:368–375
- Moore CM, Cross MH, Desborough JP, Burrin JM, Macdonald IA & Hall GM (1995)** Hormonal effects of thoracic extradural analgesia for cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 75(4):387-93.
- Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, Durand P, Naville D, & Begeot M (2003)**. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 144(11): 4773-82.
- Morgan C & Cone RD (2006)** Melanocortin-5 receptor deficiency in mice blocks a novel pathway influencing pheromone-induced aggression. *Behav Genet*. 36(2):291-300.
- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI & Whitelaw E (1999)** Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet*. 23(3):314-8
- Mori H, Hanada R., Hanada T., Aki D., Mashima R., Nishinakamura, H. Torisu T., Chien K.R., Yasukawa H. & Yoshimura A (2004)** Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity, *Nat. Med*. 10(7): 739-43.
- Morrison CD, Morton GJ, Niswender KD, Gelling RW & Schwartz MW (2005)** Leptin inhibits hypothalamic Npy and AgRP gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289(6):E1051-7.
- Morton NM & Seckl JR (2008)** 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 and Obesity. *Front Horm Res*; 36: 146-64.
- Mountjoy KG (2000)** Cloning of the melanocortin receptors. In: Cone, R.D. (ed), *The melanocortin receptors*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 75-107.
- Mountjoy KG (1994)** The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become "super-sensitive" to melanocortin peptides. *Mol Cell Endocrinol*. 102(1-2):R7-11.
- Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE & Cone RD (1994)** ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 99(1):R17-20.

- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT & Cone RD (1992)** The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science*. 257(5074):1248-51.
- Mountjoy KG & Wild JM (1998)** Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. *Brain Res Dev Brain Res*. 107(2):309-14.
- Mowszowicz I (1989)** [Antiandrogens. Mechanisms and paradoxical effects] *Ann Endocrinol (Paris)*. 50(3):189-99. Review. French.
- Münzberg H & Myers MG Jr (2005)** Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci*. 8(5):566-70. Review.
- Naaman E, Chatelain P, Saez JM & Durand P (1989)** In vitro effect of insulin and insulin-like growth factor-I on cell multiplication and adrenocorticotropin responsiveness of fetal adrenal cells. *Biol Reprod*. 40(3):570-7.
- Nagpal ML, Wang D, Calkins JH, Chang WW & Lin T (1991)** Human chorionic gonadotropin up-regulates insulin-like growth factor-I receptor gene expression of Leydig cells. *Endocrinology*. 129(6):2820-6.
- Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T & Sasano H (2003)** Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Mol. Cell Endocrinol*. 205(1-2):43-50.
- Naville D, Jaillard C, Barjhoux L, Durand P & Bégeot M (1997)** Genomic structure and promoter characterization of the human ACTH receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 230(1):7-12.
- Naville D, Barjhoux L, Jaillard C, Lebrethon MC, Saez JM & Bégeot M (1994)** Characterization of the transcription start site of the ACTH receptor gene: presence of an intronic sequence in the 5'-flanking region. *Mol Cell Endocrinol* 268(6):1802-10
- Naville D, Bordet E, Berthelon MC, Durand P & Bégeot M (2001)** Activator protein-1 is necessary for angiotensin-II stimulation of human adrenocorticotropin receptor gene transcription. *Eur J Biochem.. Endocrinol*. 106(1-2):131-5.
- Naville D, Penhoat A, Durand P & Bégeot M (1999)** Three steroidogenic factor-1 binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 255(1):28-33.
- Naville D, Weber A, Genin E, Durand P, Clark AJ & Bégeot M (1998)** Exclusion of the adrenocorticotropin (ACTH) receptor (MC2R) locus in some families with ACTH resistance but no mutations of the MC2R coding sequence (familial glucocorticoid deficiency type 2). *J Clin Endocrinol Metab*. 83(10):3592-6.
- Nazir J, Royston C, Walton C & White MC (1996)** 11 β -hydroxylase deficiency: management of a difficult case by laparoscopic bilateral adrenalectomy *Clin Endocrinology*., 45:225-8
- Ni J, Moulin P, Gianello P, Feron O, Balligand JL & Devuyst O (2003)** Mice that lack endothelial nitric oxide synthase are protected against functional and structural modifications induced by acute peritonitis. *J Am Soc Nephrol*. 14(12):3205-16.
- Nijenhuis WA, Oosterom J & Adan RA (2001)** AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol*. 15(1):164-71.
- Nilsson M, Stulnig TM, Lin CY, Yeo AL, Nowotny P, Liu ET & Steffensen KR (2007)** Liver X receptors regulate adrenal steroidogenesis and hypothalamic-pituitary-adrenal feedback. *Mol Endocrinol*. 21(1):126-37.
- Nimura M, Udagawa J, Hatta T, Hashimoto R & Otani H (2006)** Spatial and temporal patterns of expression of melanocortin type 2 and 5 receptors in the fetal mouse tissues and organs *Anat Embryol (Berl)*. 211(2):109-17.
- Ninan I & Kulkarni SK (1998)** Dopamine receptor sensitive effect of dizocilpine on feeding behaviour. *Brain Res*. 812(1-2):157-63.

Niswender KD, Morton GJ, Stearns WH, Rhodes CJ, Myers MG Jr & Schwartz MW (2001) Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature*. 413(6858):794-5.

Norman D, Isidori AM, Frajese V, Caprio M, Chew SL, Grossman AB, Clark AJ, Michael Besser G & Fabbri A (2003) ACTH and alpha-MSH inhibit leptin expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes: model for a central-peripheral melanocortin-leptin pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 200(1-2):99-109.

Nowak KW, Mackowiak P, Switonska MM, Fabis M & Malendowicz LK (2000) Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sci*. 66(5):449-54.

Nyongesa AW, Patel NB, Onyango DW, Odongo HO & Wango EO (2008) Khat (*Catha edulis*) lowers plasma luteinizing hormone (LH) and testosterone secretion, but increases cortisol levels in male rabbits. *J Ethnopharmacol*. 116(2):245-50

Obici S, Feng Z, Karkanias G, Baskin DG & Rossetti L (2002) Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat Neurosci*.;5(6):566-72.

O'Connell Y, McKenna TJ & Cunningham SK (1994) The effect of prolactin, human chorionic gonadotropin, insulin and insulin-like growth factor 1 on adrenal steroidogenesis in isolated guinea-pig adrenal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 48(2-3):235-40.

Oelkers W (1996) Adrenal insufficiency. *N Engl J Med*., 17;335(16):1206-12. Review.

Okada S, York DA & Bray GA (1992) Mifepristone (RU 486), a blocker of type II glucocorticoid and progestin receptors, reverses a dietary form of obesity. *Am J Physiol*. 262(6 Pt 2):R1106-10.

Ollmann MM, Lamoreux ML, Wilson BD & Barsh GS (1998) Interaction of Agouti protein with the melanocortin 1 receptor in vitro and in vivo. *Genes Dev*. 12(3):316-30

Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I & Barsh GS (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science*. 278(5335):135-8.

Orr TE, Taylor MF, Bhattacharyya AK, Collins DC & Mann DR (1994) Acute immobilization stress disrupts testicular steroidogenesis in adult male rats by inhibiting the activities of 17 alpha-hydroxylase and 17,20-lyase without affecting the binding of LH/hCG receptors. *J Androl*. 15(4):302-8.

Orth DN (1995) Cushing's syndrome. *N Engl J Med*. 332(12):791-803

O'Shaughnessy PJ (1991) Steroidogenic enzyme activity in the hypogonadal (hpg) mouse testis and effect of treatment with luteinizing hormone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:921-928.

O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM & Huhtaniemi I (1998) Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*. 139(3):1141-6.

O'Shaughnessy PJ, Fleming LM, Jackson G, Hochgeschwender U, Reed P & Baker PJ (2003) Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis. *Endocrinology*, 144:3279-3284

Ouhtit A, Morel G & Kelly PA (1993) Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *Endocrinology*. 133(1):135-44.

Pabon JE, Li, X, Lei, Z.M, Sanfilippo J S, YussmanMA & RaoCV (1996) Novel presence of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in human adrenal glands. *J Clin Endocrinol Metab*. 81(6):2397-400.

Palkovitz R (1987) Fathers' motives for birth attendance. *Matern Child Nurs J*. 16(2):123-9.

Papadopoulos V, Mukhin AG, Costa E & Krueger KE (1990) The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem*. 265(7):3772-9.

- Pasquali R (2006)** Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertil Steril*. 85(5):1319-40
- Payne AH & O'Shaughnessy PJ (1996)** Structure, function and regulation of steroidogenic enzymes in the Leydig cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, eds. *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press; 260–285.
- Pedersen RC & Brownie AC (1987)** Gamma 3-melanotropin promotes mitochondrial cholesterol accumulation in the rat adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol*. 50(1-2):149-56.
- Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T & Collins F (1995)** Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 269(5223):540-3.
- Penhoat A, Darbeida H, Bernier M, Saez JM & Durand P (1988)** Inhibition of hormonal-induced cAMP and steroid production by inhibitors of pregnenolone metabolism in adrenal and Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*. 60(1):55-60.
- Penhoat A, Jaillard C, Begeot M, Durand P & Saez JM (1996)** Cycloheximide enhances ACTH-receptor mRNA through transcriptional and post-transcriptional mechanisms in bovine adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*. 121(1):57-63.
- Penhoat A, Jaillard C & Saez JM (1989)** Synergistic effects of corticotropin and insulin-like growth factor I on corticotropin receptors and corticotropin responsiveness in cultured bovine adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 165(1):355-9.
- Penhoat A, Jaillard C, & Saez JM (1994)** Regulation of bovine adrenal cell corticotropin receptor mRNA levels by corticotropin (ACTH) and angiotensin-II (A-II). *Mol Cell Endocrinol*. 103(1-2):R7-10.
- Penhoat A, Naville D, Jaillard C, Durand P & Bégeot M (1997)** Presence of multiple functional polyadenylation signals in the 3'-untranslated region of human corticotropin receptor cDNA. *Biochim Biophys Acta*. 1356(3):249-52.
- Perelló M, Moreno G, Camihort G, Luna G, Cónsole G, Gaillard RC & Spinedi E (2004)** Nature of changes in adrenocortical function in chronic hyperleptinemic female rats. *Endocrine*. 24(2):167-75.
- Perelman S & Perlman R (1994)** *Pédiatrie patrique III. Maladie des glandes endocrines*. 1218 pages. Edition Maloine.
- Peters JH, McKay BM, Simasko SM & Ritter RC (2005)** Leptin-induced satiation mediated by abdominal vagal afferents. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 288(4):R879-84.
- Peters JH, Ritter RC & Simasko SM (2006)** Leptin and CCK selectively activate vagal afferent neurons innervating the stomach and duodenum. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 290(6):R1544-9.
- Petraglia F, Sutton S, Vale W & Plotsky P (1987)** Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophyseal-portal circulation. *Endocrinology*. 120(3):1083-8.
- Petrescu AD, Gallegos AM, Okamura Y, Strauss JF 3rd & Schroeder F (2001)** Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics. *J Biol Chem*. 276(40):36970-82.
- Pfeifer SM, Furth EE, Ohba T, Chang YJ, Rennert H, Sakuragi N, Billheimer JT, Strauss JF 3rd (1993)** Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis? *J Steroid Biochem Mol Biol*. 47(1-6):167-72.
- Phillips DM, Lakshmi V & Monder C (1989)** Corticosteroid 11 β -dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology*. 125:209–216
- Picard-Hagen N, Darbeida H & Durand P (1995)** Glucocorticoids enhance the cholesterol side-chain cleavage activity of ovine adrenocortical mitochondria. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 55(1):57-65.

Picard-Hagen N, Penhoat A, Hue D, Jaillard C & Durand P (1997) Glucocorticoids enhance corticotropin receptor mRNA levels in ovine adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol.* 19(1):29-36.

Pitzel L, Kendoff A, Osterloh B & König A (1984) The stimulatory effect of corticotrophin on testicular testosterone release in male rabbits. *Exp Clin Endocrinol.* 83(3):297-302.

Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, Galloway JA, Frank BH, Karrison T & Van Cauter E (1988) Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest.* 81(2):435-41.

Ponting CP & Aravind L (1999) START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. *Trends Biochem Sci.* 24(4):130-2.

Porte D Jr, Baskin DG & Schwartz MW (2002) Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev.* 60(10 Pt 2):S20-9; discussion S68-84, 85-7. Review.

Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B & Gaillard RC (1998) Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology.* 139(10):4264-8.

Provencher PH, Tremblay Y, Belanger B & Belanger A (1992) Steroidogenesis in guinea pig adrenal cortex : effect of ACTH and steroid secretion and steroidogenic enzyme activities and expression . *J. Steroid Biochem..Mol. Biol.* 43:855-62

Quillan JM, Sadée W, Wei ET, Jimenez C, Ji L & Chang JK (1998) A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH₂ fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function. *FEBS Lett.* 428(1-2):59-62.

Rainey WE, Mason JI, Cochet C & Carr BR (1988) Protein kinase-C in the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 67(5):908-14.

Rached M, Buronfosse A, Durand P, Begeot M, & Penhoat A (2003) Stable expression of human melanocortin 3 receptor fused to EGFP in the HEK293 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 306(1):208-12.

Rached M, El Mourabit H, Buronfosse A, Blondet A, Naville D, Begeot M & Penhoat A (2005) Expression of the human melanocortin-2 receptor in different eukaryotic cells. *Peptides.* 26(10):1842-7.

Rainey WE, Naville D & Mason JI (1991) Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adrenocortical cells: effects of angiotensin-II and transforming growth factor beta. *Endocr Res.* 17(1-2):281-96.

Ragazzon B, Lefrançois-Martinez AM, Val P, Sahut-Barnola I, Tournaire C, Chambon C, Gachancard-Bouya JL, Begue RJ, Veyssière G & Martinez A (2006) Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology.* 147(4):1805-18.

Randeva HS, Karteris E, Grammatopoulos D & Hillhouse EW (2001) Expression of orexin-A and functional orexin type 2 receptors in the human adult adrenals: implications for adrenal function and energy homeostasis. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(10):4808-13.

Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O & Walker BR (2001) Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(3):1418-21.

Rask E, Walker BR, Söderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R & Olsson T (2002) Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese women: increased adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(7):3330-6.

Redmann SM Jr & Argyropoulos G (2006) AgRP-deficiency could lead to increased lifespan. *Biochem Biophys Res Commun.* 351(4):860-4.

Reinhart AJ, Williams SC & Stocco DM (1999) Transcriptional regulation of the StAR gene. *Mol Cell Endocrinol.* 151(1-2):161-9. Review.

Reizes O, Benoit SC, Strader AD, Clegg DJ, Akunuru S & Seeley RJ (2003) Syndecan-3 modulates food intake by interacting with the melanocortin/AgRP pathway. *Ann N Y Acad Sci.*994:66-73.

Reul JM, & de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 117(6):2505-11.

Reyes-Fuentes A & Veldhuis JD (1993) Neuroendocrine physiology of the normal male gonadal axis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 22(1):93-124.

Ricci G, Catizone A & Galdieri M (2006) Expression and functional role of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) during fetal mouse testis development. *Journal of Endocrinology* 191:559–570.

Rivarola MA, Saez JM, Meyer WJ, Jenkins ME & Migeon CJ (1966) Metabolic clearance rate and blood production rate of testosterone and androst-4-ene-3,17-dione under basal conditions, ACTH and HCG stimulation. Comparison with urinary production rate of testosterone. *J Clin Endocrinol Metab.* 26(11):1218-18

Rivier JE, Porter J, Rivier CL, Perrin M, Corrigan A, Hook WA, Siraganian RP & Vale WW (1986) New effective gonadotropin releasing hormone antagonists with minimal potency for histamine release in vitro. *J Med Chem.* 29(10):1846-51.

Rivier C & Rivest S (1991) Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. *Biol Reprod.* 45(4):523-32. Review

Robinson MJ & Cobb MH. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 9(2):180-6.

Rodgers RJ, Ishii Y, Halford JC & Blundell JE (2002) Orexins and appetite regulation. *Neuropeptides.*; 36(5): 303-25.

Romero DG, Welsh BL, Gomez-Sanchez EP, Yanes LL, Rilli S & Gomez-Sanchez CE (2006) Angiotensin II-mediated protein kinase D activation stimulates aldosterone and cortisol secretion in H295R human adrenocortical cells. *Endocrinology.* 147(12):6046-55.

Roselli-Reh fuss L, Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Low MJ, Tatro JB, Entwistle ML, Simerly RB & Cone RD (1993) Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(19):8856-60.

Ross JT, McMillen IC, Lok F, Thiel AG, Owens JA & Coulter CL (2007) Intrafetal insulin-like growth factor-I infusion stimulates adrenal growth but not steroidogenesis in the sheep fetus during late gestation. *Endocrinology.* 148(11):5424-32.

Rossi M, Kim MS, Morgan DG, Small CJ, Edwards CM, Sunter D, Abusnana S, Goldstone AP, Russell SH, Stanley SA, Smith DM, Yagaloff K, Ghatei MA & Bloom SR (1998) A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 139(10):4428-31

Ruhayel Y, Malm G, Haugen TB, Henrichsen T, Bjørsvik C, Grotmol T, Saether T, Malm J, Figenschau Y, Rylander L, Levine RJ & Giwercman A (2007) Seasonal variation in serum concentrations of reproductive hormones and urinary excretion of 6-sulfatoxymelatonin in men living north and south of the Arctic Circle: a longitudinal study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 67(1):85-92.

Ruiz M, Lind U, Gåfvels M, Eggertsen G, Carlstedt-Duke J, Nilsson L, Holtmann M, Stierna P, Wikström AC & Werner S (2001) Characterization of two novel mutations in the glucocorticoid receptor gene in patients with primary cortisol resistance. *Clin Endocrinol (Oxf).* 55(3):363-71.

Rulli A, Antognelli C, Prezzi E, Baldracchini F, Piva F, Giovannini E & Talesa V (2006) A possible regulatory role of 17beta-estradiol and tamoxifen on glyoxalase I and glyoxalase II genes expression in MCF7 and BT20 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 96(2):187-96.

Rusvai E & Náray-Fejes-Tóth A (1993) A new isoform of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in aldosterone target cells. *J Biol Chem.* 268(15):10717-20.

Sachot C, Rummel C, Bristow AF & Luheshi GN (2007) The role of the vagus nerve in mediating the long-term anorectic effects of leptin. *J Neuroendocrinol.* 19(4):250-61

Saez JM (1994) Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15:574–626.

Sahm UG, Qarawi MA, Olivier GW, Ahmed AR, Branch SK, Moss SH & Pouton CW (1994) The melanocortin (MC3) receptor from rat hypothalamus: photoaffinity labelling and binding of alanine-substituted alpha-MSH analogues. *FEBS Lett.* 15:350(1):29-32.

Sahut-Barnola I, Lefrancois-Martinez AM, Jean Cj, Veyssiere G & Martinez A (2000). "Adrenal tumorigenesis targeted by the corticotropin-regulated promoter of the aldo-keto reductase AKR1B7 gene in transgenic mice." *Endocr Res* 26(4): 885-98.

Saiah E (2008) The Role of 11Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase in Metabolic Disease and Therapeutic Potential of 11Beta-HSD1 Inhibitors. *Curr Med Chem.*15(7):642-9

Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozlowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ & Yanagisawa M (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell.* 20; 92(4):573-85.

Salzemann C, Lisiecki I, Urban J & Pileni MP (2004) Anisotropic copper nanocrystals synthesized in a supersaturated medium: nanocrystal growth. *Langmuir.*20(26):11772-7.

Santen RJ (1975) Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest.* 56(6):1555-63.

Sapolsky RM (1985) Stress-induced suppression of testicular function in the wild baboon: role of glucocorticoids. *Endocrinology.* 116 (6):2273-8.

Sarkar D, Kambe F, Hayashi Y, Ohmori S, Funahashi H & Seo H (2000) Involvement of AP-1 and steroidogenic factor (SF)-1 in the cAMP-dependent induction of human adrenocorticotrophic hormone receptor (ACTHR) promoter. *Endocr J.*47(1):63-75

Schiebinger RJ, Joseph CM, Li Y & Cragoe EJ Jr (1995) Mechanism of hyperosmolality stimulation of ANP secretion: its dependency on calcium and sodium. *Am J Physiol.* 268(3 Pt 1):E476-83.

Schimmer BP, Cordova M, Cheng H, Tsao A & Morris Q (2007) A genome-wide assessment of adrenocorticotropin action in the Y1 mouse adrenal tumor cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 265-266:102-7.

Schiöth HB, Mutulis F, Muceniece R, Prusis P & Wikberg JE (1998) Discovery of novel melanocortin4 receptor selective MSH analogues. *Br J Pharmacol.*124(1):75-82.

Schmid W, Cole TJ, Blendy JA & Schutz G (1995) Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling in development. *J Steroid Biochem Mol Biol* ,53:33–35

Schmidt Z, Szilágyi M, Megyeri A & Merétey K(1995) [Low-dose methotrexate therapy of rheumatoid arthritis in the elderly] *Orv Hetil.* 136(22):1157-61. Hungarian.

Schnackenberg CG (2008) 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors for metabolic syndrome. *Curr Opin Investig Drugs.*9(3):295-300

Schöneshöfer M & Fenner A (1981) Alterations of plasma levels of pituitary hormones after oral application of metyrapone. *Horm Metab Res.*,13(8):473-4.

Schultz R, Isola J, Parvinen M, Honkaniemi J, Wikstrom AC, Gustafsson JA & Peltö-Huikko M (1993) Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. *Mol Cell Endocrinol.*, 95:115–120

Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC & Porte D Jr (1992) Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 13(3):387-414. Review.

Schwartz MW, Dallman MF & Woods SC (1995) Hypothalamic response to starvation: implications for the study of wasting disorders. *Am J Physiol.* 269(5 Pt 2):R949-57. Review.

Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Bum P & Baskin DG (1996) Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation* 98, 1101-06.

Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D Jr, Woods SC, Seeley RJ & Weigle DS (1996) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes.* 45(4):531-5.

Seckl JR (1997) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol.* (1):49-99. Review.

Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters F, Wirtz KW, Wanders RJ, Maeda N & Assmann G (1998) Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev.* 12(8):1189-201.

Seelig S & Sayers G (1973) Isolated adrenal cortex cells: ACTH agonists, partial agonists, antagonists; cyclic AMP and corticosterone production. *Arch Biochem Biophys.* 154(1):230-9.

Seidenwurm D, Smathers RL, Kan P & Hoffman A (1985) Intratesticular adrenal rests diagnosed by ultrasound. *Radiology* 155:479-481

Serón-Ferré M, Lawrence CC & Jaffe RB (1978) Role of hCG in regulation of the fetal zone of the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 46(5):834-7.

Shan L-X, Phillips DM, Bardin CW & Hardy MP (1993) Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology*, 133:2277-2283

Sharpe RM & Cooper I (1987) Comparison of the effects on purified Leydig cells of four hormones (oxytocin, vasopressin, opiates and LHRH) with suggested paracrine roles in the testis. *J Endocrinol.* 113(1):89-96.

Shimizu K, Nomoto M, Ueta Y, Konishi T, Abe T, Gotoh S, Suzuki K, Nakamura T & Higashi K (1997) Selective expression of HSP70-1 gene in the adrenal cortex but not in the medulla of thermally stressed rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 233(2):550-4.

Shupnik MA (1996) Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod.* 54(2):279-86.

Shutler SD, Jones M & Thomas S (1997) Management of a fungating breast wound. *J Wound Care.*;6(5):213-4.

Shutter JR, Graham M, Kinsey AC, Scully S, Lüthy R & Stark KL (1997) Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev.* 11(5):593-602.

Sibert L, Kuhn JM, Rossi D & Tostain J (2004) Drug interactions with the androgen balance of adult men. *Prog Urol.* 14(5):679-83.

Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA & Melner MH (2005). Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family. *Endocr Rev.* 2005 Jun;26(4):525-82. Epub 2005 Jan 4. Review.

Sinha MK & Caro JF (1998) Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm.* 54:1-30

Sinha MK, Sturis J, Ohannesian J, Magosin S, Stephens T, Heiman ML, Polonsky KS & Caro JF (1996) Ultradian oscillations of leptin secretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 228(3):733-8.

Sipols AJ, Baskin DG & Schwartz MW (1995) Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes*.44(2):147-51.

Skinner MK (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev*. 12(1):45-77. Review. No abstract available.

Slieker LJ, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J & Stephens TW (1996) Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *J Biol Chem*, 271(10):5301-4

Slominski A, Ermak G & Mihm M (1996) ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 81(7):2746-9

Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De Souza EB & Harris RB (1998) The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport*. 11;9(7):1601-6.

Small CJ, Liu YL, Stanley SA, Connoley IP, Kennedy A, Stock MJ & Bloom SR (2003) Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 27(4):530-3.

Smith JH & Bubenik HA (1990) Plasma concentrations of glucocorticoids in white-tailed deer: the effects of acute ACTH and dexamethasone administration. *Can J Zool*. 68:2123-29

Smith AI & Funder JW (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev*. 9(1):159-79. Review.

Smith DF & Toft DO (1993) Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol*. 7(1):4-11. Review.

Song Y, Gollig G, Thacker TL & Cone RD (2003) Agouti-related protein (AGRP) is conserved and regulated by metabolic state in the zebrafish, *Danio rerio*. *Endocrine*.22(3):257-65.

Spiga F, Harrison L R, Wood S A, MacSweeney C P, Thomson F J, Craighead M, Grassie M & Lightman S L (2008) Effect of the glucocorticoid receptor antagonist Org 34850 on fast and delayed feedback of corticosterone release. *Journal of Endocrinology* 196, DOI 323-330.

Spiga F, Harrison L R, Wood S A, MacSweeney C P, Thomson F J, Craighead M, Grassie M & Lightman S L (2007) Effect of the glucocorticoid receptor antagonist Org 34850 on basal and stress-induced corticosterone secretion. *J Neuroendocrinol*. 19(11):891-900

Spina M, Merlo-Pich E, Chan RK, Basso AM, Rivier J, Vale W & Koob GF (1996) Appetite-suppressing effects of urocortin, a CRF-related neuropeptide. *Science*. 273(5281):1561-4.

Spinazzi R, Andreis PG, Rossi GP & Nussdorfer GG (2006) Orexins in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Pharmacol Rev*.58(1):46-57. Review.

Spinazzi R, Ziolkowska A, Neri G, Nowak M, Rebuffat P, Nussdorfer GG, Andreis PG & Malendowicz LK (2005) Orexins modulate the growth of cultured rat adrenocortical cells, acting through type 1 and type 2 receptors coupled to the MAPK p42/p44- and p38-dependent cascades. *Int J Mol Med*.15(5):847-52.

Spiteri-Grech J & Nieschlag E (1992) The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res*. 38 Suppl 1:22-7. Review.

Sriraman V & Jagannadha Rao A (2004) Evaluation of the role of FSH in regulation of Leydig cell function during different stages of its differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. 224(1-2):73-82.

Sriraman V, Rao VS, Sairam MR & Rao AJ (2000) Effect of deprivation of LH on Leydig cell proliferation: involvement of PCNA, cyclin D3 and IGF-1. *Mol Cell Endocrinol*.162(1-2):113-20.

Srivastava RK, Taylor MF & Mann DR (1993).Effect of immobilization stress on plasma luteinizing hormone, testosterone, and corticosterone concentrations and on 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the testes of adult rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 204 (2): 231–5.

Staffieri JJ, Badano H& Celoria G (1965) [Study of testicular estrogenic production in normal individuals and in patients with various alterations of the seminiferous tube] *Rev Iber Endocrinol.* 12(68):85-93.

Stalker A, Hermo L & Antakly T (1991) Subcellular distribution of [3H]-dexamethasone mesylate binding sites in Leydig cells using electron microscope radioautography. *Am J Anat.* 190(1):19-30.

Stanley SA, Small CJ, Kim MS, Heath MM, Seal LJ, Russell SH, Ghatei MA & Bloom SR (1999) Agouti related peptide (Agrp) stimulates the hypothalamo pituitary gonadal axis in vivo & in vitro in male rats. *Endocrinology.* 140(11):5459-62.

Stanley SA, Davies S, Small CJ, Gardiner JV, Ghatei MA, Smith DM & Bloom SR (2003) gamma-MSH increases intracellular cAMP accumulation and GnRH release in vitro and LH release in vivo *FEBS Lett.*543(1-3):66-70.

Starowicz K & Przewłocka B (2003) The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci.* 73(7):823-47.Review

Ste-Marie L, Vachon P, Vachon L, Bémour C, Guertin MC & Montgomery J (2000) Hydroxyl radical production in the cortex and striatum in a rat model of focal cerebral ischemia. *Can J Neurol Sci.* .27(2):152-9.

Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM & Kriauciunas A (1995) The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature*, 77(6549):530-2

Stevens VL, Xu T & Lambeth JD (1993) Cholesterol trafficking in steroidogenic cells. Reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a pre-steroidogenic pool. *Eur J Biochem.* 216(2):557-63.

Stikkelbroeck NM, Otten BJ, Pasic A, Jager GJ, Sweep CG, & Noordam Ké Hermus AR (2001) High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* , 86:5721–5728.

Stocco DM (2000) StARTing to understand cholesterol transfer. *Nat Struct Biol.* 7(6):445-7.

Stocco DM & Clark BJ (1996) Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem Pharmacol.* 51(3):197-205. Review.

Stokes PE, Stoll PM, Schluger JH & Lasley B (2002) Hypercortisolemia decreases dexamethasone half-life in rabbit. *J Psychiatr Res.*36(6):423-8.

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M & Strosberg AD (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.*18(3):213-5.

Stütz AM, Staszkievicz J, Ptitsyn A & Argyropoulos G (2007) Circadian expression of genes regulating food intake. *Obesity (Silver Spring).*15(3):607-15.

Sugano T, Yanagita T, Yokoo H, Satoh S, Kobayashi H & Wada A (2006) Enhancement of insulin-induced PI3K/Akt/GSK-3beta and ERK signaling by neuronal nicotinic receptor/PKC-alpha/ERK pathway: up-regulation of IRS-1/-2 mRNA and protein in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem.*98(1):20-33.

Sundaramurthy D, Campbell DA, Leek JP, Markham AF & Pieri LF (1998) Assignment of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene to human chromosome band 18q22 by in situ hybridisation and radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet.*82(1-2):97-8.

Supornsilchai V, Söder O & Svechnikov K (2006) Sesquiterpene lactone helenalin suppresses Leydig and adrenocortical cell steroidogenesis by inhibiting expression of the steroidogenic acute regulatory protein. *Reprod Toxicol.* 22(4):631-5.

Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opapa EC, Kuhn CM & Rebuffé-Scrive M (1995) Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*.44 (5):645-51.

Suter DE & Schwartz NB (1985) Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone by male rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology*.117(3): 855-9

Szücs N, Varga I, Jakab C, Patócs A, Gláz E, Tóth M, Kiss R & Rácz K (2001) Leptin inhibits cortisol and corticosterone secretion in pathologic human adrenocortical cells. *Pituitary*.4(1-2):71-7.

Tähkä KM (1989) Local control mechanisms in the testis. *Int J Dev Biol*. 33(1):141-8. Review.

Takagi T, Yamamura T, Anraku T, Yasuo S, Nakao N, Watanabe M, Iigo M, Ebihara S & Yoshimura T (2007) Involvement of transforming growth factor alpha in the photoperiodic regulation of reproduction in birds. *Endocrinology*. 148(6):2788-92.

Takeuchi S, Kudo T & Takahashi S (1998) Molecular cloning of the chicken melanocortin 2 (ACTH)-receptor gene. *Biochim Biophys Acta*. 1403(1):102-8.

Takahashi H, Teranishi Y, Nakanishi S & Numa S (1981) Isolation and structural organization of the human corticotropin--beta-lipotropin precursor gene. *FEBS Lett*. 1981 Nov 30;135(1):97-102

Takase M, Tsutsui K & Kawashima S (1990) Effects of PRL and FSH on LH binding and number of Leydig cells in hypophysectomized mice. *Endocrinol Jpn*. 37(2):193-203.

Takeuchi S, & Takahashi S (1999) "A possible involvement of melanocortin 3 receptor in the regulation of adrenal gland function in the chicken." *Biochim Biophys Acta* 1448(3): 512-8.

Takeuchi S & Takahashi S (1998) Melanocortin receptor genes in the chicken--tissue distributions. *Gen Comp Endocrinol*.112(2):220-31.

Takeuchi S, Teshigawara K & Takahashi S (1999) Molecular cloning and characterization of the chicken pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *Biochim Biophys Acta*. 1450(3):452-9.

Tatro JB (1990) Melanotropin receptors in the brain are differentially distributed and recognize both corticotropin and alpha-melanocyte stimulating hormone. *Brain Res*. 536(1-2):124-32.

Tartaglia LA (1997) The leptin receptor. *J Biol Chem*.272(10):6093-6. Review.

Taylor A & Namba K (2001) In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH). *Immunol Cell Biol*.79(4):358-67.

Tempel DL & Leibowitz SF (1994) Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol*. 6(5):479-501.

Tena-Sempere M & Barreiro ML (2002) Leptin in male reproduction: the testis paradigm *Mol.Cell.Endocr* 188(1-2), 9-13

Teitsma CA, Anglade I, Lethimonier C, Le Dréan G, Saligaut D, Ducouret B & Kah O (1999) Glucocorticoid receptor immunoreactivity in neurons and pituitary cells implicated in reproductive functions in rainbow trout: a double immunohistochemical study. *Biol Reprod*. 60(3):642-50.

Thomson SP, Stump CS, Kurukulasuriya LR & Sowers JR (2007) Adrenal Steroids and the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 9(6):512-519.

Tinajero JC, Fabbri A & Dufau ML (1993) Serotonergic inhibition of rat Leydig cell function by propranolol. *Endocrinology*. 133(1):257-64.

Tirard J, Gout J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Begeot M & Naville D (2007) A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology*.148(5):1996-2005.

Toebosch AM, Robertson DM, Klaij IA, de Jong FH & Grootegoed JA (1989) Effects of FSH and testosterone on highly purified rat Sertoli cells: inhibin alpha-subunit mRNA expression and inhibin secretion are enhanced by FSH but not by testosterone. *J Endocrinol*. 122(3):757-62.

Tohei A, Tomabechi T, Mamada M, Akai M, Watanabe G & Taya K (1997) Effects of repeated ether stress on the hypothalamic-pituitary-testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *J Vet Med Sci*. 59(5):329-34.

Tomlinson JW & Stewart PM (2001) Cortisol metabolism and the role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Best Practise and Research.Clinical Endocrinology and Metabolism* 15 61–78.

Trayhurn P & Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ.*Proc Nutr Soc*.60(3):329-39. Review.

Trzeciak WH, Simpson ER, Scallen TJ, Vahouny GV & Waterman MR (1987) Studies on the synthesis of sterol carrier protein-2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture. Regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP. *J Biol Chem*. 262(8):3713-7.

Tschop M & Heiman ML (2001) Rodent obesity models: an overview. *Exp.Clin.Endocrinol. Diabetes* 109(6): 307-19

Tsigos C & Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 53(4):865-71

Tsigos C & Chrousos GP (1994) Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 23(3):451-66.

Turnbull AV & Rivier C (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med*. 215(1):1-10. Review.

Uhler M & Herbert F (1983) Complete amino acid sequence of mouse pro-opiomelanocortin derived from the nucleotide sequence of pro-opiomelanocortin cDNA. *J Biol Chem*. 258(1):257-61.

Ulisse S, Fabbri A, Tinajero JC & Dufau ML (1990) A novel mechanism of action of corticotropin releasing factor in rat Leydig cells. *J Biol Chem*. 265(4):1964-71

Utriainen P, Liu J, Kuulasmaa T & Voutilainen R (2006) Inhibition of DNA methylation increases follistatin expression and secretion in the human adrenocortical cell line NCI-H295R. *J Endocrinol*.188(2):305-10.

Vahouny GV, Dennis P, Chanderbhan R, Fiskum G, Noland BJ & Scallen TJ (1984) Sterol carrier protein2 (SCP2)-mediated transfer of cholesterol to mitochondrial inner membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 122(2):509-15.

Vale W, Spiess J, Rivier C & Rivier J (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 213(4514):1394-7.

Valenti S, Guido R, Fazzuoli L, Barreca A, Giusti M & Giordano G (1997) Decreased steroidogenesis and cAMP production in vitro by leydig cells isolated from rats made hypothyroid during adulthood .*Int J Androl.*, 20(5):279-86

Valladares LE & Payne AH (1979) Acute stimulation of aromatization in Leydig cells by human chorionic gonadotropin in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 76(9):4460-3.

van Amerongen A, van Noort M, van Beckhoven JR, Rommerts FF, Orly J & Wirtz KW (1989) The subcellular distribution of the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) in rat liver and adrenal gland. *Biochim Biophys Acta*. 1001(3):243-8.

van der Kraan M, Adan RA, Entwistle ML, Gispén WH, Burbach JP & Tatro JB (1998) Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands. *Endocrinology*. 139(5):2348-55.

van Mourik S, Stelmasiak T & Outch KH (1985) Changes in plasma levels of cortisol and corticosterone after acute ACTH stimulation in rusa deer (*Cervus rusa timorensis*). *Comp Biochem Physiol A*, 81(3):545-9

Vänttinen T, Liu J, Kuulasmaa T, Kivinen P & Voutilainen R (2003) Expression of activin/inhibin signaling components in the human adrenal gland and the effects of activins and inhibins on adrenocortical steroidogenesis and apoptosis. *J Endocrinol*. 178(3):479-89.

Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, Chan R, Turnbull AV, Lovejoy D & Rivier C (1995) Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 378(6554):287-92.

Veldhuis JD & Johnson ML (1986) Cluster analysis: a simple, versatile, and robust algorithm for endocrine pulse detection. *Am J Physiol*. 250(4 Pt 1):E486-93.

Verhoeven G, Cailleau J & Morris ID (1989) Inhibitory effects of alkane sulphonates on the function of immature rat Leydig, Sertoli and peritubular cells cultured in vitro. *J Mol Endocrinol*. 2(2):145-55.

Volmat V & Pouyssegur J (2001) Spatiotemporal regulation of the p42/p44 MAPK pathway. *Biol Cell*. 93(1-2):71-9. Review.

Vergoni AV & Bertolini A (2000) Role of melanocortins in the central control of feeding. *Eur J Pharmacol*; 405 (1-3):25-32. Review.

Verhoeven G, Cailleau J & Morris ID (1989) Inhibitory effects of alkane sulphonates on the function of immature rat Leydig, Sertoli and peritubular cells cultured in vitro. *J Mol Endocrinol*. 2(2):145-55.

Vreeburg JT, de Greef WJ, Ooms MP, van Wouw P & Weber RF (1984) Effects of adrenocorticotropin and corticosterone on the negative feedback action of testosterone in the adult male rat. *Endocrinology*, 115(3):977-83

Walker BR, Connacher AA, Lindsay RM, Webb DJ & Edwards CR (1995) Carbenoxolone increases hepatic insulin sensitivity in man: a novel role for 11-oxosteroid reductase in enhancing glucocorticoid receptor activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 80:3155-3159

Walker BR (2007) Extra-adrenal regeneration of glucocorticoids by 11b-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: physiological regulator and pharmacological target for energy partitioning. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66, 1-8

Wang EY, Ma EY & Woodruff TK (2003) Activin signal transduction in the fetal rat adrenal gland and in human H295R cells. *J Endocrinol*. 178(1):137-48

Wang XJ, Dyson MT, Mondillo C, Patrignani Z, Pignataro O & Stocco DM (2002) Interaction between arachidonic acid and cAMP signaling pathways enhances steroidogenesis and StAR gene expression in MA-10 Leydig tumor cells. *Mol Cell Endocrinol*. 188(1-2):55-63.

Wang G & Hardy MP (2004) Development of leydig cells in the insulin-like growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol Reprod*. 70(3):632-9.

Warren DW (1989) Development of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory protein in the rat testis. *Biol Reprod*. 40(6):1208-14.

- Watanabe G, Pena P, Albanese C, Wilsbacher LD, Young JB & Pestell RG (1997)** Adrenocorticotropin induction of stress-activated protein kinase in the adrenal cortex in vivo. *J Biol Chem.* 272(32):20063-9.
- Weber RF & Calogero AE (1991)** Prolactin stimulates rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone and pituitary adrenocorticotropin secretion in vitro. *Neuroendocrinology.* 54(3):248-53.
- Welsh TH Jr, Bambino TH & Hsueh AJ (1982)** Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol Reprod.* 27(5):1138-46.
- White PC, Mune T & Agarwal AK (1997)** 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev.* 18:135–156.
- Wiemann JN, Clifton DK & Steiner RA (1989)** Pubertal changes in gonadotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin gene expression in the brain of the male rat. *Endocrinology.* 124(4):1760-7.
- Wikberg JE, Muceniece R, Mandrika I, Prusis P, Lindblom J, Post C & Skottner A (2000)** New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol Res.* 42 (5):393-420. Review.
- Wilczynski A, Wang XS, Joseph CG, Xiang Z, Bauzo RM, Scott JW, Sorensen NB, Shaw AM, Millard WJ, Richards NG & Haskell-Luevano C (2004)** Identification of putative agouti-related protein (87-132)-melanocortin-4 receptor interactions by homology molecular modeling and validation using chimeric peptide ligands *J Med Chem.* 47(9):2194-207
- Wilding JP (2002)** Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med.* 19(8):619-27
- Willenberg HS, P  th G, V  geli TA, Scherbaum WA & Bornstein SR (2002)** Role of interleukin-6 in stress response in normal and tumorous adrenal cells and during chronic inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 966:304-14.
- Willenberg HS, Stratakis CA, Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Chrousos GP & Bornstein SR (1998)** Aberrant interleukin-1 receptors in a cortisol-secreting adrenal adenoma causing Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 339(1):27-31.
- Winnay JN & Hammer GD (2006)** Adrenocorticotrophic hormone-mediated signaling cascades coordinate a cyclic pattern of steroidogenic factor 1-dependent transcriptional activation. *Mol Endocrinol.* 20(1):147-66.
- Wynn PC, Hauger RL, Holmes MC, Millan MA, Catt KJ & Aguilera G (1984)** Brain and pituitary receptors for corticotropin releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy. *Peptides.* 5(6):1077-84.
- Xiong Y & Hales DB (1993)** The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology.* 132(6):2438-44.
- Yanagibashi K (1979)** Calcium ion as "second messenger" in corticoidogenic action of ACTH. *Endocrinol Jpn.* 26(2):227-32.
- Yang YK, Dickinson CJ, Zeng Q, Li JY, Thompson DA & Gantz I (1999)** Contribution of melanocortin receptor exoloops to Agouti-related protein binding. *J Biol Chem.* 274(20):14100-6
- Ye P, Kenyon C J, MacKenzie S M, Nichol K, Seckl J R, Fraser R, Connell JM C & Davies E (2008)** Effects of ACTH, dexamethasone, and adrenalectomy on 11 β -hydroxylase (*CYP11B1*) and aldosterone synthase (*CYP11B2*) gene expression in the rat central nervous system. *J. Endocrinology* 196(2):305-11
- Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S & McCann SM (1997)** Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94, 1023-28
- Zamorano PI, Mahesh VR, De villa LM, Chorich LP, Bhat GR & Drann DW (1997)** Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology,* 65,223-28.

Zhai J, Lanclos KD & Abney TO (1996) Estrogen receptor messenger ribonucleic acid changes during Leydig cell development. *Biol Reprod.*,55(4):782-8.

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J & Huhtaniemi I (2001) Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* 15(1):172-83.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.*372(6505):425-32.

Zimanyi IA & Pellemounter MA (2003) The role of melanocortin peptides and receptors in regulation of energy balance. *Curr Pharm Des.* 9(8):627-41. Review.

Ziolkowska A, Spinazzi R, Albertin G, Nowak M, Malendowicz LK, Tortorella C & Nussdorfer GG (2005) Orexins stimulate glucocorticoid secretion from cultured rat and human adrenocortical cells, exclusively acting via the OX1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol.*;96(5):423-9

Zuber MX, Simpson ER & Waterman MR (1986) Expression of bovine 17 alpha-hydroxylase cytochrome P-450 cDNA in nonsteroidogenic (COS 1) cells. *Science.* 234(4781):1258-61. /

Zwermann O, Schulte DM, Reincke M & Beuschlein F (2005) ACTH 1-24 inhibits proliferation of adrenocortical tumors in vivo. *Eur J Endocrinol.* 153(3):435-44.

Annexe 1

Age semaine	Contrôle			DIO		
	contrôle	SEM	SD	DIO	SEM	SD
0	21,4	0,3	1,09	21,5	0,4	1,26
1	22,1	0,5	1,58	24,3	0,4	1,38
2	23,0	0,6	1,99	26,2	0,8	2,82
3	23,0	0,5	1,65	27,6	0,6	2,06
4	24,1	0,6	2,05	30,9	0,7	2,47
5	25,0	0,5	1,81	32,9	0,8	2,94
6	25,6	0,5	1,88	34,8	1,0	3,47
7	26,3	0,5	1,81	37,0	1,1	3,68
8	27,1	0,5	1,60	39,8	1,2	4,20
9	27,3	0,5	1,65	41,3	1,3	4,37
10	27,2	0,5	1,64	42,4	1,2	4,23
11	26,9	0,6	1,99	43,8	1,3	4,35
12	25,8	0,5	1,88	44,0	1,4	4,81
13	27,5	0,7	1,75	47,7	0,6	1,39
14	27,7	0,6	1,46	49,2	0,5	1,30
15	28,2	0,6	1,37	49,6	0,7	1,60
16	27,9	0,6	1,53	50,1	0,7	1,69

Tableau 1: Poids des souris C57BL/6J enregistrés au cours de 16 semaines de croissance

Annexe 2

Groupe Animaux	Groupe 1 (Cortrosyn)				Groupe 2 (NaCl 0,9%)				Groupe 3 (dexaméthasone)			
	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn
poids des surrénales (g)	0,51	0,28	0,4	0,21	0,34	0,29	0,4	0,35	0,84	0,53	0,34	0,21
	0,22	0,33	0,5	0,58	0,17	0,46	0,46	0,32	0,54	0,27	0,22	0,43
	0,1	0,1	0,1	0,11	0,38	0,35	0,31	0,2	0,43	0,29	0,5	-
moy ± sem	0,27±	0,23±	0,33±	0,3±	0,29±	0,35±	0,39±	0,29±	0,6±	0,36±	0,35±	0,32±
	0,033	0,07	0,12	0,14	0,08	0,053	0,043	0,045	0,12	0,083	0,081	0,11

Tableau 2 : Poids individuels et moyens (m±sem) des surrénales

Groupe Animaux	Groupe 1 (cortrosyn)				Groupe 2 (NaCl 0,9%)				Groupe 3 (dexaméthasone)			
	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn
poids des testicules (g)	5,10	3,45	3,78	4,68	4,98	2,61	3,13	3,01	3,87	3,33	5,89	3,08
	4,99	4,25	3,86	5,09	3,49	2,92	0,75	2,13	1,05	2,99	3,93	4,49
	3,91	4,32	4,06	3,81	2,16	3,6	2,61	2,42	5,35	3,89	3,4	-
moy±sem	4,66±	4,00±	3,9±	4,52±	3,54±	3,04±	2,16±	2,52±	3,42±	3,4±	4,4±	3,78±
	0,379	1,11	0,083	0,377	0,814	0,292	0,722	0,258	1,26	0,262	0,757	0,705

Tableau 3 : Poids individuels et moyens (m±sem) des testicules

Annexe 1

Age semaine	Contrôle			DIO		
	contrôle	SEM	SD	DIO	SEM	SD
0	21,4	0,3	1,09	21,5	0,4	1,26
1	22,1	0,5	1,58	24,3	0,4	1,38
2	23,0	0,6	1,99	26,2	0,8	2,82
3	23,0	0,5	1,65	27,6	0,6	2,06
4	24,1	0,6	2,05	30,9	0,7	2,47
5	25,0	0,5	1,81	32,9	0,8	2,94
6	25,6	0,5	1,88	34,8	1,0	3,47
7	26,3	0,5	1,81	37,0	1,1	3,68
8	27,1	0,5	1,60	39,8	1,2	4,20
9	27,3	0,5	1,65	41,3	1,3	4,37
10	27,2	0,5	1,64	42,4	1,2	4,23
11	26,9	0,6	1,99	43,8	1,3	4,35
12	25,8	0,5	1,88	44,0	1,4	4,81
13	27,5	0,7	1,75	47,7	0,6	1,39
14	27,7	0,6	1,46	49,2	0,5	1,30
15	28,2	0,6	1,37	49,6	0,7	1,60
16	27,9	0,6	1,53	50,1	0,7	1,69

Tableau 1: Poids des souris C57BL/6J enregistrés au cours de 16 semaines de croissance

Annexe 2

Groupe Animaux	Groupe 1 (Cortrosyn)				Groupe 2 (NaCl 0,9%)				Groupe 3 (dexaméthasone)			
	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn
poids des surrénales (g)	0,51	0,28	0,4	0,21	0,34	0,29	0,4	0,35	0,84	0,53	0,34	0,21
	0,22	0,33	0,5	0,58	0,17	0,46	0,46	0,32	0,54	0,27	0,22	0,43
	0,1	0,1	0,1	0,11	0,38	0,35	0,31	0,2	0,43	0,29	0,5	-
moy ± sem	0,27± 0,033	0,23± 0,07	0,33± 0,12	0,3± 0,14	0,29± 0,08	0,35± 0,053	0,39± 0,043	0,29± 0,045	0,6± 0,12	0,36± 0,083	0,35± 0,081	0,32± 0,11

Tableau 2 : Poids individuels et moyens (m±sem) des surrénales

Groupe Animaux	Groupe 1 (cortrosyn)				Groupe 2 (NaCl 0,9%)				Groupe 3 (dexaméthasone)			
	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn	20mn	40mn	80mn	100mn
poids des testicules (g)	5,10	3,45	3,78	4,68	4,98	2,61	3,13	3,01	3,87	3,33	5,89	3,08
	4,99	4,25	3,86	5,09	3,49	2,92	0,75	2,13	1,05	2,99	3,93	4,49
	3,91	4,32	4,06	3,81	2,16	3,6	2,61	2,42	5,35	3,89	3,4	-
moy±sem	4,66± 0,379	4,00± 1,11	3,9± 0,083	4,52± 0,377	3,54± 0,814	3,04± 0,292	2,16± 0,722	2,52± 0,258	3,42± 1,26	3,4± 0,262	4,4± 0,757	3,78± 0,705

Tableau 3 : Poids individuels et moyens (m±sem) des testicules