Lauréats des années
2011, 2012, 2013 et 2014

Bourses, Prix et Allocations de Recherche en Endocrinologie

SOCIETE FRANÇAISE D'ENDOCRINOLOGIE

Site internet : http://www.sfendocrino.org

Table des matières

Editorial 4

Bourses SFE « CLERMONT-FERRAND 2011 » 5

Bourse de Master 2 mutualisée Ipsen & Lilly 2011 (30 K€) 6
Mlle Cyrielle CAUSSY 6

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2011 (30 K€) 9
Dr Catherine DODE 9

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2011 (28 K€) 11
Dr Anne Lise LECOQ 11

Prix de Recherche Clinique Sanofi Aventis 2011 (28 K€) 13
Dr Emmanuelle MOTTE-SIGNORET 13

Prix de Recherche Clinique en Thyroïdologie Merck Serono 2011 (15 K€) 15
Pr Lionel GROUSSIN-ROUILLER 15

Prix de Recherche Clinique Genzyme 2011 (10 K€) 17
Pr Laurence LEENHARDT, en Collaboration avec **Dr Stéphane BARDET** 17

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2011 (40 K€) 20
Dr Blandine GATTA-CHERIFI 20

Bourse de Master 2 SFE 2011 (30 K€) 23
Dr Valérie BERNARD 23

Bourse de Fin de thèse SFE 2011 (20 K€) 25
Dr Zachariae BRAM 25

Bourses SFE « TOULOUSE 2012 » 26

Bourse de Master 2 mutualisée Ipsen & SFE 2012 (30 K€) 27
Dr Anne WAUTIER 27

Bourse de Master 2 Lilly 2012 (30 K€) 28
Mlle Amélie POIDVIN 28

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2012 (30 K€) 30
Dr Thomas CUNY 30

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2012 (30 K€) 32
Dr Peter KAMENICKY 32

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2012 (40 K€) 33
Dr Maria-Cristina DE MARTINO 33

Bourse de Master 2 SFE 2012 (30 K€) 34
Dr Claire AGOSTA 34

Bourse de Fin de thèse SFE 2012 (20 K€) 36
Dr Audrey ROUSEAU 36

Bourses SFE « PARIS 2013 » **38**

Bourse de Master 2 Ipsen 2013 (30 K€) **39**
Dr Sarra SMATI-GRANGEON 39

Bourse de Master 2 mutualisée Lilly & SFE 2013 (30 K€) **43**
Dr Julie BEAUVY 43

Bourse de Master 2 mutualisée Merck Serono & SFE 2013 (30 K€) **44**
Dr Vanessa BOEHM 44

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2013 (30 K€) **46**
Dr Laure CAZABAT 46

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2013 (30 K€) **48**
Dr Nicolas de ROUX 48

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2013 (40 K€) **51**
Dr Claire BRIET 51

Bourse de Master 2 SFE 2013 (30 K€) **55**
Dr Céline MOULY 55

Bourse de Fin de thèse SFE 2013 (20 K€) **58**
Dr Emilie PASTEL 58

Bourses SFE « LYON 2014 » **61**

Bourse de Master 2 Ipsen 2014 (32 K€) **62**
Mme Anne-Gaëlle DECOUX-POULLOT 62

Bourse de Master 2 Lilly 2014 (32 K€) **64**
Dr Mirella HAGE 64

Bourse de Master 2 mutualisée Merck Serono & SFE 2014 (32 K€) **66**
Mlle Nathanaëlle MONTANIER 66

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2014 (32 K€) **69**
M. Sadek ISMAIL 69

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2014 (30 K€) **71**
Dr Anne-Marie FRANÇOIS-BELLAN 71

Allocation de Recherche en Endocrinologie SFE 2014 (50 K€) **78**
Dr Pierre VAL 78

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2014 (42 K€) **80**
Dr Soazig LE PENNEC 80

Bourse de Master 2 SFE 2014 (32 K€) **82**
Mlle Hélène HOTH GUECHOT 82

Bourse de Master 2 SFE 2014 (32 K€) **86**
M. Simon TRAVERS 86

Bourse de Fin de thèse mutualisée H.A.C. Pharma & SFE 2014 (22 K€) **88**
Mlle Coralie DRELON 88

Editorial

La Société Française d'Endocrinologie (SFE) et ses partenaires industriels attribuent depuis des années des Bourses, Prix et Allocations de Recherche afin de récompenser les meilleurs projets et favoriser les efforts de recherche dans tous les domaines de l'Endocrinologie et des troubles métaboliques aussi bien dans ses aspects fondamentaux, que de recherche translationnelle ou clinique.

Je tiens ici à remercier le travail important effectué par les différents membres du *Conseil Scientifique Pérenne* et leurs *Présidents* respectifs antérieurs pour l'évaluation de toutes les demandes.

Pour la troisième année consécutive et afin de valoriser les actions soutenues par la SFE et les rendre plus visibles, la SFE propose une présentation brève des différents projets financés dans ce cadre.

Ce troisième livret inclut les Bourses, Prix et Allocations décernés lors des congrès annuels de la SFE, « CLERMONT-FERRAND 2011 », « TOULOUSE 2012 », « PARIS 2013 » et « LYON 2014 ».

Comme vous le verrez, le champ des sujets est large et la qualité des résultats est impressionnante. C'est le signe que notre spécialité est active et progresse.

Nous sommes très heureux de pouvoir contribuer, avec nos partenaires, à l'émergence des nouveaux talents et de nouvelles recherches relevant de l'Endocrinologie et du Métabolisme.

Nous souhaitons bonne chance à tous les contributeurs
dans leurs futures recherches.

Pr Françoise BORSON-CHAZOT,
Présidente du Conseil Scientifique Pérenne SFE 2016-2017

Bourses SFE « CLERMONT-FERRAND 2011 »

Bourse de Master 2 mutualisée Ipsen & Lilly 2011 (30 K€)

Mlle Cyrielle CAUSSY
Direction **Pr Philippe MOULIN**
INSERM U 1060, Fédération d'Endocrinologie, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron

miRNA et Régulation de la Lipoprotéine Lipase lors des hyperchylomicronémies (MIRACLE).

Le microARN miR-485-5p explique la fonctionnalité d'un polymorphisme de l'APOA5 étroitement associé à l'hypertriglycéridémie.

An APOA5 3'UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site.

Résumé

L'étude de l'implication potentielle des microARN dans la régulation de la triglycéridémie a conduit à étudier le polymorphisme c.*158C>T, localisé en région 3'UTR du gène APOA5, co-facteur de la LPL. Ce polymorphisme appartient à l'haplotype APOA5*2, fortement associé aux hypertriglycéridémies, sévères et modérées.

Une étude bio-informatique a permis d'identifier une création potentielle de site de liaison pour le miR-485-5p induite par l'allèle rare C du polymorphisme c.*158C>T. La fonctionnalité de cette interaction a été vérifiée in vitro. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec un vecteur contenant l'extrémité 3'UTR de l'APOA5 couplée à un gène rapporteur luciférase et avec un précurseur du miR-485-5p. L'activité luciférase de l'allèle C était significativement diminuée par rapport à l'allèle T. Ces résultats ont été confirmés dans des cellules HUH-7, exprimant de manière endogène le miR-485-5p. Enfin, la spécificité du miR-485-5p a été validée dans ce modèle par l'annulation de l'effet observé en présence d'un inhibiteur de miR-485-5p. Ainsi, le polymorphisme c.*158C>T crée un site de liaison illégitime fonctionnel pour le miR-485-5p.

Cette étude met en évidence un mécanisme original de la régulation de la triglycéridémie par les miRNA et permet de comprendre le rôle, jusqu'ici méconnu, d'un polymorphisme important de l'APOA5.

Abstract

The hypothesis of a potential microRNA involvement in plasma triglycerides regulation, led to focus on the polymorphism c.*158C>T, located in the 3'UTR of the APOA5 gene, co-factor of LPL. This polymorphism belongs to the haplotype APOA5*2, strongly associated with both severe and moderate hypertriglyceridemia.

Bioinformatic study have identified the creation of a potential miR-485-5p binding site in the mutant APOA5 3'UTR with the c.*158C allele.

The functionality of this interaction was verified in vitro. HEK293T cells were co-transfected with a plasmid containing the APOA5 3'UTR coupled with a luciferase reporter gene and a precursor of miR-485-5p. The C allele luciferase activity was significantly reduced compared to the T allele. These results were confirmed in HUH-7 cells, endogenously expressing the miR-485-5p. Finally, the specific miR-485-5p effect has been validated in this model by a complete inhibition in presence of miR-485-5p inhibitor. We demonstrated that the rare c.*158C APOA5 allele creates an illegitimate functional target site for miR-485-5p.

This study reveals a novel mechanism of plasma triglycerides regulation involving miRNA and explain the APOA5*2 polymorphism mechanism, misunderstood up to now.

Publication

Caussy C, Charrière S, Marçais C, Di Filippo M, Sassolas A, Delay M, Euthine V, Jalabert A, Lefai E, Rome S, Moulin P.
An APOA5 3' UTR variant associated with plasma triglycerides triggers APOA5 downregulation by creating a functional miR-485-5p binding site.
Am J Hum Genet. 2014, 94:129-34.

Rapport

Introduction :

Les travaux réalisés durant mon Master 2 Recherche, ont été consacrés à l'implication de microARN dans la régulation d'un haplotype particulier de l'APOA5 associé aux HTG modérées et sévères dont le mécanisme physiopathologique reste à ce jour non élucidé.

En effet, l'apolipoprotéine A5, découverte 2001 par Pennacchio et al. (1) est sécrétée par le foie, et stimule l'activité de la LPL. Plusieurs polymorphismes du gène APOA5 ont été associés aux HTG à la fois modérées et sévères, dans de nombreuses populations d'origine ethniques variées. Ces polymorphismes sont en fort déséquilibre de liaison et leur association définie plusieurs haplotypes. Parmi eux, deux sont fortement associés aux HTG : l'haplotype 3 (APOA5*3) et l'haplotype 2 (APOA5*2) (2).

L'haplotype 2 (APOA5*2) correspond à l'association de 4 polymorphismes ou SNP : SNP1, SNP2, -3A>G, -1131T>C avec une fréquence de d'environ 7% dans une population caucasienne (3). Contrairement à l'haplotype 3, l'analyse fonctionnelle des polymorphismes de l'haplotype 2 n'a pas permis d'élucider son mécanisme de régulation des TG responsable de son association aux HTG sévères et modérées. Cependant plusieurs travaux suggèrent une régulation post-transcriptionnelle puisqu'on ne retrouve pas d'altération de l'ARNm chez les porteurs de l'haplotype (4,5) mais une diminution de la protéine apoAV (5-8). Certains travaux évoquent le rôle possible du polymorphisme SNP1 localisé en 3'UTR sur la stabilité des ARNm de l'APOA5 (9).

Hypothèse :

Ainsi, ces données suggèrent que l'haplotype APOA5*2 régulerait les TG en modifiant l'expression d'APOA5 de manière post-transcriptionnelle par un mécanisme faisant intervenir le SNP1 localisée en région 3'UTR. Nous avons émis l'hypothèse que le polymorphisme SNP1 d'APOA5*2 pourrait induire la création d'un site de liaison de miRNA responsable d'une diminution de l'expression d'APOA5 favorisant la survenue d'une HTG sévère.

Méthode et résultats :

Dans une première étape, **l'étude bio-informatique** d'une création de site de liaison de miRNA induite par le SNP1 de APOA5*2 a permis d'identifier 3 miRNAs candidats : *miR-485-5p, miR-1255a, miR-3188*.

Dans une deuxième étape nous avons vérifié la **fonctionnalité de la création du site de liaison** de *miR-485-5p* potentiellement induite par le SNP1 dans un modèle in vitro. Un plasmide contenant la région 3'UTR d'APOA5 (sauvage SNP1 allèle T ou muté SNP1 allèle C) couplé à un gène rapporteur de luciférase a été co-transfecté avec un précurseur de *miR-485-5p* ou un *miR-contrôle* dans des HEK293T. L'expression des 2 allèles a été évaluée par mesure de l'activité luciférase après lyse cellulaire. Nous avons montré une diminution significative de l'activité luciférase (-35+/-6%, $p<0.001$) lorsque l'allèle muté (SNP1-allèle C) est en présence de *miR-485-5p* comparée à un *miR-contrôle.* **Fig.1A.**

Enfin, après avoir vérifié l'expression des miARN dans le foie humain et cellules hépatique HUH7 par RT-qPCR, nous avons étudié la fonctionnalité du miRNA endogènes sur le SNP1 dans des cellules hépatiques type HUH7 par transfection du vecteur 3'UTR d'APOA5 couplé à un gène rapporteur luciférase en présence d'un anti-miR-spécifique ou un inhibiteur négatif. Nous observons une diminution significative d'activité luciférase de 43% (+/-16%, $p<0.01$) de l'allèle muté (Allèle C) par rapport à l'allèle sauvage (Allèle T) qui est complètement inhibée en présence de *l'anti-miR485-5p* **Fig.1B,C**.

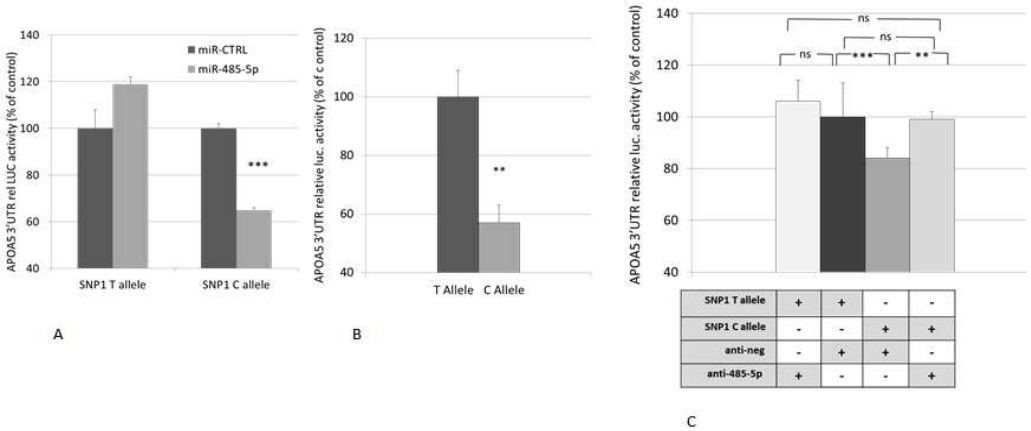


Figure 1. *Activité luciférase (% par rapport au contrôle) de la région 3'UTR de APOA5 sauvage (SNP1 T allele) ou muté (SNP1 C allele)* ***A.*** *co-transfecté avec un précurseur de miR-458-5p ou miR-ccontrôle (miR-CTRL) dans des HEK293T.* ***B.*** *transfectés dans des HUH7 sous l'action endogène de miR-485-5p* ***C.*** *transfecté dans des HUH7 en présence d'un inhibiteur de miR-485-5p (anti-485-5p) ou d'un inhibiteur négatif (anti-neg).*

Conclusion :

Le SNP1 d'APOA5 crée un site de liaison illégitime pour miR-485-5p dont la fonctionnalité est confirmée in vitro. Ce polymorphisme appartient à l'haplotype 2 d'APOA5, décrit comme diminuant l'expression post-transcriptionnelle d'APOA5 et les concentrations plasmatiques d'apoAV in vivo mais dont le mécanisme de régulation des triglycérides était inconnu. Ainsi nos résultats montrent que l'interaction entre miR-485-5p et le SNP1 diminuerait l'expression d'APOA5, correspondant aux effets de l'haplotype 2 et expliquant l'association étroite avec les hypertriglycéridémies.

Bibliographie

1. Pennacchio LA et al. Science. 2001 oct 5;294(5540):169-73.

2. Johansen CT et al. J. Lipid Res. 2011 févr;52(2):189-206.

3. Talmud PJ et al. Hum. Mol. Genet. 2002 nov 15;11(24):3039-46.

4. Ahituv N et al. Genomics. 2007 déc;90(6):674-9.

5. Hahne P et al. J. Intern. Med. 2008 nov;264(5):452-62.

6. Ishihara M et al. J. Lipid Res. 2005 sept;46(9):2015-

7. Dallinga-Thie GM et al. Diabetologia. 2006 juill;49(7):1505-11.

8. Vaessen SFC et al. J. Lipid Res. 2006 sept;47(9):2064-70.

9. Palmen J et al. Biochim. Biophys. Acta. 2008 août;1782(7-8):447-52.

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2011 (30 K€)

Dr Catherine DODE
Direction elle-même
INSERM U 1016, Département de génétique et développement, Institut Cochin, Paris

Diagnostic moléculaire d'une maladie génétiquement hétérogène par la technique de séquençage ciblé à haut-débit : application au syndrome de Kallmann.

Résumé

L'hétérogénéité génétique des hypogonadismes hypogonadotropes syndromique et non-syndromique est une difficulté majeure pour effectuer le diagnostic moléculaire en routine hospitalière. La réduction importante des coûts et les améliorations techniques des nouvelles techniques de séquençage nous ont permis son utilisation à des fins cliniques. Nous effectuons actuellement le séquençage des régions codantes des 16 gènes (10 gènes KS et 6 gènes HH) dont les mutations sont connues comme étant responsables de ces pathologies en séquençage NGS (technologie Ion Torrent). A ce jour, des résultats ont été rendus chez 300 malades. Nous avons observé notamment une forte proportion de malades avec mutation CHD7, principalement des mutations faux-sens, montrant la nécessité de d'étudier ce gène, dont le mode de transmission est autosomique dominant, avant induction de la fertilité chez les malades.

Abstract

The genetic heterogeneity of syndromic and non-syndromic hypogonadotropic hypogonadism is an obstacle to obtaining a molecular diagnosis in clinical practice. Dramatic costs reduction and comprehensiveness in next generation sequencing have enabled the use of this technology for **routine applications**. The genetic variability of Kallmann syndrome (KS) and various modes of inheritance including the oligogenic one, drive to analysis in a same way the 10 KS genes and the 6 HH genes representing 136 exons/patient. We set up the targeted sequencing of the coding exons of the 16 KS and HH genes known so far using Ion Torrent technology in the routine hospital laboratory. At this time 300 patients were analyzed using this technology. We observed a high proportion of *CHD7* mutations, mainly missense mutations, among KS patients which confirm the requirement of the seeking mutations in this gene before induction of fertility because of the autosomal dominant mode of disease transmission to the offspring.

Rapport

Le but de ce projet était d'utiliser les nouvelles techniques de séquençage NGS pour la recherche de mutations chez des individus atteints du syndrome de Kallmann (KS) qui désirent avoir une descendance, et de pouvoir ainsi améliorer le conseil génétique avant l'induction de fertilité chez ces patients.

La variabilité génétique importante de KS, combinée à l'existence des modes de transmission digénique/oligogénique, nous conduit à rechercher en parallèle des mutations dans les gènes dont les mutations sont responsables d'hypogonadisme hypogonadotrope syndromique et non syndromique. Seize gènes sont potentiellement responsables, ce qui rend impossible l'utilisation de la technique classique de Sanger.

Depuis 2012, l'hôpital (APHP) et l'institut Cochin (Inserm/CNRS) se sont dotés d'une plateforme de séquençage NGS constituée actuellement de 4 séquenceurs : 2 Ion Torrent (séquençage ciblé) et 2 Ion Proton (exome, RNAseq). Le financement apporté par le prix Pfizer nous a permis de faire des mises au point indispensables avant le transfert en routine hospitalière de cette nouvelle technologie.

Nous offrons actuellement dans le laboratoire hospitalier et depuis le début de l'année 2013, le séquençage des exons codants et de leurs bordures introniquesdes 16 gènes actuellement connus, dont les mutations sont responsables d'hypogonadisme hypogonadotrope syndromique (*KAL1, FGFR1, FGF8, CHD7, SEMA3A, SOX10, PROKR2, PROK2, WDR11, HS6ST1*) et non syndromique (*GNRHR, GNRH1, KISS1R, KISS1, TACR3, TAC3*).Cette technique de séquençage étant quantitative, nous permet de rechercher des délétions ou insertions hétérozygote de plusieurs amplicons. Là aussi le financement obtenu nous a permis de faire des essais chez des malades porteurs de délétion de différentes tailles déjà connues. Nous pensons qu'à terme le séquençage NGS remplacera le séquençage de Sanger et les techniques de dosage génique type MLPA (pour les petites insertions/délétions) ou CGH array (pour les grandes insertions/délétions).

Plus de 300 résultats ont été transmis aux cliniciens demandeurs de ces analyses.

Cette étude nous a permis de constater la présence d'un taux élevé de mutations notamment faux-sens dans *CHD7*. Les mutations, principalement non-sens et de novo, de ce gène sont connues pour être responsables de syndrome CHARGE. Nous montrons dans ce travail que des mutations évaluées comme délétères par différents logiciels (SIFT, PolyPhen-2….) peuvent être responsables de syndrome de Kallmann de transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète. Ce travail va être très prochainement soumis à la revue JCEM (Marcos S, Sarfati J *et al*. Greater prevalence of *CHD7* missense mutations versus truncating mutations in patients presenting with Kallmann syndrome than in typical CHARGE patients). Le séquençage en parallèle de ces 16 gènes nous a permis d'observer des cas d'oligogénismes venant conforter cette hypothèse formulée précédemment.

Nous avons aussi réalisé un design de gènes candidats pour des maladies Kallmann ne possédant pas de mutation dans les 16 gènes testés. Le financement nous a permis de commander le panel d'oligonucléotides et les kits de séquençage nécessaire pour d'étudier environ 150 malades. Nous avons trouvé plusieurs mutations dans des gènes dont nous étudions l'expression dans le système olfactif au cours de l'embryogénèse. Pour l'un d'entre eux un modèle de murin est en en cours de réalisation.

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2011 (28 K€)

Dr Anne Lise LECOQ
Codirection **Pr Philippe CHANSON & Dr Peter KAMENICKY**
INSERM U 693, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Implications d'AIP (Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein) dans la tumorigénèse des adénomes hypophysaires.

Résumé

La physiopathologie des adénomes hypophysaires est mal connue. Récemment, des mutations du gène *AIP* (*Aryl-hydrocarbon receptor Interacting Protein*) ont été décrites comme prédisposant aux adénomes hypophysaires familiaux et sporadiques, sans que l'on en comprenne le mécanisme moléculaire. L'objectif du travail était de préciser le rôle d'AIP dans la tumorigenèse hypophysaire en étudiant l'impact fonctionnel des mutations d'*AIP* sur la signalisation d'AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*), le principal partenaire moléculaire d'AIP, connu pour son potentiel cancérogène.

Nous avons observé une diminution de 50% de l'expression protéique d'*AIP* dans les fibroblastes de patients porteurs de mutations hétérozygotes d'*AIP* par rapport aux fibroblastes de patients témoins. Ceci s'accompagne de variations significatives de l'expression de gènes cibles classiques d'AhR avant et après stimulation des cellules par la kynurénine. Dans les cellules hypophysaires GH3, la surexpression de la protéine AIP mutée aboutit à une augmentation de 50% des transcrits de gènes cibles d'AhR.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la modulation de l'activité transcriptionnelle d'AhR par les mutations d'*AIP* pourrait être impliquée dans la tumorigenèse hypophysaire.

Abstract

Germline mutations in the Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein (*AIP*) occur in approximately 20% of patients with familial isolated pituitary adenomas and 4% of patients with sporadic pituitary adenomas. The molecular mechanisms by which *AIP* mutations lead to pituitary tumorigenesis are unclear. The best-known interacting partner of AIP is the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), a transcription factor mediating the effects of xenobiotics, implicated in carcinogenesis. The aim of this study was to evaluate the impact of *AIP* mutations on AhR signaling pathway.

We used fibroblasts from patients with pituitary adenomas, harboring heterozygous *AIP* mutations. We observed a 50% decrease of AIP protein level in the mutated cells compared to fibroblasts of healthy subjects. Gene expression studies demonstrated significant variations in the basal and kynurenine-induced expression of AhR target genes in fibroblasts bearing *AIP* mutations disrupting AhR interaction and in pituitary GH3 cells overexpressing *AIP* mutants.

In sum, we show in human fibroblasts bearing heterozygous *AIP* mutations and in transfected pituitary GH3 cells, that *AIP* mutations affect AhR transcriptional activity. Altered AhR signaling could contribute to the tumorigenic potential of *AIP* mutations.

Publication

Lecoq AL, Kamenický P, Guiochon-Mantel A, Chanson P
Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas: is there a place for AIP, MEN1 and other genes screening.
Nature Reviews Endocrinology. 2015, 11:43-54

Rapport

Les mutations du gène *AIP* sont responsables d'une prédisposition génétique aux adénomes hypophysaires. Plus de 50 mutations ont été identifiées dans 20% des FIPA (*Familial Isolated Pituitary Adenoma*) et dans 3% des cas sporadiques.

Les études *in vitro* et *in vivo* sont en faveur d'un rôle de gène suppresseur de tumeur pour *AIP* mais les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la tumorigenèse hypophysaire ne sont pas encore élucidés. Plusieurs arguments plaident en faveur de l'hypothèse selon laquelle le potentiel tumorigène d'AIP reposerait sur son interaction avec son partenaire moléculaire principal, le récepteur de la dioxine AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*). AIP est connu essentiellement pour être une protéine chaperonne d'AhR, un facteur de transcription ligand-dépendant jouant un rôle dans un certain nombre de processus carcinogéniques, notamment dans la tumorigenèse gliale *via* son ligand endogène, la kynurénine. Les études épidémiologiques menées après l'accident industriel de Seveso montrent une tendance à l'augmentation du risque de survenue d'adénomes hypophysaires qui pourrait être induite par la pollution environnementale par la dioxine. Enfin, la grande majorité des mutations altère la région C-terminale d'AIP qui interagit avec AhR. Par ailleurs, des travaux récents montrent qu'AIP est également capable de moduler la voie de signalisation de l'AMP cyclique (AMPc). Cette voie joue un rôle important dans la physiopathologie des adénomes hypophysaires, comme le suggère la présence de mutations somatiques de l'oncogène *GNAS* (codant pour la sous-unité activatrice α des protéines G) dans environ 40% des adénomes somatotropes.

L'objectif de notre travail était d'étudier les conséquences des mutations d'*AIP* sur l'activité transcriptionnelle d'AhR. En effet, un retentissement des mutations d'*AIP* sur le profil d'expression des gènes cibles d'AhR permettrait de mieux comprendre le potentiel tumorigène de ces mutations dans les cellules somatotropes.

Le service d'Endocrinologie et des Maladies de la Reproduction du CHU de Bicêtre suit une des plus grandes cohortes de patients atteints d'acromégalie en France et en Europe (plus de 300 patients). Depuis 2008, tous les patients présentant un adénome hypophysaire et suivis dans le Service se sont vus proposer une analyse génétique. A l'heure actuelle, plus de 750 patients porteurs d'adénomes apparemment sporadiques ont été génotypés.

Parmi les 28 patients mutés pour *AIP*, nous avons choisi quatre sujets porteurs, à l'état hétérozygote, des mutations suivantes, localisées dans diverses régions du gène *AIP* et ayant donc potentiellement des conséquences fonctionnelles différentes : sujet P1: c.2T>C, p.Met1, sujet P2: c.350delG, p.Gly117AlafsX39, sujet P3: c.805-826, p.F269_H275dup, sujet P4: c.910C>T, p.Arg304X. Nous avons établi des cultures de fibroblastes cutanés issus de ces quatre patients et de sujets témoins.

Dans ces modèles cellulaires, nous avons observé une diminution de 50% de l'expression protéique d'*AIP* dans les fibroblastes des patients mutés par rapport aux fibroblastes des patients témoins. Ceci s'accompagne de variations significatives de l'expression de gènes cibles classiques d'AhR avant et après stimulation des cellules par la kynurénine. Ainsi, les mutations d'*AIP* abolissant l'interaction avec AhR (p.G117AfsX39, p.R304X) conduisent à une diminution de 50% de l'expression de *CYP1B1* et à une augmentation de 50% des transcrits de *TIPARP*, alors que l'expression d'AhR et de son partenaire transcriptionnel ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) n'est pas modifiée. Ces résultats indiquent que les mutations hétérozygotes d'*AIP* altèrent l'activité transcriptionnelle d'AhR.

Dans la suite de notre travail, il nous a semblé indispensable de confirmer nos observations dans un modèle cellulaire plus adapté. Nous avons choisi la lignée hypophysaire GH3 sécrétant l'hormone de croissance (GH) et la prolactine (PRL), développée chez le rat. Ce modèle nous semble pertinent puisque 1) les deux principaux types tumoraux rencontrés en cas de mutation d'*AIP* sont les adénomes à GH et à prolactine et 2) les cellules GH3 ont été utilisées avec succès par d'autres équipes pour les études d'AIP. Nos premières expériences dans les cellules GH3 montrent que la surexpression de la protéine AIP mutée aboutit à une augmentation de 50% des transcrits de gènes cibles d'AhR (*CYP1B1*) en l'absence et en présence de la kynurénine. Nous analysons actuellement l'expression de ces gènes cibles après contre-expression transitoire d'*AIP* par une stratégie d'interférence ARN (siRNA).

En conclusion, nos résultats suggèrent que la modulation de l'activité transcriptionnelle d'AhR par les mutations d'*AIP* pourrait être impliquée dans la tumorigenèse hypophysaire. Les gènes cibles d'AhR dans l'hypophyse, dont l'expression est modifiée par les mutations d'*AIP*, pourraient représenter de nouveaux candidats impliqués dans la physiopathologie des FIPA non mutés pour *AIP*.

Prix de Recherche Clinique Sanofi Aventis 2011 (28 K€)

Dr Emmanuelle MOTTE-SIGNORET
Direction **Pr Pierre BOUGNÈRES & Dr Caroline SILVE**
INSERM U 986, Hôpital de Bicêtre, Université Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Mechanisms whereby a primary resistance to cAMP dependent signalling pathway lead to insulin resistance in vivo and in vitro studies.

Absence de résistance rénale à la PTH chez les patients avec acrodysostose par mutation PDE4D : la régulation de la voie de l'AMPc par les PDE4 est tissu et agoniste – spécifique.

Absence of renal resistance to PTH in PDE4D-mutated acrodysostosis patients: regulation of cAMP/PKA pathway by PDE4 may be tissue and agonist-specific.

Résumé

Contexte

L'acrodysostose est une maladie rare caractérisée par une dysplasie squelettique associant petite taille, brachydactylie sévère, dysostose faciale et hypoplasie nasale. Ce phénotype osseux est similaire à l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright de la PHP 1a, due à des mutations inactivatrices de GNAS, le gène codant pour Gsalpha. Des mutations dans deux gènes ont été identifiées comme responsable d'acrodysostose : PRKAR1A, codant pour une sous - unité régulatrice de la PKA et PDE4D, codant pour une isoforme de la phosphodiestérase 4.

Les mutations dans ces 3 gènes sont à l'origine d'un défaut dans la voie de signalisation de l'AMPc responsable de résistances hormonales. Cependant, si ces 3 pathologie partagent une dysplasie squelettique en lien avec une résistance osseuse au PTHrp, seuls les patients avec PHP 1a ou acrodysostose PRKAR1a présentent une résistance rénale à la PTH avec hypocalcémie, hyperphosphatémie et PTH élevée. Notre hypothèse est que la signalisalon rénale de la PTH n'est pas ou peu régulée par la PDE4D.

Matériels et méthodes

Nous avons comparé l'effet de l'inhibition des PDE4 (+/ - rolipram 50µM) après stimulation par PTH (10µM) vs PGE2 (10 µM) dans une lignée cellulaire rénale (HEK293 avec transfection stable du PTH1R) et des fibroblastes en mesurant la production d'AMPc (ELISA et BRET - sensor), la phosphorylation de CREB (western - blot) et l'activité PKA (rapporteur CRE - luciférase).

Résultats

1) Mesure de la production d'AMPc : L'inhibition des PDE4 augmente significativement plus la production d'AMPc après stimulation par la PGE2 dans la lignée rénale par la PTH dans les fibroblastes (état basal : 1,29; +PGE2: 7,82; +PTH: 248,10 fmol/ng de protéine; p<0,0001 and p=0,0002 respectivement - PGE2 +/- rolipram 7,82 vs 176,8; p<0,0001 ; PTH +/- rolipram 248,10 vs 552,20; p=0,15).
2) Mesure de la phosphorylation de CREB : L'inhibition des PDE4 a tendance à augmenter plus la phosphorylation de CREB après stimulation par la PGE2 dans la lignée rénale par la PTH dans les fibroblastes
3) Mesure de l'activité PKA : L'inhibition des PDE4 augmente significativement plus l'activité PKA après stimulation par la PGE2 que par la PTH dans la lignée rénale (facteur d'augmentation PGE2 +/- rolipram 54 vs 174 p=0.03 ; PTH +/- rolipram 92 vs 138 p=0.09, delta +/- rolipram PGE2 vs PTH 3,36 vs 1,57 p<0,0001).

Conclusions

1) La régulation de la signalisation AMPc/PKA par les PDE4 est agoniste-spécifique : dans une lignée cellulaire rénale, l'inhibition des PDE4 augmente la réponse cellulaire à la PGE2, pas à la PTH.
2) La régulation de la signalisation PTH par les PDE4 est tissu-spécifique : dans les fibroblastes, dérivés du même feuillet que les ostéoblastes, l'effet inverse est observé.

Ces résultats pourraient expliquer l'absence de résistance rénale à la PTH malgré la résistance osseuse au PTHrp chez les patients avec acrodysostose par mutations de PDE4D.

Abstract

Context

PRKAR1A and PDE4D mutations causing acrodysostosis and GNAS mutations causing pseudohypoparathyroidism 1a are responsible for defect in cAMP-PKA signaling. These disorders present a similar skeletal dysplasia due to PTHrP resistance, but distinct resistance to hormones signaling through cAMP: renal resistance to PTH is present in patients with PRKAR1A and GNAS, but not PDE4D mutations. We hypothesized that PDE4D may not regulate renal cAMP response to PTH.

Methods

We used the renal HEK293 cells stably expressing PTH1R and PDE4D. We stimulated them by PTH (10µM) and PGE2 (10µM) in absence or presence of rolipram (50 µM), a specific PDE4 inhibitor, and measured intracellular cAMP production and PKA activity (cre-luciferase reporter assay).

Results

1) cAMP production : PGE2 and PTH both increased cAMP levels (baseline: 1,29; +PGE2: 7,82; +PTH: 248,10 fmol/ng of protein; p<0,0001 and p=0,0002 respectively). Rolipram significantly potentiated stimulation of cAMP production by PGE2 (7,82 vs 176,8; p<0,0001) but not by PTH (248,10 vs 552,20; p=0,15).
2) CREB phosphorylation : adjunction of rolipram seems to improve the stimulation with PGE2, not with PTH in HEK. On contrary in fibroblasts, adjunction of rolipram seems to improve the stimulation with PGE2 to a lesser extent than with PTH.
3) PKA activity: Similarly PGE2 and PTH both increased significantly cre-luciferase activity (fold-increase (FI) 54,44 and 92,05 respectively). As observed for cAMP production, rolipram significantly potentiated stimulation of cre-luciferase activity by PGE2 but not by PTH (FI 173,50; p=0,03 vs FI 137,8; p=0,09 respectively; delta FI 3,36 vs 1,57 p<0,0001).

Conclusions

PDE4 involvement in cAMP-PKA signalling is agonist-specific: in a renal cell line, inhibition of PDE4 increases cellular response to PGE2, not to PTH

PDE4 involvement in PTH signalling is tissue-specific: in contrast, in skin fibroblasts, inhibition of PDE4 increases cellular response to PTH. Interestingly, fibroblasts are derived from the same cellular lineage than osteoblasts.

These results may explain the absence of renal PTH resistance despite bone resistance to PTHrp in PDE4D mutated acrodysostosis patients.

Prix de Recherche Clinique en Thyroïdologie Merck Serono 2011 (15 K€)

Pr Lionel GROUSSIN-ROUILLER
Direction lui-même
INSERM U 567 - CNRS UMR 8104, Tumeurs Endocrines et Signalisation, Institut Cochin, Paris

Facteurs pronostiques des cancers thyroïdiens papillaires.

Etude du rôle du récepteur à activité tyrosine kinase c-MET dans les cancers thyroïdiens différenciés et anaplasiques.

Rapport

L'activation de la voie des MAPK (Mitogen Activating Protein Kinases) est un événement central dans la carcinogénèse thyroïdienne, notamment dans les cancers différenciés de type papillaire. Ainsi, une anomalie moléculaire impliquant un acteur de cette voie peut être identifiée dans plus de 70% des cas (réarrangement chromosomique de type RET/PTC, mutations ponctuelles activatrices des oncogènes Ras et BRAF…), de manière mutuellement exclusive (une anomalie au sein d'un cancer donné). Il existe par ailleurs d'autres mécanismes d'activation de la voie des MAPK, comme par exemple la surexpression de récepteurs à activité tyrosine kinase. Ainsi, c-MET (Cellular and Mesenchymal Epithelial Factor) fréquemment exprimé dans de nombreux cancers, semble également impliqué dans les cancers thyroïdiens. Ce récepteur signalise par de multiples voies dont la voie des MAPK, et demeure associé à la prolifération, la survie, l'invasion et la motilité cellulaires.

L'objectif de notre travail a été de caractériser l'expression de la protéine c-MET dans les cancers thyroïdiens et de vérifier s'il existe une relation entre son expression et l'anomalie moléculaire (RET/PTC, RAS ou $BRAF^{V600E}$) activant la voie des MAPK, présente au sein d'un cancer donné. Nous avons également étudié le mécanisme de sa surexpression. Nous avons ensuite dans une lignée de cancer thyroïdien anaplasique surexprimant c-MET étudié son rôle dans la prolifération et la survie.

Nous confirmons en RT-qPCR la surexpression systématique de l'ARNm de c-MET dans 35 cancers de la thyroïde par rapport au tissu sain apparié, avec un effet plus marqué dans les tumeurs mutées BRAF. Sur cette petite série de cancers, nous n'avons pas mis en évidence de rôle pronostique péjoratif. Après étude par PCR et hybridation in situ en fluorescence (FISH), nous démontrons que la surexpression du gène *MET* n'est le plus souvent pas liée à une amplification génique dans une série de 11 lignées étudiées. Toutefois, de façon très originale une lignée était porteuse d'une amplification génique majeure de c-MET (plus de 20 copies du gène). Une évaluation de la viabilité cellulaire a permis de montrer que cette amplification génique confère une sensibilité particulière de cette lignée pour de faibles doses (effet cytostatique) d'un inhibiteur de tyrosine kinase anti c-MET (PHA665752), avec une inhibition des voies MAPK et PI3K. Un effet cytolytique n'apparaissait que pour des doses importantes de cet inhibiteur.

Nos résultats confirment la surexpression de c-MET dans les cancers thyroïdiens. Si plusieurs études associent c-MET à un mauvais pronostic dans les cancers de la thyroïde, ceci n'a pas été confirmé dans notre série, où les cancers sont tous de bon pronostic. Nous décrivons également pour la première fois une lignée cellulaire de cancer thyroïdien avec très forte amplification de *MET*. La nécessité pour cette lignée d'utiliser un inhibiteur de c-MET à fortes doses pourrait être expliquée par l'activation d'autres voies de survie et de prolifération que les voies MAPK et AKT. La recherche de ces voies alternatives permettrait de découvrir des traitements potentiellement efficaces dans les cancers réfractaires.

Résumé communication

Amplification du gène *MET* dans une lignée de cancer thyroïdien anaplasique, associée à un effet cytostatique de l'inhibiteur de c-MET PHA665752.

Cyril GARCIA, Aziza LEBBAR, Camille BUFFET, Marthe RIZK, Karine PERLEMOINE, Stéphanie RODRIGUEZ, Jérôme BERTHERAT, Lionel GROUSSIN.

Objectif : Une amplification du gène *MET* codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase Cellular Mesenchymal and Epithelial Transition Factor (c-MET) est estimée à 11% des cancers thyroïdiens anaplasiques. Notre objectif était de disposer d'un modèle d'amplification de *MET* afin de tester l'efficacité d'inhibiteurs de cet oncogène dans ce type de cancer.

Matériels et méthodes : Nous avons testé l'expression de c-MET dans 11 lignées cellulaires humaines dérivant de cancers thyroïdiens.

Résultats : Nous avons identifié une lignée avec une forte surexpression de c-MET, dans sa forme active phosphorylée. Le niveau anormal d'expression est du à une amplification de *MET* (>20 copies), confirmée en FISH. Nous avons montré l'effet antiprolifératif d'un inhibiteur de c-MET, le PHA665752, par une étude de viabilité cellulaire en MTT et par cytométrie de flux. Le PHA665752 inhibe plusieurs voies de signalisation dans cette lignée, avec pour conséquence un rôle cytostatique, malgré une IC50 élevée (4,1µM).

Discussion : Cette étude est la première à avoir caractérisé une amplification de c-MET au sein d'une lignée de cancer thyroïdien anaplasique. Si l'amplification de c-MET est associée classiquement à une grande sensibilité aux inhibiteurs de c-MET dans différents modèles de cancer non-thyroïdiens, nous n'avons pas constaté de rôle cytolytique du PHA665752 pour cette lignée. En revanche dès la faible dose de 10nM un effet cytostatique était constaté. Ceci ouvre des perspectives thérapeutiques en suggérant une recherche systématique d'amplification de c-MET dans les cancers thyroïdiens anaplasiques.

Prix de Recherche Clinique Genzyme 2011 (10 K€)

Pr Laurence LEENHARDT, en Collaboration avec **Dr Stéphane BARDET**
Service de Médecine Nucléaire, CLCC Francois Baclesse (CFB), Caen & Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris

Intérêt diagnostique de l'analyse moléculaire cytologique (AMC) et de l'élastographie par ondes de cisaillement ShearWave (SWE) chez les patients porteurs d'un nodule thyroïdien à cytologie indéterminée : Etude de faisabilité.

Diagnostic accuracy of cytological molecular analysis combined to ShearWave Elastography in patients with cytologically indeterminate nodules: a feasibility study.

Résumé

Les nodules thyroïdiens sont fréquents chez l'adulte¨ mais seulement une faible proportion d'entre eux correspond à un cancer. La cytologie à l'aiguille fine (FNA) fournit un diagnostic bénin ou malin dans la majorité des cas mais 25% de ces nodules correspondent à une cytologie indéterminée. Les patients porteurs d'un nodule à cytologie indéterminée sont souvent opérés alors que la majorité de ces nodules se révèlent bénins. L'échographie avec élastographique donne des résultats variables en terme de malignité. Par ailleurs, l'utilité clinique des tests moléculaires sur cytologie a été récemment soulignée.

Matériels et méthodes

120 patients seront inclus dans l'étude. Ils présentent au moins un nodule thyroïdien, bénéficient d'une cytoponction écho guidée selon les recommandations et d'un résultat en faveur d'une cytologie indéterminée selon la classification de Bethesda. La combinaison de l'elastographie ShearWave et des tests moléculaires sera évaluée. Tous les patients seront opérés. Des signatures de MicroRNA (MiR) sont proposées pour différencier les cancers thyroïdiens des nodules bénins. Nous avons sélectionnés quelques miRs afin d'examiner l'utilité de ces miRs pour compléter le diagnostic cytologique dans ces cas de cytologies indéterminées.

Abstract

Thyroid nodules are common in adults but only a small fraction of them is malignant. Fine - needle aspiration FNA cytology provides a definitive diagnosis of benign or malignant disease in many cases, whereas about 25% of nodules are indeterminate. Patients with cytologically indeterminate nodules are often referred for diagnostic surgery though most of these nodules prove to be benign. Neck ultrasonography with elastography has varied results in predicting malignancy. Moreover, the clinical utility of molecular testing of thyroid FNA samples with indeterminate cytology was recently highlighted.

OBJECTIVE

The objective of the investigation is to study the diagnostic accuracy of the combination of ultrasonography with elastography and molecular testing in patients with cytologically indeterminate nodules.

MATERIALS AND METHODS

120 patients will be included in this study. They had at least one thyroid nodule, underwent ultrasound guided FNA according to the current guidelines and had indeterminate cytology according to the Bethesda system. The combination of ShearWave elastography scoring and molecular testing will be evaluated. All patients will be operated on. MicroRNA (miR) expression signatures are proposed to be able to differentiate thyroid cancer from benign thyroid lesions. We selected some miRs to examine the potential use of miRs to supplement diagnostic cytology in cases designated as indeterminate cytological nodules.

Rapport

1. Résumé du projet

Justification

Si les nodules thyroïdiens sont fréquents, ils sont rarement malins (<10%). Actuellement, le diagnostic repose principalement sur la cytoponction du nodule dont la sensibilité (54-90%) et la spécificité (60- 98%) sont correctes, mais pas excellentes. En particulier, la cytologie ne permet pas de trancher entre nodule bénin ou malin lorsqu'elle est classée indéterminée (CI) (Bethesda 2008). Dans cette situation (25% des cas), la chirurgie est souvent recommandée même si le risque de cancer est variable (5 à 75% selon le sous type de CI). Des mutations somatiques de certains gènes sont souvent présentes dans les cancers thyroïdiens (BRAF et RAS), ainsi que des réarrangements génomiques (RET/PTC, PAX8/PPARγ). Plusieurs études récentes ont montré que la recherche d'un panel de mutations dans les produits de cytoponction (analyse moléculaire cytologique [AMC]) améliorait le diagnostic préopératoire des nodules thyroïdiens, notamment ceux à CI. Ces techniques de biologie moléculaire sont en place au Centre François Baclesse (CFB) depuis novembre 2009 (Etude FNAC, n°ID-RCB: 2009-A00834-53). L'élastographie par ondes de cisaillement ou ShearWave (SWE) (Aixplorer, Supersonic Imagine), autre technique récente qui quantifie l'élasticité d'un tissu (kPa), permet aussi de distinguer les nodules bénins des cancers, en particulier lorsqu'elle est combinée à l'échographie standard (ES). A ce jour, aucune étude n'a comparé les performances de l'AMC et de l'élastographie SWE, en particulier chez des patients porteurs d'un nodule à CI. L'hypothèse de recherche est que l'analyse moléculaire cytologique (AMC) et l'élastographie SWE permettront de mieux identifier les nodules à risque de cancer parmi ceux ayant une CI.

Objectifs

Nous proposons donc une étude de faisabilité dont l'objectif principal est d'évaluer les performances diagnostiques de l'AMC et de l'élastographie SWE chez des patients présentant un nodule thyroïdien à CI en prenant comme référence l'histologie du nodule. L'étude comprend plusieurs objectifs secondaires :

- Pour l'élastographie SWE, valider les seuils de décision pour les paramètres d'élasticité des nodules thyroïdiens, et évaluer les performances diagnostiques de l'élastographie SWE combinée à celles de l'échographie standard.
- Etablir un score diagnostique combiné des résultats de l'élastographie, de l'échographie standard et de l'analyse moléculaire.

Plusieurs volets ancillaires ont également été définis :

- Etude des microARN (miRNA) sur produits de cytoponction (collaboration EA 3143, CHU Angers)
- Détermination d'une signature moléculaire (collaboration Diaxonhit)
- Etudes de reproductibilité élastographique et de traitement du signal élastographique
- L'essai mis en oeuvre est une étude prospective d'intérêt diagnostique, multicentrique, non randomisé, en ouvert. Il est prévu d'inclure 120 patients.

Résultats attendus

Les retombées attendues sont doubles :

1- sur le plan individuel, éviter une chirurgie thyroïdienne aux patients à faible risque de cancer

2- pour la collectivité, réduire la proportion de chirurgies thyroïdiennes chez les patients ayant un nodule bénin, et le coût induit par ces interventions.

2. Phase d'ouverture de l'étude

Le protocole a reçu les autorisations réglementaires au cours du 1er trimestre 2013 (le 05/02/13 pour le CPP Nord-Ouest III le 19/10/2012 et le 14/02/2013 pour l'ANSM). La mise en oeuvre de cette étude de faisabilité visant à évaluer les performances de l'AMC et de l'élastographie SWE chez des patients porteurs d'un nodule thyroïdien à cytologie indéterminée a nécessité l'implication de plusieurs partenaires. Le protocole finalisé a été élaboré à l'issue de plusieurs réunions de travail avec les différents acteurs, de façon à définir tout particulièrement :

- le circuit des patients éligibles au protocole SWEETMAC : proposition de l'étude, confirmation de l'éligibilité, organisation des rendez-vous pour l'examen élastographique et la cytoponction à visée moléculaire, en fonction de la date de chirurgie.

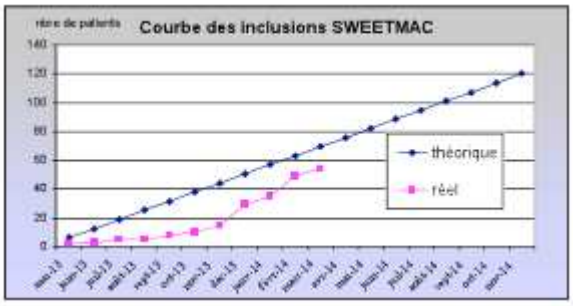
- l'organisation du circuit de relecture des cytologies indéterminées (ayant permis de poser l'indication chirurgicale du nodule thyroïdien) pour valider l'éligibilité du patient et confirmer la sous-classe cytologique indéterminée. Cette relecture est faite par un cytologiste appartenant à l'autre site (Caen ou la Pitié-Salpétrière) qui n'a pas connaissance du sous-type cytologique identifié en première lecture, dans un délai maximal de 2 semaines.
- le circuit des produits de cytoponction à visée moléculaire, depuis la congélation à – 20°C sur site dès réalisation de la cytoponction, la centralisation des échantillons, avec le soutien de la société Diaxhonit, pour l'extraction des acides nucléiques puis les analyses (analyse moléculaire cytologique, analyse transcriptomique, analyse des miRNA)
- les modalités pour la réalisation de l'examen élastographique, avec le concours de la société SuperSonic.

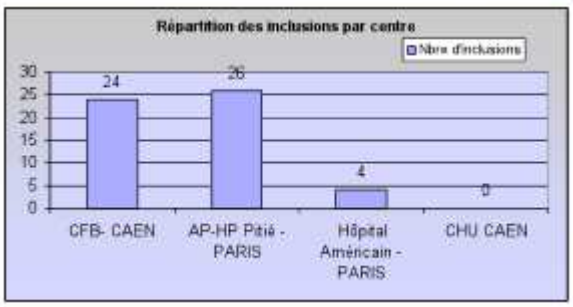
3. Phase d'inclusion

Pour recruter les 120 patients requis sur une période de 18 mois, plusieurs centres investigateurs participent à l'étude : l'Hôpital Américain de Neuilly, l'hôpital de la Pitié Salpêtrière et le CHU de Caen.

Centre	Date réception convention signée	Date début des inclusions
Centre François BACLESSE - CAEN	Non applicable	21/05/2013
Hôpital de la Pitié-Salpétrière	10/09/2013	28/10/2013
Hôpital Américain de Neuilly	17/07/2013	05/11/2013
CHU de CAEN		Pas d'inclusion à ce jour

Il est prévu de terminer le recrutement des 120 patients requis en novembre 2014.
A ce jour, 54 patients ont été inclus dans l'étude.





Nous sommes ainsi en moyenne à 8-10 inclusions par mois ce qui devrait nous permettre **de terminer l'étude comme prévu en novembre 2014**.

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2011 (40 K€)

Dr Blandine GATTA-CHERIFI
Direction **Pr Margriet WESTERTERP-PLANTENGA**
NUTRIM School for Nutrition, Toxicology and Metabolism, Maastricht University, Pays-Bas

Relative importance of dietary protein content in determining energy intake across the lifespan.

Medium term protein turnover, energy expenditure and intrahepatic triglycerides content in response to protein/carbohydrate and fat ratio of the diet.

Résumé

Rationnel

Les régimes riches en protéines sont efficaces dans la perte de poids et dans le maintien de cette perte de poids en situation de balance énergétique négative. Cependant, l'effet de ce type de régimes riches en protéine chez des individus en balance énergétique positive ou nulle n'est pas connu, en particulier à moyen terme. De fait, des études dans des conditions de balance énergétique stable sont nécessaires. De plus, l'effet de ces régimes riches en protéines sur la graisse ectopique, et plus spécifiquement sur la graisse intrahépatique, particulièrement délétère sur le plan métabolique, n'est pas connu.

Objectifs

Le but de l'étude était d'étudier la plénitude gastrique, la dépense énergétique et la balance en macronutriments chez des sujets bénéficiant d'un régime riche en protéine (HP) pauvre en hydrate de carbone par rapport à un régime pauvre en protéines riche en hydrates de carbone (LP) pendant 12 semaines. De plus, nous avions pour objectif d'étudier le potentiel de ces régimes à modifier l'adiposité totale, la graisse viscérale et la graisse hépatique.

Dessin expérimental

Nous avons mené une étude randomisée en parallèle incluant 14 hommes et 18 femmes (âge, moyenne ± SD : 24 ± 5 y; IMC (en kg/m2): 22.8 ± 2.0]. Un sous-groupe de 20 sujets (8 hommes and 12 femmes) ont été inclus dans l'analyse du tissu adipeux abdominal et 16 (7 hommes and 9 femmes) du contenu intrahépatique en triglycérides par spectroscopie.

Résultats

La plénitude gastrique est significativement augmentée dans le groupe HP par rapport au groupe LP à l'évaluation réalisée à la fin de la première semaine. La dépense énergétique totale se maintient tout au cours de l'étude dans le groupe HP alors qu'elle diminue significativement dans le groupe LP (semaine 1 : P = 0.002; semaine 12 : P = 0.001). La balance énergétique est maintenue dans le groupe HP et devient positive dans le groupe LP à l'évaluation réalisée à la 12ème semaine. La balance protéique est directement reliée au taux de protéines dans le régime et diffèrent donc significativement entre les conditions. L'adiposité totale mesurée par plétysmographie augmente significativement dans le groupe LP par rapport au groupe HP chez les femmes. Le tissu adipeux viscéral et le contenu intrahépatique en triglycérides sont significativement diminués 12 semaines de régime HP (VAT: 16.9 ± 9.9 cm2; CH2H2O: 0.20 ± 0.10; IHTG% : 0.22 ± 0.11%) par rapport au régime LP (VAT: 33.6 ± 16.3 cm2, P = 0.020; CH2H2O: 0.38 ± 0.21, P = 0.040 ; IHTG%: 0.43 ± 0.24%, P = 0.041).

Conclusion

L'augmentation transitoire de la sensation de plénitude gastrique, le maintien persistant de la dépense énergétique totale, et de la balance protéique positive avec un régime HP par rapport à un régime LP pourrait prévenir d'une balance énergétique positive et d'une prise de poids secondaire. De plus, un régime HP pourrait protéger de l'accumulation intrahépatique de triglycérides chez des sujets normopondéraux en balance énergétique nulle.

Abstract

Background

Relatively high-protein diets are effective for body weight loss, and subsequent weightmaintenance, yet it remains to be shown whether these diets would prevent body weight gain inenergy balance and if this effect is sustained or transient. Therefore, high-protein diet studies inenergy balance are necessary. Moreover, while the deleterious metabolic consequences ofectopic fat is now well establish, the effect of these high protein diet on intrahepatic triglyceride (IHTG) content, are not known.

Objective

The objective was to determine fullness, energy expenditure, and macronutrientbalances on a high-protein low-carbohydrate (HPLC) diet compared with a high carbohydrate low-protein (HCLP) diet, in energy balance, and to assess whether effects are transient or sustained after 12 weeks. In addition, we aimed to assess the potential of these dietsto modify total and VAT volume, as well as IHTG content.

Design

A randomized parallel study was performed in 14 men and 18 women [age(mean ± SD):24 ± 5 y; BMI (in kg/m2): 22.8 ± 2.0] on diets containing 30/35/35 (HPLC) or 5/60/35 (HCLP)% of energy from protein/carbohydrate/fat for 12 weeks. A subset of 20 subjects (8 men and 12 women) were included in the analysis of VAT volume, and 16 subjects (7 men and 9 women) in the analysis of IHTG content.

Results

Fullness ratings were significantly higher in the HPLC vs. the HCLP-diet group at wk 1(P = 0.034). Significant interactions between dietary intervention and time on TEE (P = 0.013), SMR (P = 0.040), and DIT (P = 0.027) appeared from baseline to wk 12. TEE was maintained inthe HPLC diet group, while it significantly decreased throughout the intervention period in the HCLP-diet group (wk 1: P = 0.002; wk 12: P = 0.001). Energy balance was maintained in the HPLC diet group, and became positive in the HCLP diet group at wk 12 (P = 0.008). Protein balance varied directly according to the amount of protein in the diet, and diverged significantly between the diets (P = 0.001). Total adipose tissue volume increased significantly in response the LPHC [air displacement plethysmography (ADP): 0.9 ± 1.1%, total body water (TBW): 2.1 ± 1.9%] compared with the HPLC diet in women (ADP: -1.4 ± 1.8%, P = 0.005; TBW: -0.6 ± 1.2%, P = 0.003). VAT volume and IHTG content were significantly lower after the HPLC (VAT: 16.9 ± 9.9 cm2; CH2H2O: 0.20 ± 0.10; IHTG%: 0.22 ± 0.11%) compared with the LPHC diet (VAT: 33.6 ± 16.3 cm2, P = 0.020; CH2H2O: 0.38 ± 0.21, P = 0.040; IHTG%: 0.43 ±0.24%, P = 0.041).

Conclusion

Maintenance of TEE, SMR and DIT, initial, but transient higher fullness, and a sustained positive protein balance on a HPLC vs. a HCLP diet in energy balance may prevent development of a positive energy balance and subsequent body weight gain. Moreover, a HPLC diet has the potential to preserve IHTG content compared with a LPHC diet in healthy non-obese subjects in energy balance.

Rapport

La bourse SFE obtenue en 2011 m'a permis de réaliser un séjour post doctoral dans le laboratoire du Professeur Margriet Westerterp-Plantenga (Université de Maastricht, Maastricht, Pays Bas), laboratoire de référence internationale dans le domaine de l'étude du comportement alimentaire et du métabolisme humain. L'étude dans laquelle j'ai été particulièrement impliquée, s'est intéressée aux effets, à moyen terme, d'un régime riche en protéine administré en balance énergétique nulle, sur la dépense énergétique, les sensation de faim, envie de manger, plénitude gastrique, la composition corporelle, et la répartition des graisses.

Il est en effet maintenant bien admis que les protéines augmentent davantage la satiété et la dépense énergétique par rapport aux glucides et lipides. Ainsi, un régime riche en protéines, (30% de la ration énergétique globale quotidienne) administré pendant 4 jours à des sujets en balance énergétique nulle, augmente la satiété, la thermogénèse, et l'oxydation lipidique par rapport à un régime normo protéique (10% de la ration énergétique globale quotidienne). En revanche, l'effet d'un régime pauvre en protéines (5% de la ration énergétique globale quotidienne) sur la dépense énergétique et l'oxydation des substrats n'est pas connu. De plus, le maintien de l'effet d'un régime riche en protéines sur la dépense énergétique à 12 semaines chez des sujets en balance énergétique nille n'est pas connu. Enfin, l'effet de ces régimes sur la répartition des graisses et sur l'accumulation de graisse ectopique n'a pas été étudié connu.

Le but de cette étude était de mesurer la dépense énergétique, l'oxydation des substrats, la composition corporelle et la répartition des graisses (graisse viscérale et ectopique) induits par des régimes variant en protéines administrés pendant 12 semaines: régime pauvre en protéine, 5% de la ration énergétique globale quotidienne (LP), ou régime riche en protéine, 30% de la ration énergétique globale quotidienne (HP). Etaient évaluées à l'inclusion, après une semaine d'intervention et 12 semaines d'intervention, lors de chacun des séjours dans la chambre calorimétrique, la dépense énergétique par calorimétrie directe, l'oxydation des substrats, la faim, la satiété et l'envie de manger et la plénitude gastrique par échelles visuelles analogiques ainsi que les concentrations plasmatiques à jeun de glucose, insuline et acides gras libres. Etaient évaluées, à l'inclusion et après 12 semaines d'intervention, la composition corporelle par pléthysmographie et méthode de dilution ainsi que la graisse abdominale et la présence de tissu adipeux ectopique au niveau du foie et du muscle par IRM et RMN respectivement, ces trois dernières mesures i.e composition corporelle, tissu adipeux ectopique et graisse abdominale étaient plus spécifiquement sous ma responsabilité.

Quatorze hommes et 18 femmes (âge, moyenne ± SD : 24 ± 5 ans; IMC (en kg/m2) :

22.8 ± 2.0] ont finalement été inclus. Un sous-groupe de 20 sujets (8 hommes and 12 femmes) ont été inclus dans l'analyse du tissu adipeux abdominal et 16 (7 hommes et 9 femmes) du contenu intrahépatique en triglycérides par spectroscopie.

Nous avons mis en évidence une augmentation significative de la sensation de plénitude gastrique dans le groupe HP par rapport au groupe LP à l'évaluation réalisée à la fin de la première semaine. La dépense énergétique totale se maintient tout au cours de l'étude (12 semaines) dans le groupe HP alors qu'elle diminue significativement dans le groupe LP (semaine 1: P = 0.002; semaine 12: P = 0.001). La balance énergétique est maintenue dans le groupe HP et devient positive dans le groupe LP à l'évaluation réalisée à la 12ème semaine. La balance protéique est directement reliée au taux de protéines dans le régime et diffèrent donc significativement entre les conditions. L'adiposité totale mesurée par pléthysmographie augmente significativement dans le groupe LP par rapport au groupe HP chez les femmes. Le tissu adipeux viscéral et le contenu intrahépatique en triglycéries sont significativement diminués après 12 semaines de régime HP par rapport au régime LP (VAT: 16.9 ± 9.9 versus 33.6 ± 16.3 cm2, P = 0.020; CH2H2O: 0.20 ± 0.10 versus 0.38 ± 0.21, P = 0.040; IHTG%: 0.22 ± 0.11% versus 0.43 ± 0.24%, P = 0.041, HP versus LP).

Ces résultats ont fait l'objet de 2 articles qui sont actuellement soumis pour publication à American Journal of Clinical Nutrition.

En plus de ces résultats scientifiques, ce stage post doctoral m'a permis découvrir des techniques d'études du comportement alimentaire et du métabolisme, en particulier la calorimétrie directe et la mesure du contenu intrahépatique en triglycérides par RMN dont j'ai eu plus particulièrement la responsabilité pendant mon stage. Bien sûr, ce stage m'a aussi permis de satisfaire à l'obligation de mobilité avant le concours de PUPH que j'ai passé en 2013. Enfin, il me semble important de souligner aussi que cette année dans le laboratoire du Professeur Westerterp à Maastricht m'a permis de tisser des liens forts et enrichissants, tant sur le plan professionnel que personnel, avec cette équipe, qui se poursuivront, je crois, par des collaborations futures.

Bourse de Master 2 SFE 2011 (30 K€)

Dr Valérie BERNARD
Direction **Dr Nadine BINART**
INSERM U 693, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Impact des inhibiteurs des tyrosine-kinases sur les fonctions ovariennes et testiculaires.

Le Sunitinib affecte la fonction ovarienne chez la souris : une étude pré-clinique.

Sunitinib affects ovarian functions in mouse: a pre-clinical study.

Résumé

Le sunitinib, inhibiteur de tyrosine-kinases (ITK), a montré son efficacité dans le traitement de cancers adultes et pédiatriques. Une administration prolongée de ce produit peut engendrer des endocrinopathies comme l'hypothyroïdie ou le diabète, mais il existe peu de données concernant sa possible gonadotoxicité. L'objectif de notre recherche a été d'évaluer, à l'aide d'un modèle murin, l'impact du sunitinib sur la fonction ovarienne. Des souris femelles âgées de 6 semaines ont été randomisées en 2 groupes: elles ont reçu [gavage *per os*, 1 fois par jour (5j/7)] soit du véhicule (n=12) ou du sunitinib (n=19) (50 mg/kg/j) pendant 5 semaines. La cyclicité, le taux d'ovulation, l'expression du gène de l'*anti müllerian hormone* (*amh)* ovarienne et les taux circulants d'AMH ont été évalués au terme du traitement dans les 2 groupes. L'exposition au sunitinib a significativement réduit (i) le nombre de corps jaunes par ovaire (1.1 ± 0.38 dans le groupe sunitinib versus 4 ± 0.79 dans le groupe contrôle, $p<0.01$) (ii) les niveaux de transcrits ovariens de l'*amh,* de même que les taux sériques d'AMH chez les souris traitées par sunitinib (12.01 ± 1.16 ng/ml) comparées aux souris contrôles (14.33 ± 0.87 ng/ml, $p< 0.05$). Le sunitinib a fortement altéré le processus d'ovulation chez la souris, suggérant un effet délétère sur la fertilité. La diminution de l'expression de l'*amh* dans l'ovaire, de même que celle des taux d'AMH sérique suggèrent que cet ITK pourrait également altérer la réserve ovarienne chez le rongeur. L'impact du sunitinib sur l'ovaire humain doit absolument être mieux évalué, car ce produit est maintenant administré en cancérologie pédiatrique. Nous pouvons supposer que le sunitinib, de même que les autres ITK, pourrait induire une insuffisance ovarienne primaire chez les patientes. Ceci pourrait conduire les cliniciens à recommander des techniques de préservation de la fertilité aux filles et jeunes femmes avant l'initiation de ce traitement.

Abstract

During the last decade, sunitinib, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor (TKI), proved its efficacy in different types of cancer in both adult and children. Prolonged administration of this product, as well as other TKIs, is known to cause endocrine-related side effects such as hypothyroidism and diabetes, but data regarding its effects on gonadal function and subsequent fertility are lacking. The aim of the study was to evaluate, in a preclinical setting, the effects of sunitinib on ovarian function and follicular reserve using mouse as a model. Six-week-old female mice were randomized into 2 groups: mice received [orally, once daily (5d/wk)] either vehicle (n=12) or sunitinib (n=19) (50 mg/kg/d) during 5 weeks. Cyclicity, ovulation rate, *amh* transcripts and circulating AMH levels were evaluated at the end of the treatment in both groups. Sunitinib exposure significantly reduced (i) corpora lutea number per ovary (1.1 ± 0.38 in sunitinib group versus 4 ± 0.79 in control group, $p<0.01$) and (ii) serum AMH levels in sunitinib treated mice (12.01 ± 1.16 ng/ml) compared to control mice (14.33 ± 0.87 ng/ml, $p< 0.05$). Sunitinib dramatically alters ovarian ovulation process in mouse suggesting a deleterious fertility effect. The ovarian *amh* transcripts decrease and serum AMH levels suggest that sunitinib could also impact ovarian reserve in rodents. Its effect on women's ovary should absolutely be evaluated, since it is already being administered to children and young adults. Thus, sunitinib, as well as other TKIs, could be suspected to induce premature ovarian insufficiency. Therefore, fertility preservation methods should be discussed before initiation of the treatment in girls and young women.

Rapport

Le sunitinib, inhibiteur de tyrosine-kinases (ITK), a montré son efficacité dans le traitement de cancers adultes et pédiatriques. Une administration prolongée de ce produit peut engendrer des endocrinopathies comme l'hypothyroïdie ou le diabète, mais il existe peu de données Présentation des résultats de ce travail lors du Congrès de la SFE Toulouse 2012.

Présentation affichée prévue au congrès de l'Endocrine 2014 Chicago concernant sa possible gonadotoxicité.

L'objectif de notre recherche a été d'évaluer, à l'aide d'un modèle murin, l'impact du sunitinib sur la fonction ovarienne.

Des souris femelles âgées de 6 semaines ont été randomisées en 2 groupes: elles ont reçu [gavage *per os*, 1 fois par jour (5j/7)] soit du véhicule (n=12) ou du sunitinib (n=19) (50 mg/kg/j) pendant 5 semaines. La cyclicité, le taux d'ovulation, l'expression du gène de l'*anti müllerian hormone* (*amh)* ovarienne et les taux circulants d'AMH ont été évalués au terme du traitement dans les 2 groupes.

L'exposition au sunitinib a significativement réduit :

(i) le nombre de corps jaunes par ovaire (1.1 ± 0.38 dans le groupe sunitinib versus 4 ± 0.79 dans le groupe contrôle, $p<0.01$) ;

(ii) les niveaux de transcrits ovariens de l'*amh,* de même que les taux sériques d'AMH chez les souris traitées par sunitinib (12.01 ± 1.16 ng/ml) comparées aux souris contrôles (14.33 ± 0.87 ng/ml, $p< 0.05$).

Le sunitinib a fortement altéré le processus d'ovulation chez la souris, suggérant un effet délétère sur la fertilité. La diminution de l'expression de l'*amh* dans l'ovaire, de même que celle des taux d'AMH sérique suggèrent que cet ITK pourrait également altérer la réserve ovarienne chez le rongeur.

L'impact du sunitinib sur l'ovaire humain doit absolument être mieux évalué, car ce produit est maintenant administré en cancérologie pédiatrique. Nous pouvons supposer que le sunitinib, de même que les autres ITK, pourrait induire une insuffisance ovarienne primaire chez les patientes. Ceci pourrait conduire les cliniciens à recommander des techniques de préservation de la fertilité aux filles et jeunes femmes avant l'initiation de ce traitement.

Bourse de Fin de thèse SFE 2011 (20 K€)

Dr Zachariae BRAM
Direction **Pr Hervé LEFEBVRE**
INSERM U 982, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Faculté des Sciences et Techniques, Université Rouen, Mont-Saint-Aignan

Etude physiopathologique de la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales.

Résumé

Notre travail a étudié le rôle physiopathologique de la sérotonine (5-HT), la somatostatine (SST) et les œstrogènes dans la régulation de la sécrétion de cortisol dans les dysplasies micronodulaires pigmentées des surrénales (PPNAD) en collaboration avec les équipes du Pr Jérôme Bertherat de l'Institut Cochin (INSERM U1016) et du Dr Constantine A. Stratakis au National Institute of Health (Bethesda, USA). Nos résultats montrent la présence d'une boucle de régulation sérotoninergique anormale dans les tissus de PPNAD résultant d'une surexpression de l'enzyme clé de synthèse de la 5-HT, la tryptophane hydroxylase de type 2 (TPH2) et des récepteurs 5-HT_4, 5-HT_6 et 5-HT_7. Nos données montrent également que l'activation constitutive de la voie de la PKA est responsable de l'apparition de cette boucle pathologique dans les tissus de PPNAD. Comme dans la surrénale normale, la SST est présente dans les cellules chromaffines de la médulla des tissus de PPNAD. De plus, une sous-population de cellules stéroïdogènes, située au voisinage de la jonction cortico-médullaire, produit également la SST. Nos données montrent que des récepteurs de la SST (SSTR) sont anormalement exprimés dans les tissus de PPNAD. Nos données suggèrent que la SST et ses analogues pourraient freiner la production de glucocorticoïde chez les patients atteints de PPNAD. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (2014, 99:E891-901). Nos résultats montrent par ailleurs que les œstrogènes sont capables de stimuler la production de cortisol par les tissus de PPNAD *via* l'expression anormale des récepteurs ERα et GPER dans les cellules corticosurrénaliennes. Ils indiquent en outre que les œstrogènes circulants pourraient être à l'origine de l'incidence accrue de l'hypercortisolisme observée chez les femmes en période d'activité génitale. Un rôle autocrine/paracrine stimulant d'œstrogènes produits *in situ* est également possible.

Abstract

In this work, we investigated the pathophysiological role of serotonin (5-HT), somatostatin (SST) and estrogen in cortisol secretion by primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) tissues, in collaboration with the teams of Pr Jérôme Bertherat (Institut Cochin, INSERM U1016) and Dr Constantine A. Stratakis (National Institute of Health; Bethesda, USA). We observed the presence of an illicit serotonergic regulatory loop in PPNAD tissues. This abnormal paracrine system results from overexpression of the key enzyme of 5-HT synthesis, tryptophan hydroxylase type 2 (TPH2) and 5-HT receptors 5-HT_4, 5-HT_6 and 5-HT_7. Our data also indicate that the constitutive activation of the PKA pathway is responsible for the occurrence of the serotonergic stimulatory loop in PPNAD tissues. As in the normal adrenal gland, SST is detected in medulla chromaffin cells of PPNAD tissues. In addition, a subpopulation of steroidogenic cells, located in the vicinity of the corticomedullary junction, also produces SST. Our data show that SST receptors (SSTR) are abnormally expressed in PPNAD tissues. They thus suggest that SST and its analogs could inhibit glucocorticoid production in PPNAD patients. All these results have been presented in an original article published in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (2014, 99:E891-901). On the other hand, we noticed that estradiol is able to stimulate cortisol production by PPNAD tissues through abnormal expression of ERα and GPER in PPNAD adrenocortical cells. These observations indicate that circulating estradiol may be involved in the increased incidence of hypercortisolism observed in women with PPNAD. An autocrine/paracrine stimulating role of estrogen produced *in situ* on cortisol secretion is also conceivable.

Bourses SFE « TOULOUSE 2012 »

Bourse de Master 2 mutualisée Ipsen & SFE 2012 (30 K€)

Dr Anne WAUTIER
Direction **Pr Yves LE BOUC & Dr Sylvie ROSSIGNOL**
INSERM U 938, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Recherche d'anomalies épigénétiques dans les placentas après assistance médicale à la procréation.

Impact de l'assistance médicale à la procréation (AMP) sur la mise en place de l'empreinte parentale dans le placenta.

Résumé

Introduction: L'empreinte parentale est un modèle de régulation épigénétique qui aboutit à l'expression ou à la non-expression d'un gène en fonction de son origine parentale. Les marques d'empreinte sont apposées lors de la gamétogenèse (et jusqu'à la période préovulatoire pour l'ovocyte) puis maintenues après la fécondation au cours des divisions successives. Certaines études ont mis en évidence une augmentation de la prévalence des enfants issus d'AMP au sein des patients présentant certaines pathologies liées à l'empreinte parentale. Les mécanismes pourraient concerner l'apposition normale des marques d'empreintes pendant la gamétogenèse (stimulation ovarienne / biopsie testiculaire) ou empêcher leur maintien durant la période préimplantatoire (culture embryonnaire in vitro…) Le placenta détient un rôle clef dans la croissance foetale (régulation de l'apport de nutriments et O2). Des études mettent en évidence que l'apposition de l'empreinte dans le placenta est différente de celle du foetus. D'autres travaux suggèrent que l'AMP modifierait la mise en place de cette empreinte.

Objectifs : L'objectif de mon travail est d'étudier la méthylation des centres d'empreinte afin de déterminer si l'AMP influence sa mise en place dans les placentas.

Méthodes : Le PHRC EPIGEN analyse les régions soumises à empreinte dans trois groupes de population différents : les enfants issus de grossesse A-spontanée B-après stimulation ovarienne, et C-par fécondation in vitro. Soixante-cinq fragments de la face foetale de placentas ont été étudiés. Après traitement des ADN par bisulfite, l'indice de méthylation de régions soumises à empreinte ICR1, promoteur de H19, DMR0 d'IGF2, ICR2, DLK1, SNRPN, PEG/MEST, GNAS XLA, GNAS AB, GNAS NESP et ZAC1, était déterminé par PCR quantitative allèle spécifique. Les résultats de méthylation ont été comparés à ceux obtenus dans les cellules circulantes du sang de cordon. L'expression des gènes IGF2, CDKN1C et LIT1 a été évaluée par RT-QPCR.

Résultats : Les indices de méthylation dans les placentas variaient de 41,6 à 61,4% et étaient significativement différents de ceux retrouvés dans les sangs de cordon correspondants pour tous les loci sauf ICR1 et PEG/MEST. L'impact de l'AMP n'a pas pu être évalué, l'aveugle devant être maintenu jusqu'à la fin du PHRC Epigen.

Conclusion : Ce travail a permis d'étudier la méthylation des zones soumises à empreinte parentale dans le placenta et de retrouver une différence significative de méthylation entre les placentas et les sangs de cordon. Il constitue une étude préliminaire essentielle afin d'évaluer l'impact de l'AMP sur l'empreinte dans les placentas et de proposer des normes d'IM dans les placentas. Ces données permettront de mieux évaluer le risque de pathologie du développement pré- et post natal, lié à l'AMP par un mécanisme épigénétique.

Bourse de Master 2 Lilly 2012 (30 K€)

Mlle Amélie POIDVIN
Direction **Pr Joël COSTE**
EA 4360 APEMAC, Biostatistics and Epidemiology Unit, Université Paris Descartes & Paris Diderot, Paris

Croissance et qualité de vie à l'âge adulte des patientes traitées par hormone de croissance pour un syndrome de Turner : données de l'étude européenne SAGhE.

Résumé

Objectif

Evaluation de la morbidité à l'âge adulte des patients traités par hormone de croissance synthétique dans l'enfance.

Méthodes

Les données de morbidité concernant 6874 patients traités pour un déficit en hormone de croissance idiopathique, une petite taille idiopathique ou un antécédent de retard de croissance intra-utérin ont été obtenues à partir de questionnaire envoyés aux patients, complétés par les informations de la base SNIIRAM (ALD, PMSI et prescriptions médicamenteuses), puis comparées à la population générale à partir de registres de référence.

Résultats

L'incidence des cancers, accidents vasculaires cérébraux, infarctus du myocarde, ainsi que la prévalence du diabète, ont été étudiés. Une augmentation de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques a été mise en évidence. Cette augmentation du risque est plus marquée pour les hémorragies sous-arachnoïdiennes. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer le lien et d'analyser les mécanismes impliqués

Abstract

Objectives: Assessment of morbidity in adulthood patients treated with synthetic growth hormone in childhood.

Methods: Adult morbidity data were obtained for 6,874 children with idiopathic isolated GH deficiency or short stature through health questionnaire, completed with datas from the French National Health Insurance Information System, and compared with population values extracted from different registries of reference.

Results: The incidences of cancer, stroke, myocardial infarction, and the prevalence of diabetes, were studied. Among the results, there was a significantly higher risk of hemorrhagic stroke among patients treated with GH in childhood. This association is stronger for subarachnoid hemorrhage.

Conclusions: Further studies should evaluate the potentially causal role of GH treatment in these findings

Publication

Poidvin A, Touzé E, Ecosse E, Landier F, Béjot Y, Giroud M, Rothwell PM, Carel JC, Coste J.
Growth hormone treatment for childhood short stature and risk of stroke in early adulthood.
Neurology, 2014, 83:780-6.

Rapport des principaux résultats

Les études s'intéressant au devenir des patients traités par hormone de croissance avec un recul important sont rares, et l'étude SAGhE, Santé Adulte Gh Enfant, est la première étude s'intéressant au devenir à long terme des patients traités par hormone de croissance recombinante dans l'enfance en Europe.

L'objectif de ce travail était d'évaluer la morbidité à long terme des patients dont le traitement par hormone de croissance recombinante a débuté en France entre 1985 et 1996 dans le cadre d'un déficit en hormone de croissance idiopathique, d'une petite taille idiopathique ou d'un retard de croissance intra-utérin.

Les données collectées à partir des questionnaires envoyés aux patients et celles recueillies par le CépiDC ont été complétées par les informations des bases SNIIRAM (grâce à une extraction spécifique à partir des identifiants des patients de notre étude), concernant les déclarations ALD, les codages PMSI entre 2008 et 2010 et les prescriptions d'antidiabétique entre 2008 et 2010. Les évènements identifiés étaient validés à partir de compte rendus d'hospitalisation. L'utilisation de la méthode Capture-recapture a permis d'estimer l'incidence des cancers, des accidents vasculaires cérébraux et des infarctus du myocarde, et de la comparer à la population générale. La prévalence du diabète traité dans le groupe étudié a été comparée à la prévalence de la population générale. La date de point de l'étude était fixée au 31/12/2010.

6874 patients ont été inclus dans le groupe à bas risque de l'étude, avec un suivi médian de 17.4 ans. Les indications initiales du traitement par hormone de croissance étaient réparties comme suit : 5116 patients (74.4%) traités dans le cadre d'un déficit en hormone de croissance idiopathique (pic GH <10 µg/L), 868 patients traités pour une petite taille idiopathique (13%), 547 traités pour une dysfonction neurosécrétoire (8%) et 343 traités pour un antécédent de retard de croissance intra-utérin sans rattrapage (5%). L'âge au début du traitement était en moyenne de 11 ans (± 3.4 années), la dose moyenne reçue était de 23.5 µg/kg/jour (± 9.5 µg/kg/jour).

Les cas des différentes pathologies analysées ont été validés par l'analyse des informations médicales initiales et de suivi, complétée par des comptes-rendus d'hospitalisation, d'imagerie, d'anatomo-pathologie ou autres. Parmi les résultats, une augmentation significative de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques a été mise en évidence (Standardized incidence ratio allant de 3.5 à 7 selon le registre de référence en population générale utilisé : Dijon ou Oxford, et selon la prise en compte ou non des patients estimés par la méthode Capture-recapture). Cette augmentation de risque est plus marquée pour les hémorragies sous-arachnoïdiennes (Standardized incidence ratio allant de 5.7 à 9.3). Par ailleurs, la proportion d'accident vasculaire hémorragique dans notre cohorte était de 73%, ce qui est significativement plus élevé que dans le registre de référence de Dijon (29.5%) ou celui d'Oxford (30.1%) pour les mêmes classes d'âge (Poidvin et al, Neurology, 2014 Aug).

En conclusion, l'étude a montré une relation entre accidents vasculaires hémorragiques à l'âge adulte et traitement par hormone de croissance dans l'enfance pour un déficit en GH idiopathique, une petite taille idiopathique ou un retard de croissance intra-utérin sans rattrapage. Ces résultats complètent les données publiées en 2012 (Carel et al, JCEM, 2012 Feb) sur la mortalité par accident vasculaire cérébral dans la même population de patients. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer le lien et d'analyser les mécanismes impliqués.

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2012 (30 K€)

Dr Thomas CUNY
Codirection **Pr Anne BARLIER & Pr Léo HOFLAND**
CRN2M, CNRS UMR 7286, équipe SIGNET / Neuroendocrine Laboratory, Faculté de Médecine Nord, Marseille
Department of Internal Medicine, division of Endocrinology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Pays-Bas

Rôle du microenvironnement tumoral sur la croissance et la sensibilité au traitement des tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (GEPNETs).

Impact des cellules fibroblastiques sur la prolifération et la migration des cellules neuroendocrines humaines pancréatiques : un nouvel acteur clé du microenvironnement tumoral ?

The impact of fibroblasts on proliferation and migration of human pancreatic neuroendocrine cells: a novel pivotal role in tumor microenvironment?

Résumé

Les tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (TNEGEPs) humaines relèvent d'une prise en charge thérapeutique qui demeure problèmatique. Peu de données existent à ce jour concernant l'influence potentielle des fibroblastes du microenvironnement sur la croissance et la dissémination des cellules tumorales. Nous postulons que la lignée cellulaire humaine fibroblastique HFL1 influence la croissance et le potentiel de dissémination de deux lignées cellulaires de tumeurs neuroendocrines pancréatiques humaines, BON et QGP-1. Nous avons évalué l'interaction entre les cellules BON/QGP1 et HFL1 via deux techniques : 1/ co-culture des cellules BON ou QGP1 en milieu dépourvu de sérum (BSA 0.2%) avec des HFL1 reposant sur la membrane d'un transpuit et 2/ incubation des cellules BON ou QGP1 en présence soit d'un milieu dépourvu de sérum (BSA 0.2%) (Contrôles ou CTRL), soit d'un mélange (ratio 1:1) BSA 0.2% avec un milieu BSA 0.2% conditionné pendant 72h par les HFL1 (HFL1cm). Une mesure d'ADN par coloration Hoescht fut réalisée dans les 2 protocoles au terme de 7 jours d'incubation, avec un renouvellement du milieu à J3. En parallèle, nous avons évalué l'effet du HFL1cm sur le potentiel de migration des cellules BON, préalablement fixées sur une matrice de poly-L-lysine et incubées pendant 96 heures avec un milieu DMEM enrichi en SVF (10%). Au terme des 4 jours, une croix, dont le croisement se situait au centre du puit, fut réalisée sur la couche monocellulaire obtenue et le milieu d'incubation fut changé soit pour un milieu BSA 0.2% uniquement, soit pour un mélange BSA 0.2% et HFL1cm (ratio 1:1). HFL1cm. Des photos furent prises toutes les 2 heures jusque T8, en mesurant la distance entre 2 berges cellulaires (Software ImageJ®). En coculture, la présence des HFL1 augmente significativement la prolifération des cellules BON et GQP1 (155.7 ± 8.22% vs 100 ± 2.5% et 147 ± 4.1% vs 100 ± 1.9% respectivement, $p < 0.0001$) par rapport à CTRL. Des résultats similaires sont observées en présence de HFL1cm (153.7 ± 14.68% vs 100 ± 4.63%, $p < 0.008$, pour les BON et 150.7 ± 10.45 vs 102.4 ± 3.2%, $p < 0.0001$, pour les QGP1). Le milieu HFL1cm stimule également le potentiel de migration (exprimé en %) des cellules BON par rapport aux CTRL (T2 : + 122 ± 13.25%, $p < 0.0001$; T4 : + 70.56 ± 12.81%, $p < 0.0001$; T8 : + 23.22 ± 12.6%, $p < 0.05$).

Au total, la cellule fibroblastique humaine, en tant qu'acteur du microenvironnement tumoral, est capable de stimuler la prolifération et la migration des cellules BON et QGP1 et pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. L'identification des facteurs pertinents du surnageant fibroblastique ainsi que le rôle joué par celui-ci sur la réponse au traitement des cellules de TNEGEPs est en cours.

Abstract

Human gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEPNETs) represent a heterogeneous group of tumors whose treatment remains still problematic and little is known about potential factors from the tumoral microenvironment that could influence growth and spreading of tumor cells. We hypothesize that stromal fibroblasts may influence growth and migration potency of human GEPNETs cells. Two pancreatic human neuroendocrine cell lines, BON and QGP-1 and one human fibroblastic cell line, HFL1, were used. A second human fibroblastic cell line of pancreatic origin is currently investigated. We assessed the interaction between BON/QGP-1 and HFL1 using two different approaches: 1) co-incubation of either BON or QGP-1 in serum-free medium condition with HFL1, using Transwell permeable supports 2) using 72h HFL1-conditioned serum-free medium containing 0.2% BSA (HFL1cm). BON and QGP1 were incubated either with BSA 0.2% alone (control) or with HFL1cm and 0.2% BSA in a 1:1 ratio. For both protocols, DNA measurement by Hoechst staining has been performed after 7 days, with media refreshed at day 3. In parallel, we assessed the influence of HFL1cm on the migration potency of BON over an 8 hour period using an in vitro scratch assay. Cells were attached in poly-L-lysine coated wells in DMEM+10%FCS. After 4 days, a scratch was made and medium was changed with either medium+0.2% BSA or HFL1cm with medium+0.2% BSA (ratio 1:1). Pictures were taken every 2 hours from T0 to T8 to assess the distance between two parallel banks made (Software ImageJ®). In Transwell experiments, proliferation of either BON or QGP-1 significantly increased in the presence of HFL1 cells compared to control (155.7 ± 8.22% vs 100 ± 2.5% and 147 ± 4.1% vs 100 ± 1.9% respectively, $p < 0.0001$). Similar results were obtained for BON and QGP-1 incubated with HFL1cm (153.7 ± 14.68% vs 100 ± 4.63%, $p < 0.008$, and 150.7 ± 10.45 vs 102.4 ± 3.2%, $p < 0.0001$, respectively). For migration assay, incubation of BON with HFL1cm resulted in a significant increase of migration potency (expressed in %) compared to control (T2: + 122 ± 13.25%, $p < 0.0001$, T4: + 70.56 ± 12.81%, $p < 0.0001$, T8: + 23.22 ± 12.6%, $p < 0.05$).

In summary, human fibroblasts, as an actor of the tumor microenvironment, are able to produce factors that stimulate proliferation and migration of BON and QGP-1 and could, therefore, represent a novel therapeutic target for GEPNETs. Analysis of the relevant factors involved in this process, as well as studies on the role of fibroblasts in the response to drug treatment are ongoing.

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2012 (30 K€)

Dr Peter KAMENICKY
Direction **Pr Philippe CHANSON**
INSERM U 693, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Rôle d'AIP (Aryl hydrocarbon receptor - Interacting Protein) dans la tumorigenèse des adénomes hypophysaires : étude des conséquences des mutations d'AIP sur la signalisation d AhR (Aryl hydrocarbon receptor).

Résumé

Les mutations d'AIP (Aryl-hydrocarbon receptor Interacting Protein) sont retrouvées chez 4% des patients porteurs d'adénomes hypophysaires. Les mécanismes de la tumorigenèse ne sont pas connus mais des altérations d'interaction physique et fonctionnelle d'AIP avec son partenaire privilégié AhR, connu pour son potentiel carcinogène, pourraient être impliquées.

L'impact fonctionnel des mutations d'AIP sur la signalisation d'AhR a été étudié sur les fibroblastes cutanés de patients porteurs des mutations hétérozygotes p.R304X et p.G117AfsX39, aboutissant à un codon stop prématuré. Dans ces modèles cellulaires, ces mutations conduisent à une diminution de l'expression génique et protéique (haploinsuffisance) d'AIP. Ceci s'accompagne d'une réduction significative de l'expression basale d'un gène cible classique d'AhR, CYP1B1 (transcrit et protéine), mais aussi d'une baisse de l'induction de CYP1B1 par la kynurenine, ligand endogène d'AhR, (x2 dans les fibroblastes mutés versus x7 pour les témoins). Ces résultats indiquent que les mutations d'AIP altèrent l'activité transcriptionnelle d'AhR. Dans les cellules somatolactotropes GH3, la kynurenine stimule également l'expression de gènes cibles d'AhR, CYP1B1 (x3) et CYP1A1 (x100). Nous évaluons l'impact d'AIP sauvage et muté sur la signalisation d'AhR (trafic nucléo-cytoplasmique, régulation transcriptionnelle) dans cette lignée hypophysaire. Les gènes AhR-dépendants différentiellement affectés par les mutations d'AIP seront identifiés par ChiP-seq dans la lignée GH3 et dans les adénomes hypophysaires des souris hétérozygotes $AIP^{+/-}$. Ceci n'exclut pas que les mutations d'AIP puissent modifier d'autres voies de signalisation impliquant des partenaires moléculaires d'AIP (AMPc).

Ce travail démontre que les mutations d'AIP altèrent la signalisation d'AhR, ce qui pourrait jouer un rôle dans la tumorigenèse hypophysaire.

Publication

Lecoq AL, Kamenický P, Guiochon-Mantel A, Chanson P
Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas: is there a place for AIP, MEN1 and other genes screening.
Nature Reviews Endocrinology. **2015**, 11:43-54

L'article original rapportant les résultats de ce projet est en cours de rédaction

Communications orales

30ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Paris 2013
Présenté par Anne-Lise Lecoq, Prix de la meilleure CO

Communications affichés

16ème Congrès International de l'Endocrinologie et Congrès de l'Endocrine Society, Chicago 2014,
Présenté par Anne-Lise Lecoq

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2012 (40 K€)

Dr Maria-Cristina DE MARTINO
Direction **Dr Eric BAUDIN**
Institut Gustave Roussy, Villejuif

Evaluation du nombre de patients atteints d'un corticosurrénalome de stade III-IV susceptibles de bénéficier d'une thérapeutique moléculaire ciblée disponible.

Dépistage moléculaire pour une approche personnalisé au traitement du corticosurrénalome malin.

Molecular screening for a personalized treatment approach in advanced adrenocortical cancer.

Abstract

Context: adrenocortical cancer (ACC) is a rare cancer with poor prognosis and scant treatment options. In ACC, no personalized approach has emerged but no extensive molecular screening has been performed to date.

Objective: to evaluate the presence of a large number of potentially targetable molecular events in a large cohort of advanced ACC.

Design, setting, and participants: we used hotspot gene sequencing (Ion Torrent, 40 patients) and comparative genomic hybridization (CGH, 28 patients; a subset of the entire cohort) in adult stage III-IV ACC samples, to screen for mutations and copy number abnormalities of potential interest for therapeutic use in 46 and 130 genes respectively.

Results: At least one copy number alteration or mutation was found in 19 patients (47.5%). The most frequent mutations were detected on *TP53, ATM* and *CTNNB1* (6/40 [15%], 5/40 [12.5%] and 4/40 [10%] respectively). The most frequent copy number alterations identified were: amplification of the *CDK4* oncogene (5/28; 17.9%) and deletion of the *CDKN2A* (4/28; 14.3%) and *CDKN2B* (3/28; 10.7%) tumor suppressor genes. Amplifications of *FGFR1, FGF9* or *FRS2* were discovered in 3 subjects (10.7%). Associated alterations were: deletions of *CDKN2A, CDKN2B* with *ATM* mutations and *TP53* mutations with *CTNNB1* mutations.

Conclusions: No simple targetable molecular event emerged. Drugs targeting the cell cycle could be the most relevant new therapeutic approach for patients with advanced ACC. Inhibitors of the FGFR pathway could also be a therapeutic option in a subset of patients, while other targeted therapies should be considered on a case-by-case basis.

Publication

De Martino MC, Al Ghuzlan A, Aubert S, Assié G, Scoazec JY, Leboulleux S, Do Cao C, Libè R, Nozières C, Lombès M, Pattou F, Borson-Chazot F, Hescot S, Mazoyer C, Young J, Borget I, Colao A, Pivonello R, Soria JC, Bertherat J, Schlumberger M, Lacroix L, Baudin E.
Molecular screening for a personalized treatment approach in advanced adrenocortical cancer.
J Clin Endocrinol Metab. 2013, 98:4080-8.

Bourse de Master 2 SFE 2012 (30 K€)

Dr Claire AGOSTA
Codirection **Dr Nadia CHERRADI & Pr Olivier CHABRE**
INSERM U 1036, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CEA, Université Joseph Fourier, Grenoble

Identification des cibles des microARNs dans la tumorigénèse corticosurrénalienne : analyse fonctionnelle et expression tumorale.

Résumé

miR-483-5p et miR-139-5p ont été montrés sur-exprimés dans les carcinomes corticosurrénaliens (CCS) et ont émergé comme bio-marqueurs pour le diagnostic et le pronostic. Toutefois, le rôle de ces miRNAs dans la pathogenèse des CCS est encore inconnu. L'objectif était d'identifier les gènes cibles de miR-483-5p et miR-139-5p dans le CCS et d'étudier leur contribution dans la tumorigenèse corticosurrénalienne. La prédiction de cible a été réalisée en utilisant la base de données miRWalk combinée avec le profil d'expression génique des tumeurs corticosurrénaliennes, publié précédemment. Le rôle dans le phénotype malin de la lignée cellulaire NCI-H295R a été étudié en transfectant des inhibiteurs de miRNAs. Nous avons identifié NDRG2 (N-Myc Downstream-Regulated Gene 2) et NDRG4 comme cibles de miR-483-5p et miR-139-5p, respectivement. L'expression de NDRG2 et NDRG4 mesurée par RT-qPCR dans des tumeurs de la corticosurrénale issues de 30 patients, était inversement corrélée à l'expression de miR-483-5p et miR-139-5p, respectivement. L'interaction directe entre microARN et ARNm a été confirmée par des tests de gène rapporteur luciférase cloné en amont de la région 3'-non traduite de NDRG2 et NDRG4. Enfin, l'inhibition de miR-483-5p et de miR-139-5p n'a pas affecté la prolifération ou l'apoptose des cellules NCI- H295R, mais a inhibé leur croissance en gel d'agar en absence d'ancrage ainsi que leur caractère invasif. Nos données suggèrent que miR-483-5p et miR-139-5p contribuent à l'agressivité des CCS en ciblant deux gènes suppresseurs de tumeurs, NDRG2 et NDRG4.

Abstract

miR-483-5p and miR-139-5p have been shown previously to be up-regulated in adrenocortical carcinomas (ACC) and have emerged as biomarkers for diagnosis and prognosis. However, the role of these microRNAs in the pathogenesis of ACC is still unknown. The aim of the study was to identify target genes of miR-483-5p and miR-139-5p in ACC and to investigate their contribution to adrenocortical tumorigenesis. Target prediction was performed using miRWalk database combined with the previously published gene expression profiling of adrenocortical tumors. The role in the malignant phenotype of the NCI-H295R cell line was investigated using transfection of microRNA inhibitors. We identified NDRG2 (N-Myc Downstream-Regulated Gene 2) and NDRG4 as targets of miR-483-5p and miR-139-5p, respectively. The expression of NDRG2 and NDRG4 measured by RT-qPCR in adrenocortical tumors from 30 patients, was inversely correlated with miR-483-5p and miR-139-5p expression, respectively. Direct miRNA-mRNA interaction was confirmed by luciferase reporter gene assays. Finally, silencing miR-483-5p or miR-139-5p did not affect proliferation or apoptosis of NCI-H295R cells, but inhibited their **anchorage-independent** growth and invasion. Our data suggest that miR-483-5p and miR-139-5p promote ACC aggressiveness by targeting NDRG2 and NDRG4 tumor suppressor genes.

Rapport

Introduction

Le carcinome corticosurrénalien est un cancer rare mais de mauvais pronostic, avec un taux de survie à 5 ans - autour de 38% - qui dépend du stade d'extension tumorale au moment du diagnostic. L'exploration des anomalies génétiques et des mécanismes moléculaires impliqués dans la tumorigénèse du carcinome corticosurrénalien est essentielle pour améliorer les critères diagnostiques et pronostiques et la prise en charge thérapeutique des patients. Dans ce cadre, l'étude de l'expression des miRNAs (miRNAs) au niveau tumoral a montré qu'ils pourraient être des biomarqueurs significatifs. Les miRNAs sont de petits ARNs non codants d'une vingtaine de nucléotides qui régulent l'expression de gènes impliqués dans des mécanismes biologiques essentiels tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la migration et l'invasion. Ils répriment l'expression des gènes cibles de façon post-trancriptionnelle, en se liant sur la partie 3'non-traduite (3'-UTR) des ARNm. Nous avons montré précédemment que miR-483-5p (localisé dans l'intron 2 du gène de l'IGFII) et miR-139-5p (intron 2 du gène PDE2A) étaient sur-exprimés dans les carcinomes corticosurrénaliens, alors que miR-195 et miR-335 étaient, eux, sous-exprimés (Chabre et al, 2014). De plus, les niveaux d'expression de miR-483-5p (au niveau circulant) et de miR-139-5p (au niveau tissulaire) étaient corrélés au pronostic de récurrence et de métastase.

Cependant, à ce jour, peu d'études ont exploré le rôle fonctionnel des miRNAs dans les mécanismes de tumorigénèse corticosurrénalienne. Le but de notre étude était d'identifier les gènes cibles des miRNAs trouvés dérégulés dans les carcinomes corticosurrénaliens, en particulier ceux de miR-483-5p et miR-139-5p, et d'étudier leur contribution dans la physiopathologie de ces tumeurs.

Matériels et Méthodes

Les cibles des miRNAs ont été sélectionnées grâce à un logiciel de prédiction de cibles (miRWalk), couplé aux données issues de l'analyse du transcriptome des tumeurs corticosurrénaliennes (de Reyniès et al, 2009). Ces cibles potentielles ont été validées par plusieurs méthodes. Le niveau d'expression tissulaire de miR-483-5p et miR-139-5p (mesuré par RT-qPCR) a été corrélé avec le niveau d'expression des gènes cibles hypothétiques dans une cohorte de 30 tumeurs corticosurrénaliennes. Afin d'évaluer une interaction directe entre miR-483-5p et miR-139-5p et leurs ARNms cibles, la région 3'UTR de ces ARNms a été amplifiée à partir d'ADN génomique et clonée en aval du gène rapporteur Luciférase dans le vecteur pMIR-Luciférase (Invitrogen). Des expériences de co-transfection de miR-483-5p ou miR-139-5p « mimétiques » et des vecteurs pMiR-Luc-3'UTR ont ensuite été réalisées. Afin d'évaluer l'effet des miRNAs sur des mécanismes biologiques cellulaires clefs et sur le phénotype cellulaire malin, nous avons utilisé la lignée cellulaire humaine de carcinome corticosurrénalien NCI H295R dont le profil d'expression des miRNAs est très similaire à celui des carcinomes analysés précédemment (sur-expression importante de miR-483-5p et miR-139-5p, Chabre et al, 2014). Des expériences de co-transfection transitoire avec des inhibiteurs de miRNAs ou des miRNA mimétiques ont été réalisées puis les niveaux d'expression des ARNm cibles ont été déterminés par RT-qPCR. La prolifération cellulaire (test WST1), le cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium et mesure par FACS), l'apoptose (marquage Annexin-V-FITC/iodure de propidium et mesure par FACS), la migration et l'invasion (test en « Transwell », adaptation des tests en chambre de Boyden), ainsi que la formation de colonies en absence d'adhérence cellulaire (« Soft Agar Colony Formation assay ») ont été déterminés dans ces mêmes conditions.

Résultats

L'analyse bio-informatique à l'aide du logiciel de prédiction de cibles miRWalk combinée aux données transcriptomiques de carcinomes corticosurrénaliens publiées par le réseau national COMETE (de Reyniès et al, 2009) nous a permis d'identifier NDRG2 (N-myc Downstream Regulated Gene 2) et NDRG4 comme des gènes cibles potentiels de miR-483-5p et miR-139-5p, respectivement. Nous avons alors analysé les niveaux d'expression de NDRG2 et de NDRG4 dans la cohorte de carcinomes ayant servi à la mesure de l'expression de miR-483-5p et de miR-139-5p et avons observé une corrélation inverse entre les gènes cibles et leur miRNA régulateur. NDRG2 est sous-exprimé dans les carcinomes corticosurrénaliens comparés aux adénomes, alors que le niveau d'expression de NDRG4 est diminué uniquement dans les carcinomes agressifs versus non agressifs. De plus, l'interaction directe entre miRNA et ARNm cible a été confirmée par les tests du gène rapporteur luciférase : NDRG2 et NDRG4 étaient régulés négativement lors de la co-transfection avec miR-483-5p-mimétique et miR-139-5p-mimétique (diminution de l'activité luciférase sous le contrôle de leur régions 3'-UTR respectives). Enfin, la sous-expression de miR-483-5p et de miR-139-5p dans les cellules NCI H295R a induit une augmentation de l'expression des ARNms de NDRG2 et NDRG4. Par ailleurs, l'inhibition des oncomiRs miR-483-5p et miR-139-5p ou la ré-expression des miRs suppresseurs de tumeurs (miR-195 et miR-335) dans les cellules NCI H295R n'a pas affecté la prolifération cellulaire, les phases de cycle cellulaire ou l'apoptose. En revanche, nous avons montré que les cellules transfectées dans ces conditions avaient une moindre capacité à croître sans ancrage en gel d'agar ainsi qu'une moindre capacité invasive.

Conclusion

Nos données suggèrent un rôle de miR-483-5p et de miR-139-5p ainsi que de leurs gènes cibles respectifs NDRG2 et NDRG4 dans le phénotype agressif des carcinomes corticosurrénaliens. La fonction moléculaire exacte des membres de la famille de gènes NDRG n'est pas complètement identifiée à l'heure actuelle, mais notre étude renforce le rôle suppresseur de tumeurs de NDRG2 et NDRG4 dans le carcinome corticosurrénalien, comme cela a pu être montré dans d'autres types de tumeurs. Ces deux gènes sont corrélés au caractère agressif et au pronostic péjoratif dans d'autres types de cancers. De façon très intéressante, une hyperméthylation du gène NDRG2 corrélée à sa sous-expression dans les carcinomes corticosurrénaliens a été rapportée très récemment (Barreau et al, 2013). Il est probable que la régulation négative de NDRG2 par miR-483-5p contribue également à sa sous-expression. En effet, des régulations de NDRG2 mettant en jeu une hyperméthylation de son promoteur et une régulation post-transcriptionnelle par miR-650 ont été observées dans le cancer colorectal (Feng L et al, 2011). Les perspectives de ce travail viseront à approfondir nos résultats par des études in vivo, en particulier à évaluer ces miRNAs comme outils thérapeutiques sur un modèle de carcinome corticosurrénalien chez la souris en place au laboratoire.

Bourse de Fin de thèse SFE 2012 (20 K€)

Dr Audrey ROUSEAU
Direction **Pr Anne GUIOCHON-MANTEL & Dr Larbi AMAZIT**
INSERM U 693, Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Conséquences fonctionnelles des interactions entre le récepteur de la progestérone et ses corégulateurs transcriptionnels.

Résumé

Le récepteur de la progestérone (PR) est un facteur de transcription hormono-régulé. Pour activer ses gènes cibles, PR recrute différents partenaires moléculaires : les corégulateurs transcriptionnels tels que Jab1 et les protéines SRC-1,2 et 3.

Nous avons mis en évidence le caractère nécessaire de la dégradation des complexes PR/SRC-1 par le protéasome sous l'effet du ligand agoniste, pour l'activation de la transcription des gènes cibles de PR. Jab1 a été identifié comme un candidat possiblement impliqué dans la dégradation de ces complexes, et comme un cofacteur potentialisateur synergique de l'activité coactivatrice de SRC-1 et SRC-2.

Une détermination fine du rôle de Jab1 dans ces processus permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de PR et de ses cofacteurs régulateurs.

Abstract

The progesterone receptor (PR) is an hormono-dependent transcription factor. To activate its targets genes, PR recruites several molecular partners: transcriptional coreguators as Jab1 and the p160 proteins: SRC-1, 2 and 3.

We demonstrated that the agoniste ligand induced degradation of PR/SRC-1 complexes by the proteasome is necessary to activate PR target genes transcription. Jab1 was identified as a possible candidate implicated in these complexes degradation, and as a synergistic potentialisator of SRC-1 and SRC-2 coactivators' activity.

A fine determination of Jab1 role in these processes will permit to better understand the mecanisms of regulation of PR and its coregulators.

Rapport

Les récepteurs stéroïdes sont des facteurs de transcription hormono-régulés. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme (métabolisme, reproduction, …) mais également dans diverses maladies, en particulier les cancers hormonaux-dépendants. Ils appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et sont généralement activés par la liaison d'un ligand ou hormone, induisant le recrutement de multiples facteurs corégulateurs. Ces partenaires permettent alors de moduler l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires.

Mon projet de thèse a consisté à étudier les mécanismes d'interaction entre le récepteur de la progestérone (PR), impliqué dans de multiples aspects de la reproduction chez la femme, et ses corégulateurs transcriptionnels, en particulier Jab1 (c-Jun Activation Domain Binding Protein 1) et les protéines de la famille p160 : SRC-1, 2 et 3 (Stéroïd Receptor Coactivator).

J'ai ainsi pu mettre en évidence l'importance de la dégradation des complexes PR/SRC-1 par le protéasome sous l'effet du ligand agoniste de PR, et le caractère nécessaire de cette régulation négative pour l'activation de la transcription des gènes cibles de PR.

J'ai également identifié un candidat possiblement impliqué dans la dégradation des complexes PR/coactivateurs p160 : le corégulateur transcriptionnel Jab1. Au cours des 6 mois supplémentaires de thèse réalisés grâce au soutien de La Société Française d'Endocrinologie, j'ai étudié l'effet de Jab1 sur la stabilité, la (re)localisation subcellulaire ainsi que l'activité de ces complexes transcriptionnels.

En effet, Jab1 a été décrit comme un coactivateur des complexes PR-SRC-1 au laboratoire, et nous avons pu observer pour la première fois dans les cellules vivantes que, en présence d'hormone, Jab1 est transloqué dans le noyau où il co-localise avec le récepteur, pareillement au coactivateur SRC-1. Ces foci précis de colocalisation correspondent probablement à des sites actifs de transcription où les deux coactivateurs sont en interaction avec le récepteur.

De plus, des expériences de transfection ont montré d'une part, que hors du cadre de l'activation par l'hormone, Jab1 peut réguler négativement les niveaux d'expression de SRC-1 et SRC-2. D'autre part, avons montré que Jab1 agit comme un cofacteur du récepteur de la progestérone capable de potentialiser de façon synergique les effets coactivateurs de SRC-1 mais aussi ceux de SRC-2. En revanche, les résultats préliminaires montrent que Jab1 ne module pas de la même façon le niveau d'expression de SRC-3 et n'induit pas d'effet transcriptionnel potentialisateur en présence de ce coactivateur. Une approche soustractive par suppression de l'expression de Jab1 à l'aide de SiRNAs spécifiques permettra ultérieurement de conforter ces observations. Nous avons d'ores et déjà mis au point les conditions expérimentales de cette étude dans les cellules COS-7.

Enfin, nous avons mis au point les conditions expérimentales de l'étude de la dynamique des interactions entre PR et ses corégulateurs par la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Jab1 contient une activité enzymatique métalloprotéinase impliquée dans le processus de dégradation des protéines et de nombreuses études indiquent que la dégradation induite par Jab1 s'accompagne d'une relocalisation sub-cellulaire des protéines cibles. Celles-ci sont généralement exportées du noyau vers le cytoplasme des cellules afin d'y être protéolysées (Cope et al., 2002 ; Shackleford et Claret., 2010). Or, en l'absence ou en présence d'hormone, la dégradation de SRC-1 s'effectue principalement dans le cytoplasme (Tyagi et al., 1998). Cette technique d'imagerie de fluorescence dans les cellules vivantes permettant de visualiser et de localiser *in situ* les interactions protéiques et permettra de déterminer avec plus de précision la dynamique de formation et de dégradation des complexes PR/SRC-1/Jab1.

L'ensemble des résultats obtenus suggère effectivement que dans un contexte hormonal, Jab1 agit comme un adaptateur moléculaire permettant de moduler de manière simultanée les niveaux d'expression de ses deux partenaires et que c'est cette modulation dépendante du ligand qui garantit une transactivation efficace des gènes cibles de PR.

Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité transcriptionnelle de PR et de ses cofacteurs ainsi que l'implication du protéasome dans ces processus.

Bourses SFE « PARIS 2013 »

Bourse de Master 2 Ipsen 2013 (30 K€)

Dr Sarra SMATI-GRANGEON
Codirection **Dr Eric FRAMPAS & Dr Michel CHEREL**
INSERM U 892, Equipe 13, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes

Etude comparative des performances de détection des métastases de carcinome médullaire de la thyroïde CMT à l'aide de TEP-18FDG, TEP-18FDOPA et préciblage anti ACE en deux temps (TF2-IMP288 marqué au 68Ga).

Résumé

Le carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) est une tumeur neuroendocrine rare dont le pronostic varie selon la prise en charge initiale. La détection précoce des métastases joue un rôle crucial dans la prise en charge. Les moyens de détection actuels dans cette indication sont plutôt décevants avec des sensibilités variables mais médiocres. Les performances de détection en tomographie par émission de positons (TEP) avec le principe de préciblage immunologique par un anticorps anti-ACE (TF2) couplé à un peptide (IMP288) radiomarqué au ^{68}Ga ont été comparées à celle du ^{18}F-FDG et du ^{18}F-DOPA.

Des souris immunodéficientes ont reçu des xénogreffes sous cutanée de cellules TT humaines de CMT. Ces souris ont ensuite eu une imagerie par TEP/scanner TF2-^{68}Ga IMP288, ^{18}F-FDG ou ^{18}F-DOPA puis ont été immédiatement sacrifiées pour étude de biodistribution.

Le pourcentage de dose injectée par gramme (%DI/g) de la tumeur était plus élevé pour le ^{18}F-FDG mais de façon relative au bruit de fond, les rapports %DI/g de la tumeur sur le %DI/g des organes avoisinants étaient meilleurs pour le préciblage. Les mesures d'activité de la tumeur en biodistribution étaient corrélées aux mesures d'activité en TEP. La TEP avec préciblage permettait d'obtenir de meilleurs contrastes que le ^{18}F-FDG et le ^{18}F-DOPA. La sensibilité de détection des tumeurs de la TEP TF2-^{68}Ga IMP288 était de 100% (15/15) alors que celle du ^{18}F-FDG n'était que de 67% et celle du ^{18}F-DOPA de 50% (p=0,042 et p=0,015 respectivement).

En conclusion, le préciblage TF2-^{68}Ga IMP288 permettait de diminuer le bruit de fond en TEP et donc d'améliorer ainsi les contrastes de l'image. Cela se traduisait par une meilleure sensibilité de l'examen pour la détection de tumeurs de CMT sous cutanées.

Abstract

The medullary thyroïd carcinoma (MTC) is a rare neuroendocrine tumor with variable prognosis. This prognosis depends on the initial management and the early detection is very important. The current methods are disappointing with variable sensitivities. Diagnostic performance of pretargeted immuno-PET using a bispecific anti-carcinoembryonic (CEA) antibody (TF2) and a ^{68}Ga-labeled hapten (IMP288) have been compared with ^{18}F-FDG and ^{18}F-DOPA PET.

Immunodeficient mice were implanted with CEA-expressing human MTC cells. ^{68}Ga-TF2 IMP288 PET-scan and ^{18}F-FDG or ^{18}F-DOPA PET-scan were performed. After imaging, mice were immediately euthanized for biodistribution study.

The tumor percentage injected dose per gram tissue (%ID/g) was higher with ^{18}F-FDG, but in relative to the background signal, the reports tumor %ID/g on neighbouring organs %ID/g were better with pretargeting. Tumor activity measurements in biodistribution were correlated with PET activity measurements. We obtained better contrasts with pretargeted PET than ^{18}F-FDG and ^{18}F-DOPA. Tumor sensitivity detection with TF2-^{68}Ga IMP288 was 100% (15/15) whereas it was only 67% with ^{18}F-FDG and 50% with ^{18}F-DOPA (respectively p=0,042 and p=0,015).

In conclusion, TF2-^{68}Ga IMP288 pretargeting allowed to reduce PET background signal and thus to improve image contrasts. MTC tumor detection sensitivity was better with pretargeting.

Rapport

Le but du travail était de comparer à l'aide d'un modèle murin, les performances de détection de tumeurs de carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) sous cutanées par imagerie TEP ^{18}F-FDG, ^{18}F-DOPA et TEP en 2 temps avec préciblage anti-ACE couplé à un peptide radiomarqué (^{68}Ga). Pour cela, nous avons étudié dans un premier temps la biodistribution des radiotraceurs dans des conditions décrites comme optimales antérieurement, puis la corrélation entre les mesures d'activité en biodistribution et celles en imagerie TEP. Dans un second temps, nous avons étudié les différences de contraste en imagerie entre la tumeur et les organes avoisinants, ainsi que la sensibilité de détection de la tumeur par chaque traceur.

Des souris immunodéficientes (Nude) ont été xénogreffées en sous-cutané à l'aide de cellules humaines de CMT. Chaque souris a une imagerie TEP par l'un des 3 traceurs, 8 souris ont pu avoir à la fois une TEP avec préciblage puis une TEP ^{18}F-FDG (Figure 1).

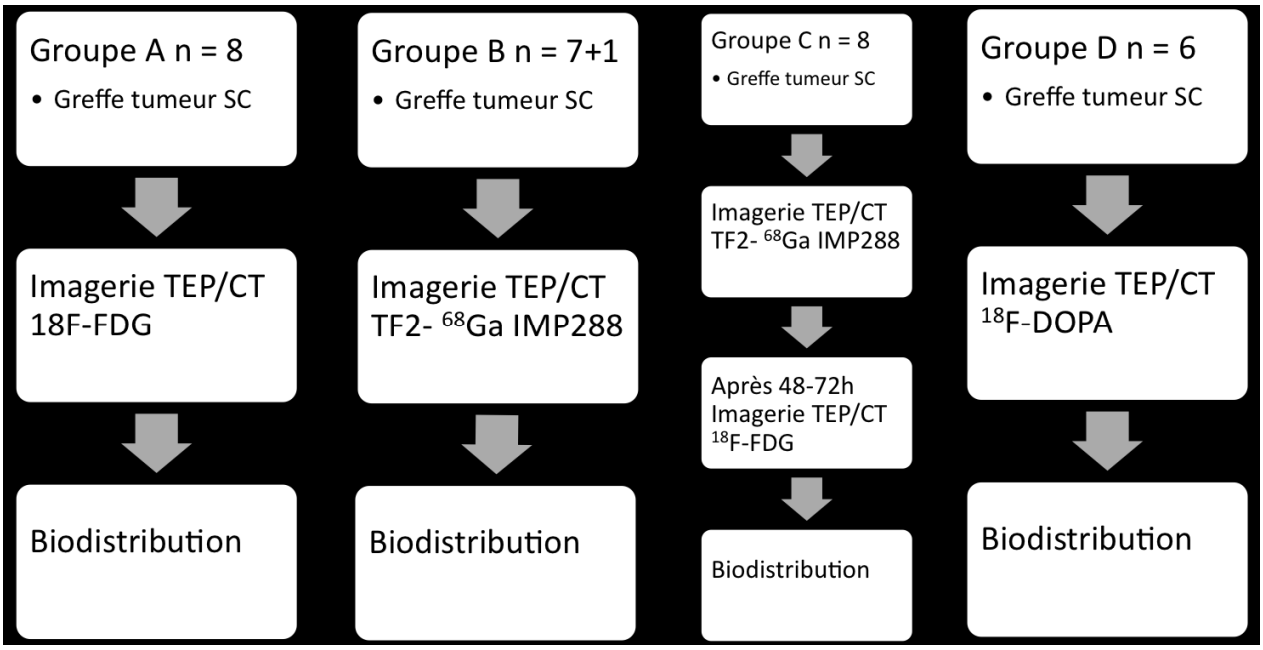


Figure 1 : Organisation des groupes de souris

Les souris Nude étaient organisées en 4 groupes décrits ci-dessus. Dans le groupe B, une des 8 souris a reçu le peptide IMP288 marqué au gallium sans injection préalable de TF2, faisant ainsi référence de contrôle négatif.

Une étude de biodistribution a été réalisée après dissection des souris et mesure de l'activité de chaque organe par un compteur gamma. Pour le traceur ^{18}F-FDG, le pourcentage de dose injectée par gramme (%DI/g) était plus que élevé que celui du préciblage, non seulement pour la tumeur ($p=0,529$) mais aussi pour tous les organes ($p<0,03$). Les rapports du ^{18}F-FDG et ceux du ^{18}F-DOPA ont été comparés à ceux du préciblage TF2-^{68}Ga IMP288. Dans le 2 cas les rapports du préciblage TF2-^{68}Ga IMP288 étaient plus élevés que ceux des 2 autres traceurs de manière significative ($p<0,03$).

Pour comparer les performances de détection des tumeurs, il est important de juger du contraste de l'image, c'est à dire le signal de la tumeur en comparaison au bruit de fond. Pour cela, l'activité maximale de la tumeur mesurée en TEP (activité comprise entre 90 à 100% du maximum) a été rapportée à l'activité globale de chaque organe environnant la tumeur. Les rapports obtenus avec le préciblage étaient meilleurs que ceux des 2 autres traceurs de manière significative ($p<0,002$) sauf pour le rapport tumeur sur foie en préciblage versus ^{18}F-FDG ($p=0,085$) (Figure 2).

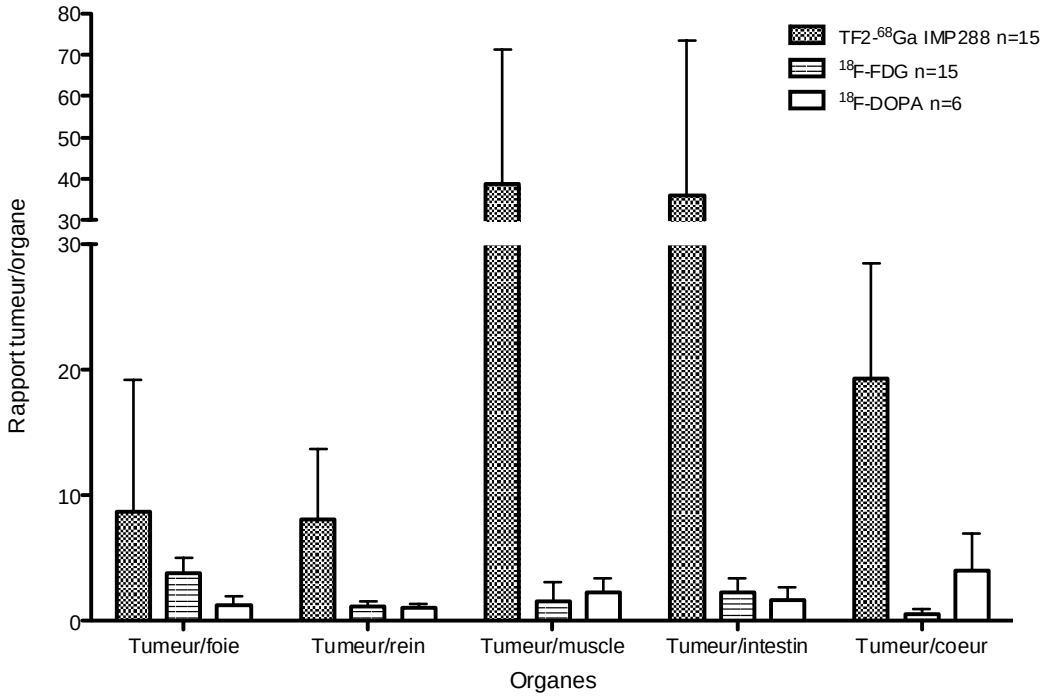


Figure 2 : Rapports d'activité tumeur/organes avoisinants en imagerie TEP

Les rapports sont calculés en divisant l'activité mesurée au niveau de la tumeur sur l'imagerie (Bq/ml) par l'activité mesurée sur les organes (Bq/ml).

Les sensibilités de détection des tumeurs par les différentes imageries ont été calculées. Le préciblage TF2-^{68}Ga IMP288 avait une sensibilité de 100% (15/15), celle du ^{18}F-FDG n'était que de 67% et celle du ^{18}F-DOPA de 50% (p=0,042 et p=0,015 respectivement).

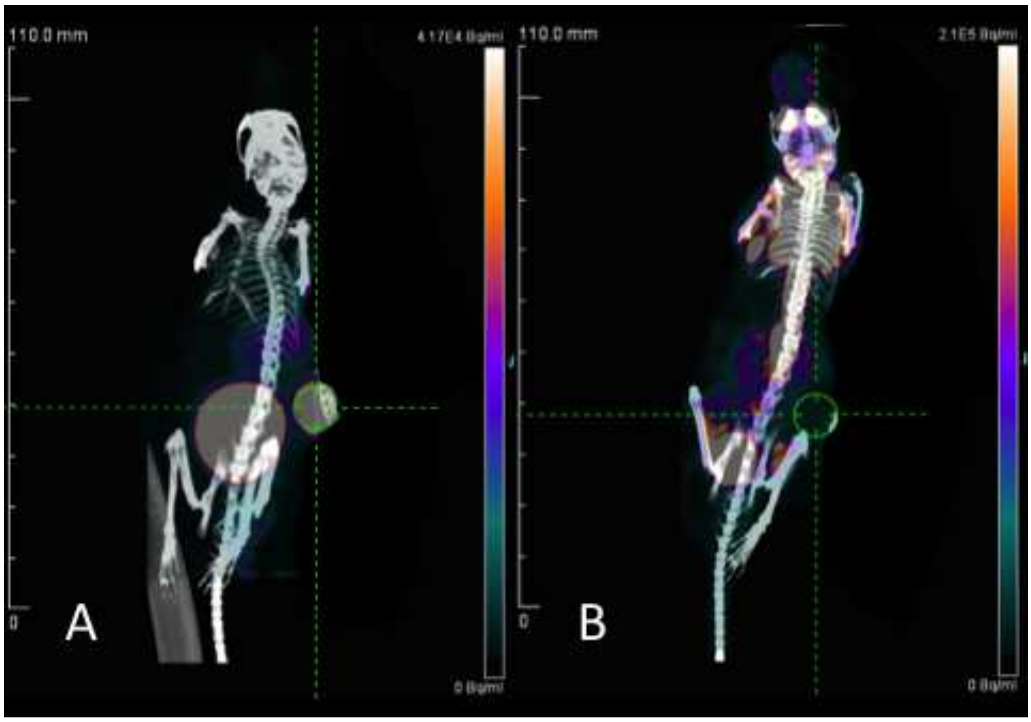


Figure 3 : Imagerie TEP/scanner avec TF2-^{68}Ga IMP288 et ^{18}F-FDG

La figure A représente l'imagerie TEP/scanner par préciblage TF2-^{68}Ga IMP288 chez une souris en décubitus ventral, xénogreffée sur le flanc droit.

La figure B représente cette même souris en imagerie TEP/scanner ^{18}F-FDG, il n'y pas de signal sur la tumeur.

La plus petite tumeur vue en préciblage mesurait 43 mm^3 et pesait 41 mg. Cette tumeur était également détectée en ^{18}F-FDG. Il n'y avait pas de différence significative entre le poids des tumeurs détectées en ^{18}F-FDG (médiane 0,270 g) et celui des tumeurs non détectées (médiane 0,265 g). En revanche, les tumeurs détectées en ^{18}F-FDG avait une croissance significativement plus rapide (médiane de 40,5 jours) que celles qui n'étaient pas détectées (médiane était de 76,9 jours). Concernant le ^{18}F-DOPA, il n'y avait pas de différence significative entre les tumeurs détectées et non détectées pour le poids et le temps de croissance.

En conclusion, la TEP avec préciblage TF2-^{68}Ga IMP288 apparaît comme une technique d'imagerie prometteuse quant à la détection de métastases de CMT. Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence dans un modèle murin ayant reçu une xénogreffe de cellules de CMT d'origine humaine, une meilleure sensibilité de détection des tumeurs que les méthodes de référence ^{18}F-FDG et ^{18}F-DOPA. Le préciblage a permis également d'obtenir de meilleurs contrastes avec des rapports de signal de la tumeur sur celui des organes avoisinants supérieurs à ceux des méthodes de référence.

Bourse de Master 2 mutualisée Lilly & SFE 2013 (30 K€)

Dr Julie BEAUVY
Direction **Dr Chang ZHANG**
INSERM U S7 – CNRS UMS 3453, Equipe 4 : Différenciation endocrine : interaction avec la tumorigénèqe et la progression tumorale, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, Lyon

Rôle des oncoprotéines Maf, nouveaux partenaires du suppresseur de tumeur menin, dans le contrôle de la prolifération des tumeurs hypophysaires.

Rôle des oncoprotéines MafB dans les cellules endocrines ante-hypophysaires.

Résumé

Les adénomes hypophysaires peuvent s'intégrer dans la Néoplasie Endocrinienne Multiple de type I, devenant plus fréquemment des macro-adénomes invasifs (1). L'étude de la tumorigénèse dans ce syndrome permet de caractériser l'agressivité de tumeurs sporadiques. Dans les insulinomes de souris « MEN1Knock out », une expression ectopique de MafB est responsable de la prolifération cellulaire (2). Nous avons ensuite révélé une expression ectopique de MafB dans 25% des prolactinomes de souris « MEN1 knock-out ».

L'OBJECTIF : principal était d'analyser l'expression de MafB dans l'hypophyse humaine normale et tumorale.

MATERIEL : Nous avons effectué une immunohistochimie sur 11 hypophyses normales juxta-tumorales et 15 adénomes hypophysaires sporadiques (laboratoire d'anatomie pathologiques, CHU de Lyon-Est).

RESULTATS : Quatre-vingt-deux pourcent des hypophyses normales humaines expriment fortement MafB, dans la majorité des cellules endocrines. Les adénomes hypophysaires humains ont, quant à eux, une expression diminuée et hétérogène de MafB. Au total, dans 87% des tumeurs hypophysaires, l'expression nucléaire de MafB est diminuée, au moins en partie.

CONCLUSION : Notre étude est la première à caractériser l'expression de MafB dans l'hypophyse humaine, probablement un facteur clé de différentiation des cellules antéhypophysaires. La perte d'expression dans de nombreuses tumeurs serait un marqueur de dédifférenciation tumorale. Nos résultats nous encouragent à poursuivre ce travail sur un plus grand effectif.

(1) Trouillas (2008) Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. AmJSurgPathol

(2) ***Lu (2012) Reexpression of oncoprotein MafB in proliferative beta-cells and Men1 insulinomas in mouse. Oncogene***

Bourse de Master 2 mutualisée Merck Serono & SFE 2013 (30 K€)

Dr Vanessa BOEHM
Direction **Pr Bruno FEVE**
INSERM UMR U 938, Equipe Lipodystrophies génétiques et acquises, Université Paris 6, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Paris

Biologie intégrative et physiologie spécialité nutrition.

Résumé

A long terme, l'excès de glucocorticoïdes (GC) induit un diabète, une prise de poids, et une lipodystrophie. L'action des GC sur les tissus adipeux (TA) est en particulier relayée par le récepteur des GC (GR), dont le rôle reste cependant mal documenté. Afin de déterminer l'impact du GR adipocytaire sur le développement de la lipodystrophie et de la résistance à l'insuline, nous avons généré un modèle murin d'invalidation spécifique et inductible du GR dans l'adipocyte (GR-KO^{adipoqCreERT2}). Après induction par le tamoxifène, l'expression du GR est diminuée de 50% dans les TA, et s'éteint presque totalement dans les adipocytes de ces TA, validant ainsi notre modèle d'invalidation. Sous régime standard, nous n'avons pas observé de différence phénotypique majeure. Ces souris sont actuellement soumises à un régime hyperlipidique, ce qui permet de démasquer un phénotype métabolique. Le développement de ce modèle est un outil privilégié pour la compréhension et l'identification de nouveaux mécanismes par lesquels le GR adipocytaire pourrait contribuer à la lipodystrophie et aux troubles métaboliques associés à un hypercorticisme iatrogène ou endogène.

Mots clés : récepteur des glucocorticoïdes, tissu adipeux, lipodystrophie, insulino-résistance, invalidation spécifique et inductible

Abstract

Glucocorticoids (GC) are often prescribed for their anti-inflammatory and immunosuppressive effects. However, GC long-term overexposure leads to glucose intolerance, steroid-induced diabetes and weight gain associated with lipodystrophy (visceral adipose tissue (vAT) expansion at the expense of subcutaneous tissue (scAT)). GC actions on adipose tissue development are mainly mediated by the GC receptor (GR), which precise involvement remains poorly understood. In order to determine the role of the adipocyte GR in the emergence of lipodystrophy and metabolic disorders, we generated a mouse model of inducible adipose-specific GR knock-out (GR-KO^{adipoqCreERT2}). Our results show that GR gene expression is decreased by 50% in adipose tissue of GR-KO mice, and almost completely in the adipocyte fraction. Although there was no impact on body weight in both groups, there was a trend for a higher weight of scAT in GR-KO mice than in controls. Under standard diet, GR-KO mice had a normal phenotype, similar to control mice. These mice are currently subject to a high fat diet that unmasks a metabolic phenotype. The development of this model is a key tool for understanding and identifiying new mechanisms by which in adipocyte, GR could contribute to lipodystrophy and metabolic disorders associated with endogenous or iatrogenic hypercorticism.

Keywords : glucocorticoid receptor, adipose tissue, lipodystrophy, insulin resistance, inducible and adipose-specific knock-out

Rapport

Au cours de ce stage encadré par le Dr M Moldes, j'ai participé à la genèse et la validation d'un nouveau modèle de souris invalidées pour le GR spécifiquement dans les TA et de manière inductible (GR-KO$^{adipoqCre\text{-}ERT2}$). Pour cela, nous avons croisé des souris de deux lignées transgéniques existantes, les souris GR-KO$^{lox/lox}$ et les souris adipoqCRE-ERT2. Ce travail a été réalisé en collaboration, d'une part avec une équipe allemande qui a généré le modèle de souris transgéniques exprimant la recombinase CRE-ERT2 sous le contrôle du promoteur de l'adiponectine, un gène spécifiquement exprimé dans les TA, et de façon inductible par le tamoxifène (Souris adipoqCre-ERT2 ; Dr S Offermanns, Allemagne), et d'autre part, avec les équipes des Drs B. Blondeau et F. Tronche qui disposent de la lignée murine loxée pour le GR (Paris, France).

Les **objectifs de mon travail** étaient de générer les souris d'intérêts, GR-KO$^{adipoqCRE\text{-}ERT2}$, issues des croisements, d'établir le protocole d'invalidation par le tamoxifène et de valider ce nouveau modèle murin par différentes approches cellulaires, moléculaires et des manipulations physiologiques.

1. Protocole d'invalidation du GR de façon inductible par le tamoxifène

Afin de définir le protocole d'invalidation, nous avons testé les modalités d'administration (croquettes ou injection intra-péritonéale) ainsi que de l'âge de traitement des souris pour limiter l'impact du tamoxifène, un modulateur sélectif du récepteur des estrogènes, sur le développement sexuel. Le protocole retenu implique l'administration par voie intra-péritonéale de tamoxifène à des souris adultes âgées de 8 semaines (75 µg/g) pendant 3 jours consécutifs. Ce mode d'administration assure à chaque souris une quantité équivalente de tamoxifène. Nous avons également vérifié que l'administration de tamoxifène n'entraînait aucune répercussion sur la prise du poids et l'équilibre glycémique des souris.

2. Validation du modèle murin d'invalidation spécifique du GR dans les TA

Les souris ont été euthanasiées 2 semaines après la fin du traitement par tamoxifène et les différents TA (sous-cutané, viscéral [gonadique et péri-rénal], et brun interscapulaire) et organes non-adipeux (foie, cœur, rein, muscle, thymus et rate) ont été prélevés et congelés. L'analyse de ces différents tissus par RT-qPCR montre une diminution de l'expression du récepteur des glucocorticoïdes (GR) de l'ordre de 50% dans le TA brun et le tissu adipeux sous-cutané (TASC) des souris GR-KO par rapport aux souris témoins. Dans les tissus adipeux viscéraux (TAV) (gonadique et péri-rénal), on observe une tendance à la diminution de l'expression du GR chez les souris GR-KO. Comme attendu, il n'existe pas de différence d'expression du GR entre les organes non-adipeux des souris GR-KO et leurs témoins.

Nous avons émis l'hypothèse que la diminution partielle d'expression du GR était liée au fait que le TA est un tissu hétérogène constitué d'adipocytes mais aussi de nombreux autres types cellulaires dans lesquels le GR n'a pas été invalidé. L'isolement des fractions adipocytaire et stroma-vasculaire (FSV) au niveau du TASC de souris témoins et GR-KO puis l'analyse des niveaux d'expression du GR au sein de ces fractions par RT-qPCR ont montré une diminution drastique de l'expression du GR dans la fraction adipocytaire des souris GR-KO. Ainsi, ces données suggèrent que la persistance d'expression du GR dans certains dépôts adipeux est liée à la présence de types cellulaires autres que les adipocytes.

3. Suivi clinico-biologique des souris GR-KO^{adipoqCreERT2} soumises à un régime standard

Un suivi clinico-biologique a été réalisé pendant 5 semaines après l'administration de tamoxifène. Aucune différence pondérale ou de l'équilibre glycémique n'a été observée au cours du suivi chez les animaux GRKO et témoins, tous sexes confondus, soumis à un régime standard de type Chow Diet.

En raison de l'absence de différence d'équilibre glycémique, nous avons réalisé des tests de tolérance au glucose par voie orale et de sensibilité à l'insuline. Ces tests ont été réalisés, après 4 heures de jeûne, à 4 jours d'intervalle, chez les mêmes souris.

Nous n'avons pas observé de différence entre les mâles GR-KO et témoins lors du test de tolérance au glucose par voie orale et de sensibilité à l'insuline. Chez les femelles, l'absence de GR dans les TA s'associe à une meilleure tolérance au glucose des souris GR-KO sans modification de la sensibilité à l'insuline et à une augmentation plus marquée du taux plasmatique d'insuline. Ces résultats évoquent donc une meilleure sécrétion d'insuline chez les souris femelles invalidées pour le GR dans les TA, ce qui devra être analysé en détail.

Conclusion et perspectives

Au cours de l'année financée par la SFE, j'ai réalisé un Master 2 à l'université de Paris 6 et obtenu mon diplôme avec mention très bien. J'ai également découvert le monde du laboratoire au cours de mon stage de 8 mois au sein de l'équipe « Lipodystrophies génétiques et acquises » dirigée par le Pr B. Fève. Ce travail nous a permis de générer un nouveau modèle murin d'invalidation du GR adipocytaire, qui permettra d'identifier la contribution propre de ce récepteur à la survenue d'une lipodystrophie, et à l'apparition d'anomalies métaboliques systémiques. L'étude de ces souris est actuellement poursuivie par une étudiante en première année de thèse. Un phénotypage métabolique a été réalisé sur les souris GR-KO et témoins soumises à un régime standard ou hyperlipidique (HF) pendant 4,5 mois et montre des résultats tout à fait encourageants.

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2013 (30 K€)

Dr Laure CAZABAT
Direction **Pr Sylvia ASA & Pr Shereen EZZAT**
Endocrinologie, Diabétologie et maladies métaboliques, CHU Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt (Mobilité 12 mois 2013-2014 vers Toronto, Canada***)***
Endocrine Oncology laboratory, Princess Margaret Cancer Program, Princess Margaret Hospital Ontario Cancer Institute (OCI), University of Toronto, University Health Network (UHN)

Rôle du polymorphisme du récepteur de FGF de type 4 (FGFR4, fibroblast growth factor receptor 4), FGFR4-G388R, dans le corticosurrénalome.

Le Rôle de Autotaxin/Enpp2 dans la tumorigenèse hypophysaire et l'activité endocrine.
Ce titre devient : Etude du rôle d'ENPP2 dans la tumorigenèse hypophysaire.

The Role of Autotaxin/Enpp2 in Pituitary Cell Growth, Survival and Hormonal Activity.

Résumé
L'Autotaxin (ATX)/ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (Enpp2) est une phospholipase qui produit l'acide lysophosphatidique (LPA) activant des récepteurs couplés aux proteines G spécifiques. ATX/Enpp2 est essentiel pour le développement. La surexpression de ATX ou du récepteur au LPA est corrélée à la malignité, invasivité, la chimiorésistance et le mauvais pronostic de tumeurs. Dans cette étude nous montrons que ATX/ENPP2 est exprimé dans l'hypophyse où il augmente la prolifération cellulaire et la sécrétion hormonale dans des lignées cellulaires somatotrope et corticotrope. Il module des facteurs impliqués dans l'apoptose comme p27, p21 et pRB. ATX/ENPP2 parait une cible thérapeutique potentielle car impliqué dans l'action des analogues de la somatostatine.
Nous montrons qu'ATX/ENPP2 est un nouvel acteur impliqué dans la tumorigenèse hypophysaire et l'activité endocrine.

Abstract
Autotaxin (ATX)/ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (Enpp2) is a phospholipase that generates lysophosphatidic acid (LPA) serving to activate G protein-coupled receptors. ATX/Enpp2 is essential for normal development. Overexpression of ATX or LPA receptor correlates with malignity, invasiveness, chemoresistance, bad prognosis of tumors. Here we show that ATX/Enpp2 is expressed in the pituitary where it increases cell proliferation as well as hormonal secretion in somatotroph and corticotroph cell lines; it serves to modulate multiple components of the apoptotic pathway including p27, p21, and pRB. Importantly, ATX/Enpp2 serves as a therapeutic target mediating the action of pharmacologic somatostatin analogs.
These results uncover ATX/Enpp2 as a new actor in pituitary tumorigenesis and endocrine activity.

Travaux

Grâce au soutien de la SFE et Novartis Pharma, j'ai pu réaliser un projet de 12 mois à l'étranger au Canada, dans le laboratoire d'oncologie endocrine du Dr Asa et du Dr Ezzat, au sein de l'institut du cancer d'Ontario à Toronto (OCI, Ontario Cancer Institute).

1) Le projet initial portait sur le *« Rôle du polymorphisme du récepteur de FGF de type 4 (FGFR4, fibroblast growth factor receptor 4), FGFR4-G388R, dans le corticosurrénalome. »*

En effet, la surexpression du récepteur FGFR4 dans le corticosurrénalome est associée à un mauvais pronostic. Le SNP FGFR4-G388R est associé à une évolution défavorable et à la résistance thérapeutique dans de nombreux cancers. L'objectif était d'étudier l'implication du SNP FGFR4-G388R dans les corticosurrénalomes.

Au sein du laboratoire d'oncologie endocrine de Toronto, j'ai eu accès un modèle de souris génétiquement modifié qui présente la forme R385, à l'état WT, hétérozygote et homozygote. J'ai étudié les surrénales de ces souris. J'ai découvert que les femelles R385 hétérozygote et R385 homozygote à 12 mois présente plus de tumeurs des surrénales que les autres génotypes, et des tumeurs avec plus d'inflammation.

Afin d'étudier au mieux cette prédisposition aux tumeurs des surrénales chez la souris en fonction du type de FGFR4, j'ai réalisé le croisement de ces souris avec une lignée portant une mutation de P53. Les mutations de la protéine P53 sont impliquées dans la formation de nombreux cancers ; elles sont présentes dans 30% des cancers de la surrénales et sont corrélées à l'agressivité tumorale. L'objectif est de favoriser l'apparition des tumeurs de la surrénales chez les souris FGFR4. Les souris hétérozygotes (n'ayant qu'un seul exemplaire du gène muté, l'autre étant normal) pour la mutation P53 ont des tumeurs apparaissant entre 12 mois et 18 mois. J'ai donc créé six groupes de 10 souris chacun, dans chaque sexe : les trois possibilités génétiques de FGFR4 si dessus sans mutation de P53, et les trois avec la mutation de P53 présente à l'état hétérozygote.

J'ai réalisé des mesures de la sécrétion d'hormones de la surrénale chez toutes ces souris pour permettre de corréler les différents terrains génétiques, à l'hyperactivité endocrine éventuelle. Les surrénales de ces souris, mais aussi les autres organes endocrines en particulier l'hypophyse, seront étudiés entre l'âge de 18 mois. J'ai appris lors de cette année à prélever tous les organes endocrines chez la souris. Ce projet sera donc poursuivi au sein du laboratoire du Dr Ezzat et du Dr Asa ; je serai impliquée dans les travaux futurs sur ces souris.

En raison de l'absence de résultats concrets à attendre à la fin de ma mobilité, les souris étant à sacrifier 18 mois plus tard, j'ai eu l'occasion de finaliser un travail en cours dans le laboratoire : le rôle d'ENPP2 dans la tumorigenèse hypophysaire.

2) Projet réalisé : Etude du rôle d'ENPP2 dans la tumorigenèse hypophysaire

L'Autotaxine (ATX)/ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (Enpp2) est une phospholipase qui produit l'acide lysophosphatidique (LPA) activant des récepteurs couplés aux protéines G spécifiques. ATX/Enpp2 est essentiel pour le développement. La surexpression de ATX ou du récepteur au LPA est corrélée à la malignité, invasivité, la chimiorésistance et le mauvais pronostic de tumeurs. L'expression de ATX/Enpp2 est une cible connue du facteur de transcription CtBP1 (C-terminal binding protein 1).

Le laboratoire du Pr ASA et Pr EZZAT a montré que la protéine Ikarios interagit avec CtBP1, les deux expressions induites par l'hypoxie pour moduler la proliferation cellulaire hypophysaire et le développement. **Le projet est de déterminer le rôle éventuel d'autotaxine/ENPP2 dans la tumorigénèse hypophysaire.**

Nous avons utilisé des lignées stables avec déficit en ENPP2 (ShENPP2) dans des somatotropes GH4 et corticotropes ATT20. Nous avons montré que l'inactivation de ENPP2 est corrélée à une diminution de la prolifération cellulaire, partiellement compensée par le traitement par LPA. Le déficit en ENPP2 provoque un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de la sensibilité à l'hypoxie ; il est également responsable d'une diminution de la synthèse et la sécrétion hormonale. De plus, nous avons montré que le déficit en ENPP2 inhibait l'action freinatrice du pasiréotide sur les cellules corticotropes.

Ce travail a été présenté en poster à l'ENDO 2015. Les remerciements pour la SFE et Novartis pharma y figurent. L'article sur ce travail est en cours de finalisation.

Je demande que le titre du projet soit modifié et soit indiqué : « **Etude du rôle d'ENPP2 dans la tumorigenèse hypophysaire ».**

Je remercie Novartis Pharma et la Société Française d'Endocrinologie pour avoir rendu possible ma mobilité d'un an à l'étranger sur des travaux sur le cancer de la surrénale et la tumorigenèse hypophysaire qui pourront être poursuivi pour une partie dans mon université à mon retour et être source de collaboration internationale.

Poster

ENPP2 links the hypoxic transcriptional response with G-Protein coupled signaling to control pituitary cell survival and hormone secretion. Laure CAZABAT, MD PhD(1), Sylvia L. ASA, MD PhD(1), Shereen EZZAT, MD PhD(2) ((1) University Health Network, Toronto, ON, Canada; (2) University Health Network, University of Toronto, ON, Canada).

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2013 (30 K€)

Dr Nicolas de ROUX
Direction lui-même **& M. Pierre GRESSENS**
INSERM U 1141, Equipe 3 : Genetics and Physiology of Pubertal Onset, Université Paris Diderot, Hôpital Robert Debré, Paris

Rôle de la rabconnectin-3alpha dans la régulation centrale de l'axe gonadotrope.

Rôle de la rabconnectin-3 dans la régulation centrale de l'axe gonadotrope.

Résumé

L'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH) est une pathologie rare dont les mécanismes commencent à être mieux connus grâce notamment à la génétique humaine. Notre équipe a récemment caractérisé la cause génétique d'un nouveau syndrome comprenant un CHH associé à une hypothyroïdie centrale, des troubles de la glycorégulation mais également une polyneuropathie périphérique et un retard mental. Ce phénotype était dû à une haploinsuffisance de Dmxl2. Ce gène code pour une protéine vésiculaire qui participe au contrôle de la sécrétion régulée. L'analyse fine des mécanismes neuroendocriniens du déficit gonadotrope dans une lignée de souris hétérozygotes pour un allèle délité de Dmxl2 dans les neurones (Nes::Cre ;Dmxl2$^{wt/loxp}$), a montré une infertilité complète associée à une baisse du nombre de neurones GnRH, une anomalie de la morphologie de ces neurones et finalement une absence de réponse aux kisspeptines chez la souris adulte. Ce résultat montre que la maturation post-natale des neurones GnRH est perturbée chez les souris Nes::Cre ;Dmxl2$^{wt/loxp}$. Ce travail ouvre de nouvelles possibilités pour comprendre les mécanismes du déficit gonadotrope mais également la maturation post-natale du control central de la reproduction. Le prix Pfizer a permis le financement de l'exploration du phénotype des souris KO.

Abstract

Congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH) is a rare disorder whose mechanisms are becoming better known thanks to human genetics. Our team has recently characterized the genetic cause of a new syndrome including CHH, an abnormality of the glycoregulation, a central hypothyroidism, but also a peripheral polyneuropathy, and a mental disability. This phenotype was due to a haploinsufficiency of *Dmxl2*. This gene encodes a vesicular protein that participates in the control of the regulated secretion. The analysis of neuroendocrine mechanisms of the gonadotropic deficiency in a conditional neuronal *Dmxl2* mouse line (*Nes::Cre ;Dmxl2*$^{wt/loxp}$), showed a complete infertility associated with a decrease in the number of GnRH neurons, an abnormality of the morphology of these neurons and ultimately a lack of response to kisspeptines in adult mice. Altogether, these results show that the postnatal maturation of GnRH neurons is disturbed in *Nes::Cre; Dmxl2*$^{wt/loxp}$ mice. Such mechanism has never been described. This work opens new possibilities for understanding mechanisms of CHH but also the postnatal maturation of the central control of reproduction. The Pfizer Prize has funded the exploration of the phenotype of *Nes::Cre ;Dmxl2*$^{wt/loxp}$ mice.

Publications

Tata, B., Huijbregts, L., Jacquier, S., Csaba, Z., Genin, E., Meyer, V., Leka, S., Dupont, J., Charles, P., Chevenne, D., Carel, J.C., Leger, J., and de Roux, N.,
Haploinsufficiency of dmxl2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of GnRH neurons in mouse.
PLoS Biol, 2014. 12(9): p. e1001952.

Tata, B. Csaba, Z. Jacquier, S. and de Roux, N.
Evidence for the requirement of the vesicular Protein Rabconnectin3-α in the activation and maturation of the GnRH neuronal network.
Soumis pour publication.

Rapport

Notre équipe composée de Pédiatres Endocrinologues, de Généticiens Moléculaires, et de Neuroendocrinologues, (hôpital Robert Debré, Paris) a récemment découvert le lien entre la perte de fonction de la rabconnectin-3α et un phénotype complexe comprenant un déficit gonadotrope, une ataxie, une polyneuropathie, un retard mental et des anomalies du contrôle de la glycémie. Ce nouveau syndrome appelé « PolyEndocrine-PolyNeuropathie Syndrome » (PEPN Syndrome, OMIM #616113) a été caractérisé chez trois frères nés de parents consanguins. Une cartographie du génome a montré une délétion homozygote de 15 nucléotides responsable d'une diminution significative de l'expression de DMXL2 qui est le gène codant la rabconnectin-3α. La fonction de cette protéine était très peu connue lorsque nous avons obtenu ces résultats de génétique. Une équipe Japonaise avait proposé que la rabconnectin-3α pourrait participer aux mécanismes de l'exocytose des vésicules synaptiques. Ce résultat suggérait fortement un lien entre le phénotype observé comprenant un déficit gonadotrope partiel et l'activité synaptique. Des travaux plus récents indiquent que la rabconnectin-3α participe au contrôle de l'activité de la v-ATPase ce qui renforce cette hypothèse.

Comprendre les mécanismes de la plasticité synaptique des neurones GnRH est d'une importance cruciale pour comprendre la physiologie de la puberté mais également les maladies de l'initiation de la puberté ainsi que les mécanismes du contrôle central de l'ovulation. Ce lien entre la baisse de l'expression d'une protéine synaptique et un déficit hormonal complexe dont un déficit gonadotrope, nous a semblé suffisamment novateur et potentiellement riche d'enseignement sur les mécanismes du contrôle de la sécrétion hormonale, pour entreprendre un vaste projet de la compréhension de la fonction de la rabconnectin-3α.

Le but du projet de recherche financé par le Prix SFE-Pfizer 2013 était de comprendre les mécanismes du déficit gonadotrope observé dans le PEPN syndrome.

Pour répondre à cet objectif, nous avons produit une lignée de souris dont Dmxl2 est inactivé dans les neurones par le croisement de souris *Dmxl2*$^{lox/lox}$ avec des souris Nes::Cre. Ceci a permis l'obtention de souris hétérozygotes *Nes::cre ;Dmxl2*$^{wt/loxp}$. Aucune souris homozygote *Nes::cre ;Dmxl2*$^{loxp/loxp}$ n'a été obtenue. Nous avons en effet démontré que la perte de fonction complète de *Dmxl2* dans les neurones était létale quelques minutes après la naissance suite à une probable anomalie de la commande centrale de la respiration. Nos résultats montrent que la perte complète de Dmxl2 dans toutes les cellules entraine un arrêt très précoce du développement. L'expression de Dmxl2 dans les neurones est donc indispensable à la vie post-natale. Les souris *Nes::cre ;Dmxl2*$^{wt/loxp}$ sont infertiles malgré un développement somatique normal. Nous avons montré que cette infertilité est due à un déficit gonadotrope partiel isolé. La réponse hypophysaire à une stimulation par la GnRH étant normale chez ces souris, nous avons supposé un déficit GnRH. En effet, nous avons observé une diminution de 30% des neurones GnRH dans la région OVLT de l'hypothalamus et une augmentation significative des neurones GnRH immatures. Finalement, nos résultats montrent que la rabconnectin-3a est impliquée dans le contrôle de la sécrétion de l'insuline par les cellules bêta du pancréas.

Ce travail de génétique humaine et d'exploration in-vivo chez la souris a permis de conclure que la rabconnectin-3α est une protéine impliquée dans le contrôle de la sécrétion régulée et par extension dans le contrôle de la neurosécrétion. Ce travail a été rapporté dans Plos Biology en septembre 2014.

La perte de 30% de neurones GnRH étant insuffisante pour expliquer l'infertilité observée chez les souris *Nes::cre ;Dmxl2*$^{wt/loxp}$, nous avons poursuivi l'analyse du mécanisme neuroendocrinien du déficit gonadotrope. Notre hypothèse étant qu'il pourrait exister un défaut de maturation des neurones GnRH chez ces souris en plus de la perte neuronale. Nos résultats les plus récents ont confirmé cette hypothèse (voir poster PA-009).

Le fait qu'un défaut de maturation des neurones GnRH puisse entrainer un déficit gonadotrope avait souvent été évoqué mais jamais été démontré. Notre travail a démontré cette hypothèse. D'autres gènes ont récemment été associés à d'autres formes syndromiques d'hypogonadisme hypogonadotrope. Certaines protéines codées par ces gènes participent également à l'activité synaptique ou à la maturation post-natale des neurones.

Après la description clinique d'un nouveau syndrome, la caractérisation du gène lié à ce syndrome, l'exploration du phénotype dû à une perte de fonction de Dmxl2 chez la souris, et le début de la compréhension du mécanisme neuroendocrinien du déficit gonadotrope, nous orientons nos travaux vers la compréhension de la fonction biochimique de la rabconnectin-3α dans les neurones hypothalamiques et dans d'autres cellules endocrines. Nous pensons que ce projet va permettre de mieux comprendre le contrôle de la sécrétion hormonale régulée.

Ce projet de recherche fondamentale, sans jamais perdre les applications cliniques potentielles, est réalisé au sein de l'unité Inserm U 1141 (hôpital Robert Debré). Le Prix SFE-Pfizer 2013 de 30 000 euros a permis le financement des consommables et des couts d'animalerie.

Un premier article dans Plos Biology (FI : 12) a été publié en septembre 2014. Un deuxième article est actuellement soumis pour publication. Dans ces 2 articles, la Société Française d'Endocrinologie est remerciée pour son support financier.

Publications

1. Tata, B., Huijbregts, L., Jacquier, S., Csaba, Z., Genin, E., Meyer, V., Leka, S., Dupont, J., Charles, P., Chevenne, D., Carel, J.C., Leger, J., and de Roux, N., *Haploinsufficiency of dmxl2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of GnRH neurons in mouse.* PLoS Biol, 2014. **12**(9): p. e1001952.

2. Tata, B. Csaba, Z. Jacquier, S. and de Roux, N. *Evidence for the requirement of the vesicular Protein Rabconnectin3-α in the activation and maturation of the GnRH neuronal network*. Soumis pour publication.

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2013 (40 K€)

Dr Claire BRIET
Codirection **Dr Caroline SILVE & Pr Pierre BOUGNERES**
INSERM U 986, CHU de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre

Specificity of GPCR-cAMP-PKA signalling: the models of PDE4D mutations causing acrodysostosis.

Caractérisation fonctionnelle de mutations de PDE4D responsables d'acrodysostose sans résistance hormonale.

Specificity of GPCR-cAMP-PKA signalling: the models of PDE4D mutations causing acrodysostosis.

Résumé

Profitant des progrès récents dans les maladies génétiques rares de la voie GPCR-AMPc-PKA, les objectifs de ce projet étaient de documenter in vitro les conséquences spécifiques de mutations du gène *PDE4D* causant l'acrodysostose en termes de fonctions moléculaires et cellulaires de la voie de l'AMPc. Quatre mutants ont été choisis, localisé sur les 3 domaines fonctionnels de la PDE4D.

Les concentrations d'AMPc dans les cellules CHO transfectées par les plasmides codant pour la PDE4D WT ou mutés, ont été mesurée par l'évaluation de l'hydrolyse de l'AMPC ou par un sensor de l'AMPc (CAMYEL) via la technique de BRET (Bioluminescence Energy Transfert). Les 4 mutants PDE4D étudiés entraînent une augmentation de l'activité PDE4D en condition basale et stimulée et modifient leur sensibilité au rolipram (inhibiteur spécifique de la PDE4D). Ces résultats sont compatibles avec un gain de fonction des PDE4D mutées causant une perte d'activation de la voie cAMP-PKA.

Abstract

Taking advantage of the recent progresses in the rare genetic diseases of the GPCR-cAMP-PKA pathway, the objectives of this project is to document in vitro the specific consequences of PDE4D gene mutations causing acrodysostosis in terms of molecular and cellular functions of the cAMP pathway. Four mutants were selected, located on the three functional domains of PDE4D gene. The concentrations of cAMP were measured in CHO cells transfected with plasmids encoding PDE4D WT or mutated, by the evaluation of the hydrolysis of cAMP or a cAMP sensor (CAMYEL) via the technique BRET (Bioluminescence Energy Transfer). The 4 PDE4D mutants result in an increase of the PDE4D activity in basal and stimulated conditions and modify their sensitivity to Rolipram (specific inhibitor of the PDE4D). These results are consistent with a gain of function of the mutated PDE4D causing loss of activation of the cAMP-PKA pathway.

Article

Dr C. BRIET[a], Mlle C. LE STUNFF[b], Dr E. MOTTE[c], Pr E. CLAUSER[d], M. N. DUMAZ[e], Dr C. SILVE[b]
[a] Service d'Endocrinologie, CHU Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre ; [b] Inserm U 986, Kremlin-Bicêtre ; [c] Service de pédiatrie, CHU Bicêtre, Kremlin-Bicêtre ; [d] Inserm U 976, HEGP, Paris ; [e] Inserm U 976, Hôpital Saint-Louis, Paris

Introduction

Plusieurs mutations des PDE4D, une des quatre sous-familles PDE4 impliquées spécifiquement dans la dégradation de l'AMPc ont été identifiées dans l'acrodysostose sans résistance hormonale. Le phénotype osseux indique une perte d'activation de la voie cAMP-PKA. Le but du travail est de caractériser les conséquences fonctionnelles de ces mutations.

Matériels et méthodes

4 mutations des PDE4D, localisées dans trois domaines fonctionnels caractérisant cette famille, ont été introduites par mutagenèse dirigée dans le plasmide pcDNA3-hPDE4D3. La fonction des PDE4D est mesurée après transfection transitoire dans les cellules CHO, en condition basale, stimulée, avec ou sans inhibiteur spécifique (rolipram) via :

- la mesure de l'activité PDE4D (technologie de BRET via l'utilisation d'un biosensor EPAC et mesure de l'hydrolyse d'AMPc-H^3).
- la mesure de l'activité de la PKA (système rapporteur CRE-luciférase).

Résultats

L'expression des protéines mutées est similaire à celle de la PDE4D sauvage. Les mutants ont une activité augmentée par rapport au sauvage par technique de BRET et par mesure d'hydrolyse d'AMPc-H^3. L'activité PKA est inhibée par les mutants. Cette inhibition est réversée de façon concentration-dépendante par le rolipram, avec une sensibilité au rolipram des mutants diminuée par rapport au sauvage. Quelle que soit la localisation des mutations, les résultats sont similaires.

Figure 1. Increased of cAMP hydrolysis in CHO cells transfected with the four studied mutation of PDE4D compared to WT. (A) CHO cells transfected with PDE4D mutants or WT were assayed for cAMP-PDE activity with measurement of [H3]cAMP-hydrolysis (100 000cpm) after lysis. Values are mean±SD of three independent experiment in duplicate. B-Time course of the BRET response computed as the ratio YFP/Rluc emission (a) in CHO cells transfected or not with PDE4D WT and with EPAC biosensor, activated with cAMP 1 mM, with/without 25 µM rolipram; (b) in CHO cells transfected with PDE4D mutants or WT, activated with cAMP 1mM. To generate the curve cells were exposed to coelenterazine 5 µM, at room temperature, in PBS. Data represent one of the three experiments.

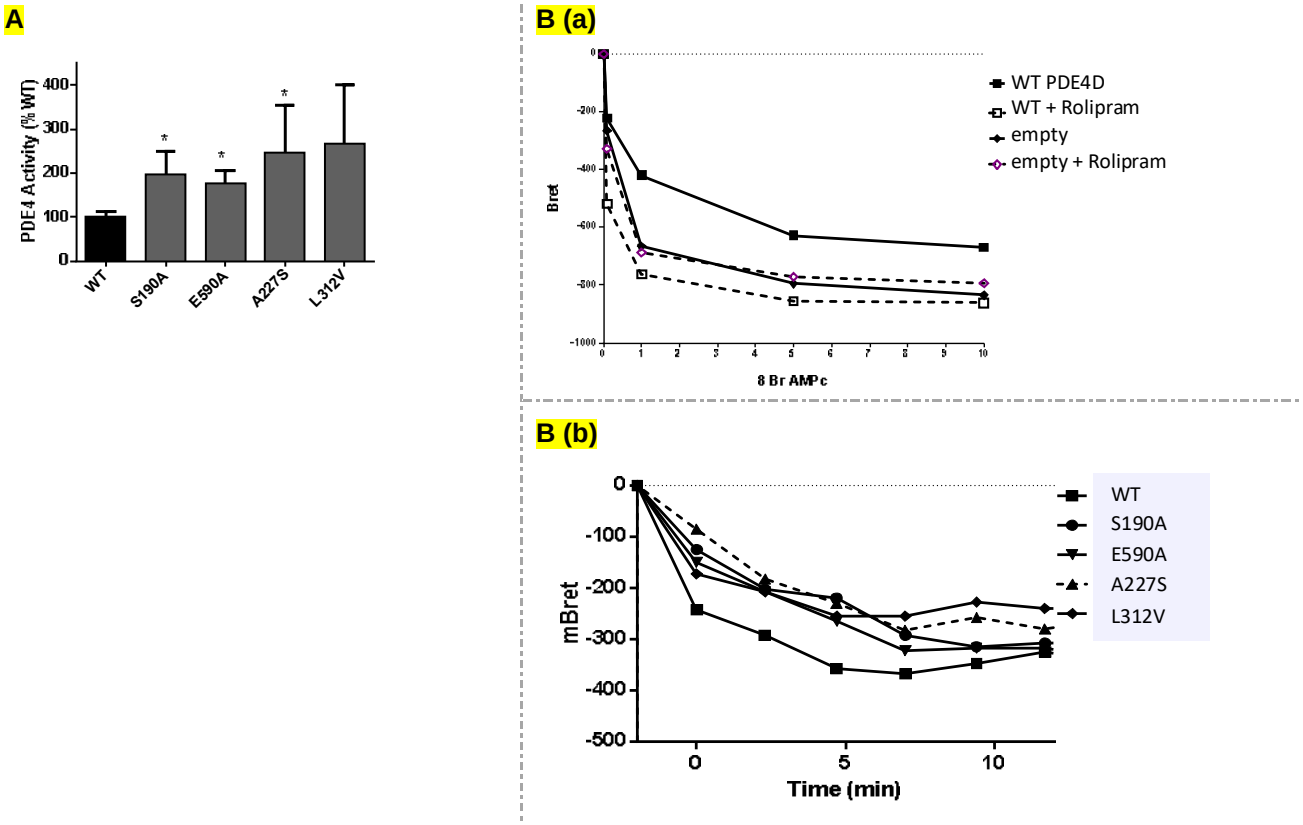
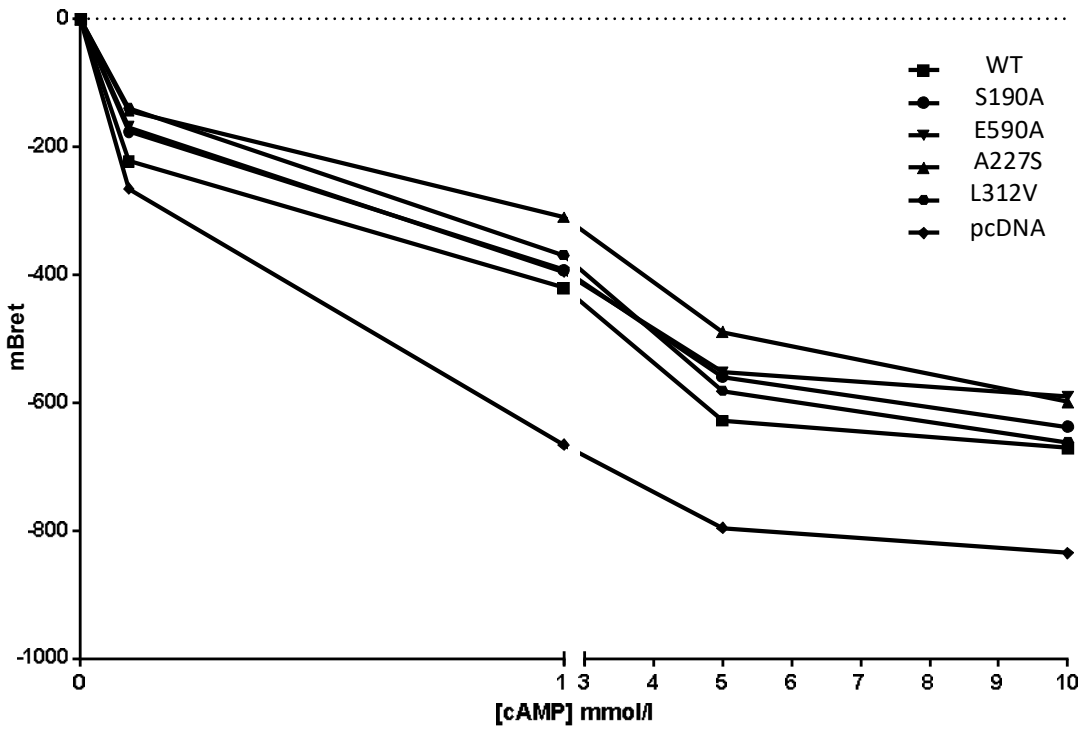
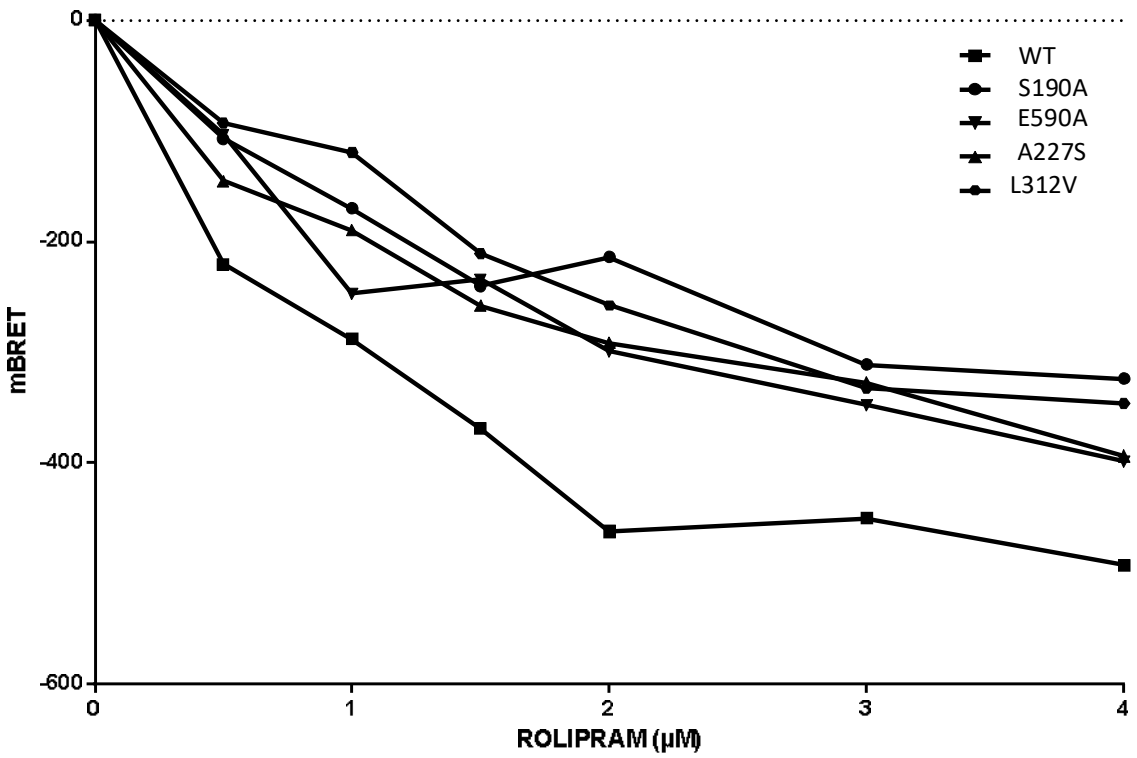


Figure 2. Response to activation/inhibition of PDE4D mutant and WT in CHO cells. Time course of the BRET response in CHO cells transfected with PDE4D mutants or WT and EPAC biosensor, (A) stimulated under increasing concentration of cAMP, (B) stimulated by cAMP 1mM and under increasing concentration of rolipram, (C) stimulated by cAMP 1mM in presence or not of H89 10µM. Data represent one of the three experiment.

A

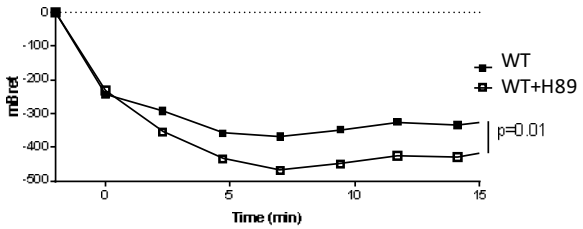


B

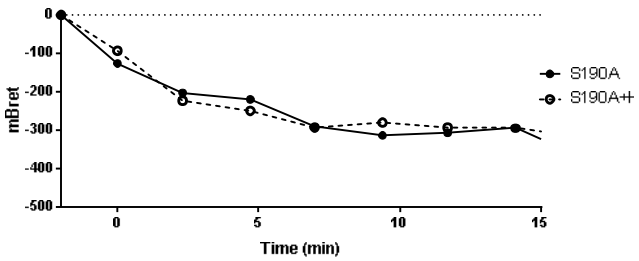


C

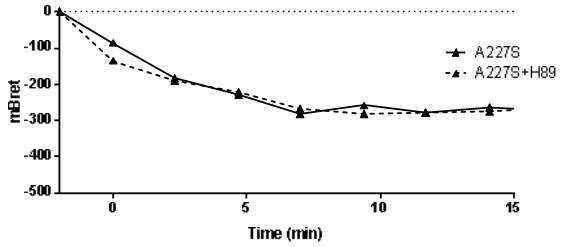
a)



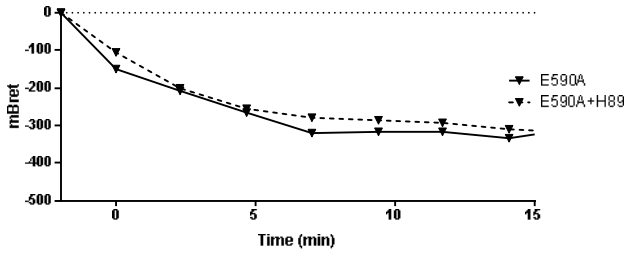
b)



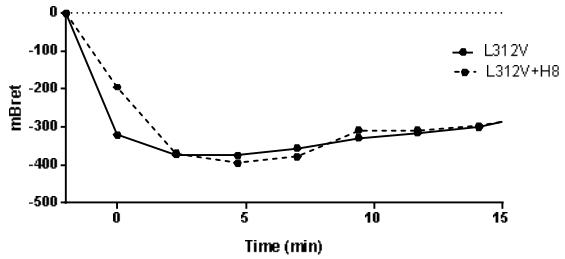
c)



d)



e)



Discussion-Conclusion

Les 4 mutants PDE4D étudiés entraînent une augmentation de l'activité PDE4D en condition basale et stimulée et modifient leur sensibilité au rolipram. Ces résultats sont compatibles avec un gain de fonction des PDE4D mutées causant une perte d'activation de la voie cAMP-PKA.

Bourse de Master 2 SFE 2013 (30 K€)

Dr Céline MOULY
Direction **Pr Pierre GOURDY & Pr Jean-François ARNAL**
INSERM U 1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Equipe 9, Hôpital de Rangueil, CHU de Toulouse

Etude des effets membranaires du récepteur alpha des oestrogènes : implications métaboliques in vivo.

Rôle du récepteur aux œstrogènes alpha (ERα) dans le métabolisme énergétique et glucidique : contribution de la voie MISS (Membrane Initiated Steroid Signalling).

Résumé

Les œstrogènes exercent une influence favorable sur le métabolisme énergétique essentiellement *via* le récepteur aux œstrogènes alpha (ERα), et plus précisément son activation nucléaire (ou génomique) requérant la fonction de transactivation AF2. L'objectif de l'étude était d'évaluer *in vivo* l'implication d'une autre voie d'activation du ERα dite membranaires ou MISS (Membrane Initiated Steroid Signalling) dans ces effets métaboliques des œstrogènes. Nous avons étudié le phénotype métabolique de souris $Palm^0$ (ou C451A-ERα), mutées pour le site de palmitoylation du ERα, et présentant par conséquent une altération de la localisation membranaire du récepteur. Sous régime hyperlipidique, les souris $Palm^0$ (comparées aux $Palm^{+/+}$) développent une obésité avec hypertrophie adipocytaire, une intolérance au glucose avec insulinorésistance, une stéatose hépatique, ainsi qu'une diminution significative du quotient respiratoire et de la dépense énergétique. Ces résultats démontrent l'implication de l'activation membranaire du ERα dans l'effet protecteur des œstrogènes sur le métabolisme énergétique et glucidique.

Abstract

Estrogens exert a beneficial action on energetic metabolism, especially through Estrogen Receptor alpha (ERα) and mainly through its nuclear (or genomic) activation, requiring transactivation function AF2. The aim of this study was to evaluate *in vivo* the influence of an alternative ERα activation pathway called MISS (Membrane Initiated Steroid Signalling) on estrogen metabolic effects. We studied metabolic phenotype of $Palm^0$ mice (or C451A-ERα), presenting a mutation of the palmitoylation site of ERα, leading to an alteration of the receptor membrane localization. Submitted to an high-fat diet, $Palm^0$ mice (compared to $Palm^{+/+}$) developed an obesity with adipocyte hypertrophy, glucose intolerance associated with insulin resistance, liver steatosis, as well as a significant decrease in the respiratory quotient and in energy expenditure. These results demonstrate the involvement of ERα MISS effects in the preventive action of estrogens on energetic and glucidic metabolism.

Article

Céline Mouly[1], Aurélie Fabre[1], Elodie Riant[1], Maeva Guillaume[1], Marine Adlanmerini[1], Sandra Handgraaf[1], Alexia Vinel[1], Aurélie Waget[1], Marie-Josée Fouque[1], Françoise Lenfant[1], Jean-François Arnal[1], Pierre Gourdy[1,2]

1 INSERM U 1048, I2MC, Toulouse, France

2 Service de Diabétologie, CHU de Toulouse, France

L'influence favorable des œstrogènes sur le métabolisme énergétique et glucidique a été parfaitement démontrée au travers d'observations chez l'homme [1] et diverses expérimentations animales [2]. Cette fonction protectrice s'exerce essentiellement *via* le récepteur aux œstrogènes alpha (ERα), et requiert l'activation de la fonction de transactivation AF2, qui contribue à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes cibles [3] [4]. Cependant, outre cette voie nucléaire (ou génomique) classique, il existe une autre voie dite membranaires ou MISS (Membrane Initiated Steroid Signalling), impliquant une fraction du ERα, localisée au niveau des cavéoles de la membrane plasmique grâce à des modifications post-traductionnelles dont une palmitoylation en position cystéine 447 (451 chez la souris), qui augmente l'hydrophobicité du récepteur et permet son interaction avec la cavéoline-1 [5]. L'activation de cet ERα membranaire induit le déclenchement de cascades de phosphorylations, impliquant notamment les voies Pi3K-Akt et MAPK, à l'origine d'effets rapides [6]. Néanmoins il existe probablement aussi des interactions directes entre cette voie MISS et la voie nucléaire, notamment via la phosphorylation de la Sérine 118 localisée au niveau de la fonction AF1 du Erα [7].

Notre objectif était d'évaluer *in vivo* l'implication de la voie MISS du ERα dans les effets des œstrogènes sur l'homéostasie énergétique et glucidique en étudiant le phénotype métabolique de souris $Palm^0$ (ou C451A-ERα). Ces souris $Palm^0$ sont mutées pour le site de palmitoylation du ERα situé en position 451, et présentent une altération de la localisation membranaire du récepteur, ainsi que de l'activation rapide des voies de signalisation en réponse aux œstrogènes [8]. Ce modèle murin a déjà permis de confirmer l'importance de la voie MISS au niveau vasculaire, en particulier lors de l'amplification des processus de réendothélilasation et de vasodilatation par les œstrogènes, alors que cette voie ne semble pas être impliquée dans les phénomènes de prolifération endométriale [8].

Des souris femelles intactes $Palm^0$ et leurs contrôles sauvages $Palm^{+/+}$ ont été maintenues sous régime normal (Normal Chow Diet ou NCD : 60% glucides, 12% lipides, 28% protéines) pendant 7 mois, ou soumises à un régime hyperlipidique (High Fat Diet ou HFD : 35% glucides, 45% lipides, 20% protéines) pendant 3 mois. Lors du suivi, la composition corporelle a été étudiée par EchoMRI, des tests de tolérance au glucose intra-péritonéaux et des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques ont été réalisés ; la dépense énergétique a été évaluée en cages métaboliques. Après sacrifice des souris à 28 semaines (groupes NCD) ou 16 semaines (groupes HFD), les tissus ont été prélevés et analysés.

Sous régime normal, les souris $Palm^0$ ne présentent pas de phénotype dysmétabolique : l'évolution pondérale est similaire à celle de leurs contrôles sauvages, le profil de tolérance glucidique est identique, et il n'est pas constaté d'effet sur l'accumulation de tissu adipeux au sacrifice. Le défaut de palmitoylation du ERα ne semble donc pas avoir d'impact sur le métabolisme énergétique et glucidique, en l'absence de facteurs favorisants.

Au contraire, chez les souris $Palm^0$ soumises à un régime hyperlipidique (en comparaison aux $Palm^{+/+}$), on observe, malgré une prise alimentaire comparable, le développement accéléré d'une obésité, étant essentiellement le fait d'une accumulation de masse grasse (significative dès 8 semaines de régime), confirmée au sacrifice par une augmentation significative de la masse des différents tissus adipeux blancs et brun. On note sur le plan histologique une hypertrophie adipocytaire marquée; au niveau plasmatique, les adipokines sont significativement augmentées (leptine, adiponectine, résistine). Les souris $Palm^0$ développent une intolérance au glucose, dès 8 semaines de régime, associée à une insulinorésistance. De plus, nous avons observé le développement d'une stéatose hépatique chez ces souris $Palm^0$, associée à une augmentation de la concentration plasmatique des ALAT et du FGF21. Il existe également une hypercholestérolémie, sans élévation des triglycérides plasmatiques.

Les souris $Palm^0$ sont caractérisées par une diminution significative du quotient respiratoire au cours de la période diurne, et de la dépense énergétique au cours des périodes diurne et nocturne, malgré des apports alimentaires similaires et une tendance à la diminution de l'activité locomotrice diurne. Ainsi le défaut de palmitoylation de ERα semble bien impliqué dans l'accumulation de tissu adipeux et celle de triglycérides au niveau hépatique, ainsi que dans la détérioration de la sensibilité à l'insuline ; cela pourrait s'expliquer notamment par un impact sur la dépense énergétique.

Ces résultats démontrent la contribution des effets MISS du ERα à l'effet préventif des œstrogènes vis-à-vis du développement d'une obésité et d'anomalies du métabolisme glucidique, en réponse à un régime hyperlipidique, notamment via le contrôle de la dépense énergétique. Ils pourraient suggérer l'intérêt d'une nouvelle stratégie de modulation sélective du ERα.

[1] K. L. Margolis, D. E. Bonds, R. J. Rodabough, L. Tinker, L. S. Phillips, C. Allen, T. Bassford, G. Burke, J. Torrens, B. V. Howard, et Women's Health Initiative Investigators, « Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial », *Diabetologia*, vol. 47, n° 7, p. 1175‑1187, juill. 2004.

[2] K. Takeda, K. Toda, T. Saibara, M. Nakagawa, K. Saika, T. Onishi, T. Sugiura, et Y. Shizuta, « Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency », *J. Endocrinol.*, vol. 176, n° 2, p. 237‑246, févr. 2003.

[3] E. Riant, A. Waget, H. Cogo, J.-F. Arnal, R. Burcelin, et P. Gourdy, « Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice », *Endocrinology*, vol. 150, n° 5, p. 2109‑2117, mai 2009.

[4] S. Handgraaf, E. Riant, A. Fabre, A. Waget, R. Burcelin, P. Lière, A. Krust, P. Chambon, J.-F. Arnal, et P. Gourdy, « Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ERα activation function-2 (ERαAF-2), whereas ERαAF-1 is dispensable », *Diabetes*, vol. 62, n° 12, p. 4098‑4108, déc. 2013.

[5] F. Acconcia, P. Ascenzi, G. Fabozzi, P. Visca, et M. Marino, « S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 316, n° 3, p. 878‑883, avr. 2004.

[6] M. P. Haynes, D. Sinha, K. S. Russell, M. Collinge, D. Fulton, M. Morales-Ruiz, W. C. Sessa, et J. R. Bender, « Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells », *Circ. Res.*, vol. 87, n° 8, p. 677‑682, oct. 2000.

[7] D. A. Lannigan, « Estrogen receptor phosphorylation », *Steroids*, vol. 68, n° 1, p. 1‑9, janv. 2003.

[8] M. Adlanmerini, R. Solinhac, A. Abot, A. Fabre, I. Raymond-Letron, A.-L. Guihot, F. Boudou, L. Sautier, E. Vessières, S. H. Kim, P. Lière, C. Fontaine, A. Krust, P. Chambon, J. A. Katzenellenbogen, P. Gourdy, P. W. Shaul, D. Henrion, J.-F. Arnal, et F. Lenfant, « Mutation of the palmitoylation site of estrogen receptor α in vivo reveals tissue-specific roles for membrane versus nuclear actions », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 2, p. E283‑290, janv. 2014.

Bourse de Fin de thèse SFE 2013 (20 K€)

Dr Emilie PASTEL
Direction **Pr Anne-Marie LEFRANÇOIS MARTINEZ & Dr Chantal VAURY**
GReD (Génétique, Reproduction et Développement), CNRS UMR 6293 - INSERM U 1103, Université de Clermont-Ferrand - Blaise Pascal, Faculté de Médecine, Aubière

PGF2alpha et Aldose réductases : nouveaux acteurs dans le contrôle de la lypolyse du tissu adipeux blanc.

Résumé

Les aldoses réductases (AKR1B) sont des enzymes multifonctionnelles retrouvées dans les tissus adipeux humains et murins et capables de réduire des groupements aldéhydes et cétones. L'invalidation du gène *Akr1b7* nous a permis de confirmer *in vivo* que certaines aldoses réductases étaient responsables de la production de prostaglandine F2alpha (PGF2alpha), décrite pour ses propriétés anti-adipogéniques. Les souris *Akr1b7*$^{-/-}$ possèdent un tissu adipeux excessivement développé du fait d'une hyperplasie et d'une hypertrophie adipocytaire. Dans le cadre de ce projet, nous avons montré que le tissu adipeux des souris *Akr1b7*$^{-/-}$ présente une activité lipolytique réduite associée à une accumulation plus faible des protéines ATGL et HSL. L'utilisation d'adipocytes 3T3-L1 et d'un agoniste du récepteur de la PGF2alpha nous permet de confirmer que les AKR1B stimulent la lipolyse *via* la synthèse de PGF2alpha.

Abstract

Aldose reductases (AKR1B) are multifunctional enzymes found in human and murine adipose tissues and able to reduce aldehyde and ketone groups. The invalidation of *Akr1b7* gene allowed us to confirm *in vivo* that some aldose reductases are responsible for the production of prostaglandin F2alpha (PGF2alpha), described for its anti-adipogenic properties. These *Akr1b7*$^{-/-}$ mice have an adipose tissue excessively developed due to adipocyte hyperplasia and hypertrophy. As part of this project, we have shown that adipose tissue from *Akr1b7*$^{-/-}$ mice exhibits reduced lipolytic activity associated with a lower accumulation of ATGL and HSL proteins. The use of adipocytes 3T3-L1 treated with an agonist of PGF2alpha receptor, allows us to confirm that AKR1B stimulate lipolysis through PGF2alpha synthesis.

Publication

Pastel E, Pointud JC, Loubeau G, Dani C, Slim K, Martin G, Volat F, Sahut-Barnola I, Val P, Martinez A, Lefrançois-Martinez A-M.
Aldose Reductases Influence Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Levels and Adipocyte Differentiation in Male Mouse and Human Species.
Endocrinology, 2015, 156: 1671–1684.

Rapport des principaux résultats

Le tissu adipeux est un organe jouant un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique et son développement excessif caractérise l'obésité. Principal lieu de stockage de l'énergie excédentaire sous forme de triglycérides, le tissu adipeux est capable de mobiliser ses réserves dans des situations de carence énergétique. L'hydrolyse des triglycérides ou lipolyse fait intervenir trois lipases : ATGL (adipose triglyceride lipase), HSL (hormono-sensitive lipase) et MGL (monoacylglycerol lipase) pour permettre la libération d'acides gras non estérifiés et de glycérol. Ce processus est finement régulé notamment par les catécholamines qui stimulent la lipolyse *via* les récepteurs β-adrénergiques et par la prostaglandine E2 qui inhibe la lipolyse par l'intermédiaire de son récepteur EP3.

Parmi la multitude de molécules sécrétées par le tissu adipeux et participant à son homéostasie, la PGF2alpha (prostaglandine F2alpha) est connue depuis de nombreuses années pour son action anti-adipogénique (Serrero et al., 1992). La découverte récente d'une activité PGF2alpha synthase portée par les aldoses réductases (Kabututu et al., 2009) nous a permis de mettre en avant, dans la physiologie du tissu adipeux, l'implication potentielle de ces enzymes largement décrites jusqu'alors pour leur capacité à réduire et à faciliter l'élimination de nombreux composés toxiques (Pastel et al., 2012).

Mon projet de thèse consistait à étudier le rôle des aldoses réductases (AKR1B) dans la physiologie du tissu adipeux blanc. Après avoir dressé le profil d'expression des différentes isoformes murines et humaines dans le tissu adipeux, j'ai pu montrer qu'AKR1B1, *via* son implication dans la synthèse de PGF2alpha, participait à la régulation de la différenciation en adipocytes des cellules hMADS (human multipotent adipose-derived stem cell) (Pastel et al., 2015). Nous avions montré précédemment que les souris invalidées pour le gène codant la PGF2alpha synthase Akr1b7 (*Akr1b7*$^{-/-}$) présentaient un surpoids, dès l'âge de 8 semaines, lié à une diminution de la concentration en PGF2alpha au sein du tissu adipeux (Volat et al., 2012). Cette expansion accrue du tissu adipeux blanc des animaux *Akr1b7*$^{-/-}$ est due à une adipogenèse plus importante (attendue compte tenu du rôle anti-adipogénique de la PGF2alpha) et à une hypertrophie adipocytaire. Cette augmentation du volume des adipocytes des souris *Akr1b7*$^{-/-}$ se fait sans modification de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides suggérant une diminution de leur activité lipolytique.

L'objectif de ce projet, financé grâce au concours de la Société Française d'Endocrinologie, était donc de poursuivre la caractérisation du rôle des aldoses réductases dans l'homéostasie du tissu adipeux blanc en s'intéressant à leur impact sur le métabolisme adipocytaire et en particulier sur la lipolyse.

Nous avons étudié l'activité lypolytique du tissu adipeux des animaux *Akr1b7*$^{-/-}$ en réalisant des cultures organotypiques sur lesquelles nous avons analysé le relargage du glycérol, produit terminal de la lipolyse. Ceci nous a permis de montrer que le tissu adipeux des animaux *Akr1b7*$^{-/-}$ présente une activité lipolytique plus faible que celle du tissu adipeux des animaux sauvages. Cette diminution de la lipolyse est due à une diminution de l'accumulation des protéines ATGL et HSL (forme totale et forme active phosphorylée sur la sérine 660).

Dans le tissu adipeux, la PGF2alpha étant le principal médiateur de l'activité d'Akr1b7, nous avons traité des cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes avec du Cloprosténol, un analogue synthétique de la PGF2alpha afin d'étudier son impact sur la lipolyse. Le Cloprosténol induit une augmentation du relargage de glycérol par ces cellules. Cette stimulation de la lipolyse en réponse au Cloprosténol est aussi caractérisée par l'accumulation des protéines ATGL et HSL. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs du récepteur de la PGF2alpha (FP) et des différentes voies de signalisation en aval montre que la stimulation de la lipolyse par la PGF2alpha nécessite l'activation de son récepteur FP et met en jeu une voie calcium/calmoduline kinase II et la voie des MAPK. Cette activation de la lipolyse par la PGF2alpha est également retrouvée dans les cellules humaines hMADS différenciées en adipocytes où elle dépend aussi de l'activation du récepteur FP.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette étude nous a permis de montrer que les aldoses réductases sont des acteurs à part entière de la régulation du tissu adipeux qui, *via* la synthèse de PGF2alpha, régulent non seulement l'adipogenèse mais aussi la lipolyse.

Références

- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.-C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., et al. (2009). Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *Journal of Biochemistry* 145, 161–168. doi:10.1093/jb/mvn152.

- Pastel, E., Pointud, J.-C., Loubeau, G., Dani, C., Slim, K., Martin, G., et al. (2015). Aldose reductases influence prostaglandin f2α levels and adipocyte differentiation in male mouse and human species. *Endocrinology* 156, 1671–1684. doi:10.1210/en.2014-1750.

- Pastel, E., Pointud, J.-C., Volat, F., Martinez, A., and Lefrançois-Martinez, A.-M. (2012). Aldo-Keto Reductases 1B in Endocrinology and Metabolism. *Front Pharmacol* 3, 148. doi:10.3389/fphar.2012.00148.

- Serrero, G., Lepak, N. M., and Goodrich, S. P. (1992). Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F2 alpha inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* 131, 2545–2551.

- Volat, F. E., Pointud, J.-C., Pastel, E., Morio, B., Sion, B., Hamard, G., et al. (2012). Depressed levels of prostaglandin F2α in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes* 61, 2796–2806. doi:10.2337/db11-1297.

Publication

Emilie Pastel, Jean-Christophe Pointud, Gaëlle Loubeau, Christian Dani, Karem Slim, Gwenaëlle Martin, Fanny Volat, Isabelle Sahut-Barnola, Pierre Val, Antoine Martinez, and Anne-Marie Lefrançois-Martinez.
Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6293 (E.P., J.-C.P., G.L., I.S.-B., P.V., A.M., A.-M.L.-M.); INSERM Unité 1103, Génétique Reproduction et Développement, Clermont Université, 63171 Aubière, France; iBV (C.D.); Institute of Biology Valrose, Université Nice Sophia Antipolis, 06189 Nice, France; Service de Chirurgie Digestive (K.S., G.M.); Centre Hospitalier Universitaire Estaing, 63003 Clermont-Ferrand, France; and INSERM Unité Mixte de Recherche 1048 (F.V.), Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Université Paul Sabatier, 31432 Toulouse, France.
Aldose Reductases Influence Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Levels and Adipocyte Differentiation in Male Mouse and Human Species.
Endocrinology, May 2015, 156(5): 1671–1684)

Bourses SFE « LYON 2014 »

Bourse de Master 2 Ipsen 2014 (32 K€)

Mme Anne-Gaëlle DECOUX-POULLOT
Codirection **Dr Patrick AUBERGER & Dr Frédéric BOST**
Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire – INSERM U 1065 – Equipe 6 : Physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'obésité et du diabète (Dr Jean-François TANTI et Dr Mireille CORMONT) – Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Nice

Cibler les cellules souches cancéreuses de prostate avec les biguanides.

Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy?

Résumé

Les cellules souches cancéreuses (CSC) sont résistantes à la chimiothérapie et seraient à l'origine des récidives de cancer et des métastases. Des études ont montré que les biguanides inhibent la prolifération des cellules cancéreuses de prostate et la croissance tumorale. Dans le cancer du sein et de l'ovaire, les biguanides ciblent spécifiquement les CSC. Notre objectif était de déterminer si les biguanides pouvaient constituer une thérapie ciblée sur les CSC dans le cancer de la prostate. Nous avons isolé des CSC de prostate à partir de prostatosphères et en analysant leur niveau d'activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Nous avons montré que les biguanides : 1) inhibent de façon dose-dépendante la formation des prostatosphères à partir des CSC, 2) altèrent la croissance des prostatosphères. De plus, les biguanides inhibent de façon dose-dépendante la prolifération des CSC isolées à partir des prostatosphères, de façon plus importante que dans les cellules parentales. En revanche, le traitement des prostatosphères par les biguanides induit une augmentation du niveau d'ARNm de plusieurs marqueurs de CSC (Nanog, Oct4, BMI1, GLI1), mais nous ne confirmons pas ces résultats au niveau protéique. L'analyse par cytométrie de flux montre une augmentation de la proportion des cellules exprimant fortement l'ALDH dans les prostatosphères après le traitement, ce qui suggère un enrichissement en CSC. Par ailleurs, le traitement par biguanides ne semble pas affecter l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire dans les prostatosphères. L'ensemble de ces résultats démontrent un effet différent des biguanides sur les CSC isolées et sur les prostatosphères.

Abstract

Cancer stem cells (CSC) are known to be resistant to chemotherapy and to be responsible for relapse of cancer and metastasis. Biguanides (metformin and phenformin) are prescribed for the treatment of type 2 diabetes. However, recent studies have shown that biguanides exert antitumoral effects. In prostate cancer, biguanides inhibit prostate cancer cells proliferation and tumor growth. In breast and ovarian cancer, biguanides selectively target CSC. The purpose of this study was to determine if biguanides could be a targeted therapy on prostate CSC. CSC were isolated from prostatospheres and by flow cytometry based on aldehyde-dehydrogenase (ALDH) activity level. We have shown that treatment with biguanides : 1) significantly inhibits in a dose-dependent manner prostatospheres formation from CSC, 2) impairs prostatospheres growth. Besides, biguanides inhibit the proliferation of CSC isolated from prostatospheres in a dose-dependent manner, and this effect is more drastic than in parental cells. In contrast, in prostatospheres, treatment with biguanides induces an increase in the mRNA level of the stemness-related genes Nanog, Oct 4, BMI 1 and GLI 1, but these results are not confirmed at the protein level. Flow cytometry analysis shows an increase in the proportion of cells exhibiting a high ALDH activity in prostatospheres after treatment, suggesting enrichment in CSC in prostatospheres. Moreover, treatment with biguanides doesn't seem to affect the expression of cell-cycle regulating proteins in prostatospheres. Our findings suggest that biguanides have distinct effects on isolated CSC and on prostatospheres.

Publications

A.-G. Decoux-Poullot, S. Clavel, P. Fénichel, N. Chevalier, J.-F. Tanti, F. Bost
Cibler les cellules souches cancéreuses de prostate avec les biguanides.
Annales d'Endocrinologie, 2016, 77 – n° 4 : 280. http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2016.07.125
Communication orale (CO-045) présentée au 33ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE), Bordeaux, France, 5-8 octobre 2016.

Bost F., Decoux-Poullot A.-G., Tanti J.-F., Clavel S.
Energy disruptors: rising stars in anticancer therapy?
Oncogenesis, 2016, Jan 18;5: e188. http://dx.doi.org/10.1038/oncsis.2015.46. Review.

Rapport

Introduction

Le cancer de la prostate représente un véritable enjeu de santé publique compte tenu de sa fréquence et de sa mortalité. Des thérapies complémentaires à celles déjà disponibles sont nécessaires dans les stades avancés de la maladie caractérisés par la formation de métastases et une chimiorésistance. Les récidives et les métastases seraient liées à la présence d'un petit contingent de cellules particulières au sein de la tumeur, ayant des propriétés accrues d'autorenouvellement, de tumorigénicité et de chimiorésistance : les cellules souches cancéreuses (CSC). Ainsi, ces cellules représentent une cible thérapeutique privilégiée.

Des études ont montré que les biguanides, utilisés très largement dans le traitement du diabète de type 2 sous la forme de la metformine, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses de prostate et la croissance tumorale. Dans le cancer du sein et de l'ovaire, il a été montré que les biguanides ciblent spécifiquement les CSC.

En l'absence de données dans le cancer de la prostate, l'objectif de notre travail était de déterminer si les biguanides pouvaient constituer une thérapie ciblée sur les CSC de prostate.

Résultats

Nous avons isolé des CSC de prostate à partir de leur capacité à former des prostatosphères d'une part, et d'autre part en analysant leur niveau d'activité aldéhyde déshydrogénase (ALDH), une enzyme qui est hautement exprimée dans plusieurs populations de CSC.

Nous avons tout d'abord montré que les biguanides inhibent significativement et de façon dose-dépendante la formation des prostatosphères à partir d'une population cellulaire enrichie en CSC, et altèrent la croissance des prostatosphères. A la dose de 0.5 mM de metformine, le nombre de prostatosphères formées diminue significativement de 30% ($p=0.035$), alors que cette dose de metformine n'a pas d'effet antiprolifératif sur la lignée cellulaire parentale. **Ce résultat suggère un effet spécifique des biguanides sur les CSC.**

De plus, les biguanides inhibent de façon dose-dépendante la prolifération des CSC isolées à partir des prostatosphères, de façon plus importante que dans les cellules parentales de la lignée. **Les CSC auraient donc tendance à être plus sensible aux biguanides que les cellules parentales.**

En revanche, lorsque l'on s'intéresse aux effets des biguanides sur les prostatosphères formées, les résultats montrent que le traitement des prostatosphères par les biguanides induit une augmentation du niveau d'ARNm de plusieurs marqueurs de CSC (Nanog, Oct4, BMI1, GLI1), avec un effet dose-dépendant pour Nanog et Oct4. Cependant, ces résultats ne sont pas confirmés au niveau protéique. Enfin, l'analyse par cytométrie de flux montre une augmentation de la proportion des cellules exprimant fortement l'ALDH (marqueur enzymatique des cellules souches) dans les prostatosphères après le traitement par biguanides, avec un effet dose-réponse. Cette proportion est multipliée par 3.3, 4.9 et 7.3 avec 0.1, 0.5 et 5 mM de metformine respectivement, et par 1.1 et 3.9 avec 50 et 100 µM de phenformine respectivement par rapport au contrôle. **Ces résultats suggèrent donc un enrichissement en CSC des prostatosphères après leur traitement par biguanides.**

Conclusion

Ainsi, notre étude montre que les biguanides ont des effets différents sur les CSC selon qu'elles sont isolées ou au sein des prostatosphères. Alors qu'un effet inhibiteur est observé sur le nombre et la taille des prostatosphères formées et sur la prolifération des CSC isolées, on retrouve au contraire une augmentation de différents marqueurs de CSC dans les prostatosphères traitées par biguanides. Déterminer les effets des biguanides sur les CSC de prostate représente un véritable enjeu en thérapie anticancéreuse. L'hypothèse des biguanides comme thérapie ciblée sur les CSC de prostate est remise en question par notre étude, et l'enjeu mérite que des études complémentaires viennent étayer nos résultats.

Bourse de Master 2 Lilly 2014 (32 K€)

Dr Mirella HAGE
Codirection **Pr Philippe CHANSON et Dr Peter KAMENICKY**
INSERM 1185 : Récepteurs Stéroïdiens, Physiopathologie Endocrinienne et Métabolique – Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Invalidation tissu-spécifique de la voie de signalisation de l'AMP cyclique dans le lignage somatotrope : conséquences fonctionnelles sur la tumorigenèse hypophysaire associée aux mutations d'AIP.

Rôle de l'AMP cyclique dans la tumorigenèse hypophysaire associée aux mutations d'*AIP* (Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein).

Role of cyclic AMP in pituitary tumorigenesis associated to AIP (Aryl hydrocarbon receptor Interacting Protein) mutations.

Résumé

Les mutations germinales d'***AIP*** prédisposent aux adénomes hypophysaires, majoritairement somatotropes. Le rôle d'AIP dans le fonctionnement de l'axe somatotrope et la tumorigenèse hypophysaire reste toutefois mal connu. Des travaux récents *in vitro* suggèrent que le potentiel tumorigène des mutations d'*AIP* repose sur une interaction défectueuse d'AIP avec certains acteurs de la voie AMPc-PKA. Pour tester *in vivo* l'importance de la voie de l'AMPc pour la tumorigenèse *AIP*-dépendante, nous avons utilisé les souris *Aip*$^{+/-}$, avec une invalidation hétérozygote et globale d'*Aip.* Les souris mâles *Aip*$^{+/-}$ suivies longitudinalement de 3 à 12 mois ne développaient ni gigantisme ni acromégalie évidents mais présentaient un phénotype plus mince par rapport aux souris sauvages, suggérant un effet de la GH *(growth hormone,* hormone de croissance*)*. L'analyse de la pulsatilité de GH sur 6 h a montré une sécrétion accrue chez les souris ***Aip***$^{+/-}$ de 12 mois et une pulsatilité de GH conservée sans différence entre les taux d'IGF-1. Contrairement à la pathologie humaine, les souris ***Aip***$^{+/-}$ n'ont pas développé d'adénome hypophysaire avant l'âge de 12 mois. La stimulation des hypophyses isolées par la GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) conduisait à une augmentation de la production intra-hypophysaire d'AMPc chez les souris *Aip*$^{+/-}$ et sauvages, toutefois sans différence entre les génotypes. Cependant, l'augmentation de la réponse *ex vivo* à la GHRH des hypophyses isolées ainsi que l'élargissement des acinis identifié par coloration de la reticuline des hypophyses suggérait une hyperplasie somatotrope.

Abstract

Germline mutations in the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (*AIP*) gene predispose to pituitary adenomas, particularly of the somatotroph lineage. The role of AIP in the functioning of the somatotropic axis and in pituitary tumorigenesis remains poorly known. Recent *in vitro* studies have suggested that the tumorigenic potential of *AIP* mutations results from a defective interaction of AIP with certain actors of cAMP-PKA pathway. To test *in vivo* the importance of this pathway in *AIP*-dependent tumorigenesis, we used a mouse model with global heterozygous inactivation of *Aip* (*Aip*$^{+/-)}$. *Aip*$^{+/-}$ male mice of 3-12 months followed longitudinally did not develop gigantism or acromegaly but exhibited a leaner phenotype than wild-type mice suggestive of GH (*growth hormone*) effect. Analysis of GH pulsatility by deconvolution in 12-month-old *Aip*$^{+/-}$ mice showed a mild increase in total GH secretion, a preserved GH pulsatility pattern, but a normal IGF-1 concentration. Unlike human pathology, *Aip*$^{+/-}$ mice did not develop any pituitary tumors up to 12 months of age. The stimulation of pituitary explants by GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) resulted in an increased production of cAMP in both *Aip*$^{+/-}$ and wild–type mice without any significant difference between genotypes. However, an increased *ex vivo* response to GHRH of pituitary explants from 3-month-old *Aip*$^{+/-}$ mice, together with areas of enlarged acini identified on reticulin staining in the pituitary of some *Aip*$^{+/-}$ mice, was suggestive of somatotroph hyperplasia.

Rapport

La physiopathologie des adénomes hypophysaires est mal connue. Récemment, des mutations du gène *AIP* (*Aryl-hydrocarbon receptor Interacting Protein*) ont été décrites comme prédisposant aux adénomes hypophysaires familiaux et sporadiques, notamment somatotropes, sans en comprendre le mécanisme moléculaire. Des travaux récents *in vitro* suggèrent que le potentiel tumorigène des mutations d'*AIP* repose sur une interaction défectueuse d'*AIP* avec certains acteurs de la voie AMPc-PKA, conduisant à une accumulation d'AMPc intracellulaire. Le but de ce travail de Master était de tester *in vivo* l'importance de la voie d'AMPc pour la tumorigenèse *AIP*-dépendante.

Pour cela, nous avons utilisé les souris $Aip^{+/-}$, avec une invalidation hétérozygote et globale d'*Aip,* dans la mesure où il s'agit du seul modèle physiopathologique *in vivo* disponible. Cependant, en dehors de l'identification d'adénomes hypophysaires, leur phénotype a été peu caractérisé. Dans un travail précédent mon stage de M2, nous avons montré que les souris mâles $Aip^{+/-}$ suivies longitudinalement de 3 à 12 mois ne développaient pas de gigantisme ni d'acromégalie évidents mais présentaient des changements significatifs de composition corporelle. L'analyse de la pulsatilité de GH sur 6 h a montré une sécrétion modérément augmentée chez les souris $Aip^{+/-}$ de 12 mois par rapport aux souris sauvages, sans différence entre les concentrations d'IGF-I. La sécrétion de GH induite par la GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) à partir des hypophyses isolées était plus élevée chez les souris $Aip^{+/-}$ de 3 mois en comparaison des souris sauvages.

Au cours de ce travail de recherche nous avons pu montrer, que cette hyperréactivité *ex vivo* à la GHRH s'accompagnait d'une augmentation de l'expression des transcrits hypophysaires de GH chez les souris $Aip^{+/-}$ de 3 mois en comparaison des souris sauvages. Toutefois, l'expression hypophysaire d'autres gènes cibles de la GHRH, comme *Ghrh-r* (*Growth Hormone Releasing Hormone-Receptor*) et *Pit1 (PITuitary-specific positive transcription factor 1*), n'est pas modifiée. La stimulation des hypophyses isolées par la GHRH conduisait à une augmentation de la production intra-hypophysaire d'AMPc chez les femelles $Aip^{+/-}$ et sauvages, sans qu'une différence soit observée entre les génotypes. L'expression des transcrits hypothalamiques de *Ghrh* et de *Srih* (*Somatotropin Release-Inhibiting Hormone*) n'était pas différente entre les souris $Aip^{+/-}$ et les souris sauvages. En présence d'une hypersécrétion modérée de GH, l'absence de répression de *Ghrh* et de stimulation de *Srih* suggère un possible dérèglement hypothalamique, résultant d'une invalidation globale d'*Aip*.

En désaccord avec la description originale du modèle par Raitila *et al,* les souris n'ont pas développé d'adénome hypophysaire avant l'âge de 12 mois. Seules certaines souris femelles âgées de 21-24 mois présentaient des adénomes hypophysaires, qui étaient plus volumineux chez les souris mutées en comparaison des souris sauvages. L'analyse histologique et immunohistochimique des hypophyses des souris mâles de 3 et 12 mois nous a permis d'identifier des foyers d'hyperplasie hypophysaire, avec une augmentation de la prolifération somatotrope, chez certains animaux mutés, qui peut constituer l'étape préalable au développement des adénomes hypophysaires. Cette hyperplasie pourrait être responsable de l'hypersensibilité à la GHRH et de l'expression plus importante de *Gh* au niveau de l'hypophyse des souris mutées.

En conclusion, au vu du phénotype fruste que présentaient les souris $Aip^{+/-}$, nous sommes en train de générer un autre modèle de souris plus adapté pour préciser le rôle de la voie de signalisation de l'AMPc dans la tumorigenèse associée aux mutations d'*AIP*. Il s'agit de souris possédant une invalidation simultanée d'*Aip* et de *Gnas* spécifiquement dans les cellules somatotropes, qui nous permettra de comparer la survenue des adénomes dans un contexte d'invalidation homozygote et tissu-spécifique d'*Aip* en modulant la production hypophysaire d'AMPc.

Bourse de Master 2 mutualisée Merck Serono & SFE 2014 (32 K€)

Mlle Nathanaëlle MONTANIER
Direction **Dr Antoine MARTINEZ**
GReD (Génétique, Reproduction et Développement), CNRS UMR 6293 - INSERM U 1103 - Equipe 10 : Tumeurs Surrénaliennes et homéostasie du Tissu Adipeux, Université de Clermont-Ferrand - Blaise Pascal, Faculté de Médecine, Aubière

Mise en place des complications métaboliques du syndrome de Cushing ACTH-indépendant dans un modèle génétique murin et étude pré-clinique d'une approche anti-récepteur GR.

Séquence de survenue des complications métaboliques du syndrome de Cushing et intérêt d'une approche anti récepteur-GR : contribution d'un modèle génétique murin.

Résumé

L'objectif est de définir, grâce à un modèle animal, la séquence d'apparition des complications du syndrome de Cushing ACTH-indépendant (CS) et d'évaluer l'efficacité d'un antagoniste sélectif du récepteur aux glucocorticoïdes (GR). Les souris $AdKO_{2.0}$ présentent une hypercorticostéronémie due à une activation constitutive de la signalisation PKA dans les tissus stéroïdogènes (invalidation du gène *Prkar1a*). Nous avons évalué les conséquences cataboliques du CS sur le masse musculaire (gastrocnémien et soléaire) et l'os (microarchitecture trabéculaire/corticale et marqueurs ostéoclastiques/blastiques) et suivi les troubles anaboliques par des tests de résistance à l'insuline et par l'analyse de la composition corporelle en EchoMRI. Dès l'apparition du CS, WT et $AdKO_{2.0}$ sont réparties en trois bras de traitements -Véhicule, Mifepristone, CT8 (antagoniste spécifique du GR)- administrés quotidiennement en i.p. pendant 4 semaines. Les mâles $AdKO_{2.0}$ présentent un CS franc avant 4 semaines, associé à un excès de mortalité, un retard de croissance, alors que le phénotype est plus tardif chez les femelles (10 semaines). Le modèle $AdKO_{2.0}$ développe, dès le stade du CS subclinique, l'ensemble des comorbidités, à l'exception de l'ostéoporose. Dès la survenue d'un CS franc, les marqueurs moléculaires de l'ostéoformation sont fortement réprimés chez les $AdKO_{2.0}$, l'architecture corticale et la résistance osseuse sont altérées, en particulier chez les mâles alors qu'on observe une densification de la structure trabéculaire plus particulièrement chez les femelles. L'excès de masse grasse et la résistance à l'insuline des $AdKO_{2.0}$ sont corrigés par le Mifepristone, mais de façon incomplète par le CT8. Les antagonistes s'opposent aux effets moléculaires des glucocorticoïdes sur le catabolisme osseux, mais ne corrigent pas l'amyotrophie. Ce travail valide le modèle $AdKO_{2.0}$ comme support d'étude des complications du CS pédiatrique et adulte, et ouvre des perspectives pour l'évaluation préclinique de nouvelles molécules ciblant les comorbidités du CS.

Abstract

Our aim is to define the sequence of complications of ACTH independent Cushing's syndrome (CS) developed by a genetic mouse model and to evaluate the efficiency of a GR antagonist approach. $AdKO_{2.0}$ mice developed hypercorticosteronemia due to constitutive activation of PKA signaling in steroïdogenic tissues (invalidation of *Prkar1a* gene). We assessed the catabolic effects of CS on the muscle (relative weight of gastrocnemius and soleus) and bone (trabecular/corticale microarchitecture and osteoclast/osteoblast genes expression), and followed anabolic disorders thanks to insulin resistance tests, and body composition measurements using an Echo MRI analyser. After development of overt CS, WT and $AdKO_{2.0}$ were divided into three arms of treatments -Vehicle, Mifepristone (GR/PR antagonist), and CT8 (selective GR antagonist)- and received daily i.p injections for 4 weeks. Before the age of 4 weeks, $AdKO_{2.0}$ male mice showed both a weight and growth delay, an excess of mortality associated with an overt CS, contrasting with a later CS in female mice (10 weeks). All comorbidities, except osteoporosis, develop at subclinical CS. From the onset of overt CS, osteoformation genes are strongly repressed in $AdKO_{2.0}$, corticale architecture and strength bone are affected, especially for males, while a densification of trabecular structure is noted in females. Excess fat mass and insulin resistance of $AdKO_{2.0}$ are corrected to varying degrees by both Mifepristone or CT8 treatment. Both compounds were able to counteract bone osteoporosis without improving muscle atrophy. This work validates $AdKO_{2.0}$ mice as a suitable model for pediatric and adult CS complications study, with the ability to provide new therapeutic alternatives for preclinical studies targeting Cushing's syndrome comorbidities.

Publication

N. Montanier[a], I. Sahut-Barnola[a], J.C. Pointud[a], Y. Wittrant[b], G. Rochefort[c], H. Hunt[d], T. Dumontet[a], A.M. Lefrançois-Martinez[a], I. Tauveron[e], P. Val[a], A. Martinez[a]

[a] Laboratoire Génétique Reproduction et Développement (GReD) UMR6293 - U1103 - Clermont Université, Aubière, France ; [b] INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France ; [c] EA 2496, Pathologies, imagerie et biothérapies oro-faciales, Montrouge, France ; [d] Corcept Therapeutics, Menlo Park Ca, USA ; [e] GReD UMR6293 - U1103 - Clermont Université ; Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France

Séquence de survenue des complications métaboliques du syndrome de Cushing et intérêt d'une approche anti récepteur-GR : contribution d'un modèle génétique murin.

Annales d'Endocrinologie, 2015, 76 – n° 4 : 338. http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2015.07.131

Communication orale (CO-051) présentée au 32ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE), Angers, France, 7-10 octobre 2015.

Rapport

Introduction

Le syndrome de Cushing endogène (CS), est une maladie rare liée à une exposition chronique à un excès de cortisol ou glucocorticoïdes (GC). Dans 20% des cas, le cortisol est sécrété en excès, de façon indépendante de l'ACTH hypophysaire, par une tumeur surrénalienne unilatérale (adénome ou carcinome) ou bilatéral (macro ou hyperplasie micronodulaire). L'excès de cortisol est responsable de nombreuses complications métaboliques. D'une part, les troubles anaboliques associent des anomalies de la répartition des graisses, une intolérance au glucose ou un diabète dans 30 à 60% des cas, et une dyslipidémie (30%). D'autre part, des troubles cataboliques affectent à la fois la peau qui devient fine et fragile, le muscle touché par une amyotrophie proximale et l'os, siège d'une ostéoporose précoce avec un risque accru de fractures vertébrales ou de hanche. Avant que la sécrétion de cortisol ne soit franche et n'induise ces signes cliniques, la production peut être autonome et altérer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, conduisant à un Cushing sub-clinique. Sans traitement, le CS est associé à une mortalité 2 à 9 fois plus élevée que la population générale, en lien avec les complications cardio-vasculaires, thromboemboliques et infectieuses. La chirurgie constitue le traitement de première intention. En cas d'échec ou lorsque la sécrétion est trop importante en préopératoire, on peut recourir à un traitement médicamenteux comme les inhibiteurs de la stéroïdogénèse surrénalienne, tels le Kétoconazole et Métyrapone utiles à la phase aiguë, mais souvent mal tolérés (hépatite fulminante, hypokaliémie, hypertension artérielle), ou bien le Mitotane dont les effets retardés ne permettent pas le contrôle d'un CS sévère. D'autres molécules s'opposent directement à l'effet du cortisol en bloquant le récepteur des glucocorticoïdes (GR), comme la Mifepristone (RU 486) antagoniste compétitif du GR, non sélectif (agit également sur le Récepteur à la Progestérone, PR). Ces traitements sont donc peu spécifiques et présentent des effets indésirables, justifiant l'intérêt d'évaluer l'efficacité d'un nouvel antagoniste spécifique, le composé CT8. Par ailleurs, si l'efficacité du RU sur les complications anaboliques a été prouvée, nous ne connaissons pas l'effet des antagonistes du GR sur les troubles cataboliques.

L'objectif de cette étude consistait à définir la séquence d'apparition des complications cataboliques et anaboliques du syndrome de Cushing ACTH-indépendant (CS) développé par un modèle murin et d'évaluer l'efficacité d'un antagoniste sélectif du récepteur aux glucocorticoïdes (GR). A partir des souris $AdKO_{2.0}$ invalidées pour le gène ***Prkar1a*** dans le cortex surrénalien, responsable d'une hyperactivation de la Protéine Kinase A (PKA) et d'une activation constitutive de la stéroïdogénèse, nous avons évalué les conséquences cataboliques du CS sur le muscle (poids relatif des muscles gastrocnémien et soléaire) et l'os (microarchitecture en microtomographie et mesure de l'expression des marqueurs ostéoclastiques/blastiques en RTqPCR). L'évaluation des troubles anaboliques a été menée grâce à des tests de résistance à l'insuline et à l'analyse de marqueurs néoglucogéniques hépatiques (***Pepck), tandis que*** la composition corporelle a été caractérisée en EchoMRI. Dès l'apparition du CS, WT et $AdKO_{2.0}$ étaient réparties en trois bras de traitements -Véhicule, Mifepristone, CT8 (antagoniste spécifique du GR)- administrés quotidiennement par injection intrapéritonéale pendant 4 semaines.

Résultats

Les mâles $AdKO_{2.0}$ développent une hypercorticostéronémie franche, de façon précoce avant l'âge de 4 semaines ($p < 0.001$) alors qu'elle est plus tardive (vers 10 semaines) et plus modérée chez les femelles, où elle apparait après une période de Cushing sub-clinique débutant dès 8 semaines. Dans les deux sexes, on note l'indépendance du CS vis à vis de l'ACTH. L'excès de mortalité est de 50% avant l'âge de 3 mois chez les mâles. Ces derniers présentent un retard staturo-pondéral avec une taille, une longueur fémorale et un poids significativement plus faibles que les WT aux différents âges testés (4, 6, 8 et 12 semaines) ($p<0.01$).

Concernant les troubles anaboliques, dès 6 semaines pour les mâles et dès 8 semaines pour les femelles $AdKO_{2.0}$ (au stade sub-clinique), on note une résistance à l'insuline nette lors des tests dynamiques ($p<0,001$), confirmés par une hyperinsulinémie plasmatique. Ces troubles sont associés à une hyperglycémie à jeun chez les femelles, corrélés à une surexpression hépatique du gène néoglucogénique de la *Pepck* chez les femelles $AdKO_{2.0}$. En EchoMRI, on note un excès de masse grasse environ deux fois plus important chez les $AdKO_{2.0}$ que chez les souris WT dans les deux sexes (14.9% vs 8.8% pour les mâles et 19% vs 9.6% pour les femelles, $p<0.01$), l'excès étant plus marqué chez les femelles $AdKO_{2.0}$ que chez les mâles.

Concernant les troubles cataboliques, *au niveau musculaire,* la comparaison du poids relatif du muscle gastrocnémien et soléaire entre les génotypes révèle une amyotrophie dès 4 semaines chez le mâle $AdKO_{2.0}$ ($p<0,05$), et dès 6 semaines chez la femelle $AdKO_{2.0}$. Celle-ci touche préférentiellement le muscle gastrocnémien et épargne le soléaire, sauf tardivement, à 16 semaines chez la femelle. *Au niveau osseux*, l'analyse en RTqPCR d'ARN extraits de tibia montre un doublement du niveau d'expression du gène codant le récepteur à la calcitonine ($p<0.05$), marqueur ostéoclastique favorisant l'ostéorésorption, ainsi qu'une répression de l'expression du gène codant l'ostéocalcine, marqueur ostéoblastique favorisant l'ostéoformation (divisé par 5, $p<0.001$) chez les mâles $AdKO_{2.0}$ par rapport aux WT, dès 4 semaines. Grâce à l'analyse en microCT des fémurs, dès l'apparition d'un CS franc, chez les mâles $AdKO_{2.0}$ de 6 semaines, on note une altération de l'os cortical avec une épaisseur corticale plus fine, et une plus faible résistance à la flexion (MMI polaire) et à la tension (Bone Area) ($p<0.001$). Les tests de résistance confirment l'existence d'une fragilité osseuse, avec une diminution de la rigidité (module de Young), et de la résistance à la fracture ($p<0.05$ et $p<0.01$). L'architecture corticale et de la résistance osseuse sont également touchées au moment du développement d'un CS franc à l'âge de 10 semaines chez les femelles, mais de façon moins marquées que les mâles. De façon surprenante, au niveau trabéculaire, les analyses ont retrouvé une augmentation de la densité osseuse, une majoration du nombre de travées et de la distance séparant chacune d'elle, en particulier chez les femelles ($p<0.001$).

Concernant l'efficacité des antagonistes, après 28 jours de traitement par le RU 486, on observe une diminution de la résistance à l'insuline ($p<0.001$) et de l'excès de masse grasse chez les $AdKO_{2.0}$ ($p<0.001$), alors que le CT8 ne parvient pas à corriger la résistance à l'insuline et ne réduit que partiellement l'excès de masse grasse des $AdKO_{2.0}$. Sur le plan catabolique, aucun des antagonistes ne parvient à corriger l'amyotrophie du muscle gastrocnémien des $AdKO_{2.0}$ dont le poids relatif reste significativement inférieur à celui des WT dans chacun des bras de traitement. Enfin, au niveau osseux, les antagonistes sont capables de restaurer le niveau de transcrit du gène de l'ostéocalcine (d'environ 30%) chez les $AdKO_{2.0}$, tandis qu'aucun effet n'est enregistré sur les niveaux d'expression du récepteur à la calcitonine. L'analyse micro architecturale de l'os trabéculaire révèle une diminution du nombre de travées, une augmentation de la distance entre les travées sous RU et CT8, et un abaissement de la densité osseuse : ainsi les traitements semblent s'opposer à la densification trabéculaire observée chez les $AdKO_{2.0}$ traités par Véhicule, l'effet est moindre au niveau cortical, l'épaisseur corticale n'est pas modifiée par les traitements.

Conclusion

Ce travail a permis de valider le modèle $AdKO_{2.0}$ comme support d'étude du syndrome de Cushing et de ses comorbidités. Nous avons confirmé la capacité du RU à réduire les troubles anaboliques et montré sa capacité à inhiber les effets moléculaires des glucocorticoïdes à l'origine de l'hyper catabolisme osseux. Ce modèle est un outil précieux pour l'étude préclinique de l'efficacité de nouvelles molécules dans le traitement des comorbidités du CS, et il constitue un support simple et reproductible pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques des complications du CS. En particulier, la nature des atteintes osseuses suggère que la fragilité osseuse est le produit d'altérations opposées de l'os cortical et de l'os trabéculaire, une caractéristique inédite qui doit désormais être exploré chez les patients. Enfin, l'atteinte précoce avec retard staturo-pondéral, caractérisée chez les mâles, fournit un modèle unique de CS pédiatrique.

Bourse de Recherche en Endocrinologie Novartis Pharma 2014 (32 K€)

M. Sadek ISMAIL
Direction **M. Daniel FOURMY**
Equipe EA 4552 : Réceptologie et Cibles Thérapeutiques en Cancérologie – Université Paul Sabatier Toulouse III (UPS)

Mécanismes et Conséquences de l'Internalisation du Récepteur de GIP.

Internalized Receptor for Glucose-dependent Insulinotropic Peptide stimulates adenylyl cyclase on early endosomes.

Résumé

L'étude financée par la SFE a consisté à étudier comment la présence du récepteur d'une hormone, le GIP, est régulée à la surface des cellules. La fonction principale du GIP est de stimuler la sécrétion d'insuline en réponse au repas. Le mécanisme et les conséquences de l'internalisation du RGIP ont été caractérisées. Les travaux réalisés ont donné lieu à une publication dans un journal à comité de lecture (Ismail et al. Biochemical Pharmacology, 2016, in press) et à la soutenance d'une thèse d'université (S. Ismail, Université de Toulouse 3).

Abstract

The study granted by the SFE consisted in studying how the presence of the receptor for an hormone, GIP, is regulated at the cell surface. The main function of the GIP is to stimulate the secretion of insulin in response to the meal. The mechanism and the consequences of GIP receptor internalization were characterized. The achieved works gave rise to a publication in a high level international scientific journal (Ismail and al. Biochemical Pharmacology, on 2016, in press) and to the defense of a university thesis (S Ismail, University of Toulouse 3).

Publication

Sadek Ismail, Marie Julie Gherardi, Alexander Froese, Madjid Zanoum, Véronique Gigoux, Pascal Clerc, Frederique Gaits-Iacovoni, Jan Steyaert, Viacheslav Nikolaev, Daniel Fourmy (Université de Toulouse 3)

Internalized Receptor for Glucose-dependent Insulinotropic Peptide stimulates adenylyl cyclase on early endosomes.

Biochemical Pharmacology, 2016, in press.

Abstract : Until very recently, G-protein dependent signal of GPCRs was thought to originate exclusively from the plasma membrane and internalized GPCRs were considered silent. Here, we demonstrated that, once internalized and located in the membrane of early endosomes, glucose-dependent Insulinotropic receptor (GIPR) continues to trigger production of cAMP and PKA activation. Direct evidence is based on identification of the active form of Gαs in early endosomes containing GIPR using a genetically encoded GFP tagged nanobody, and on detection of a distinct FRET signal accounting for cAMP production at the surface of endosomes containing GIP, compared to endosomes without GIP. Furthermore, decrease of the sustained phase of cAMP production and PKA activation kinetics as well as reversibility of cAMP production and PKA activity following GIP washout in cells treated with a pharmacological inhibitor of GIPR internalization, and continuous increase of cAMP level over time in the presence of dominant-negative Rab7, which causes accumulation of early endosomes in cells, were noticed. Hence the GIPR joins the few GPCRs which signal through G-proteins both at plasma membrane and on endosomes.

Rapport

Le GIP « Glucose dependent insulinotropic polypeptide » est une hormone sécrétée par l'intestin en réponse au repas, dont l'une des fonctions physiologiques essentielle est la stimulation de la sécrétion d'insuline par le pancréas endocrine. Cette hormone exerce ses effets en se liant à un récepteur couplé aux protéines G, nommé RGIP. Chez les diabétiques, il semble que la réponse de ce récepteur soit fortement diminuée. A l'inverse, nous avons montré que ce récepteur est surreprésenté dans la quasi-totalité des tumeurs neuroendocrines. **Pour ces raisons, la régulation de la présence du RGIP à la surface des cellules doit être étudiée**.

Dans ce contexte, le but de notre travail a été d'abord d'étudier les mécanismes d'internalisation du RGIP et ensuite de caractériser le profil d'internalisation du N-acétyl-GIP, un analogue du GIP connu pour être résistant à la dégradation par le DPP-IV, enzyme inactivant le GIP. Enfin, nous avons étudié si, en plus de sa signalisation à la membrane cellulaire, le RGIP est capable d'induire une signalisation, une fois internalisé, c'est-à-dire à partir d'endosomes.

Nous montrons d'abord que l'internalisation du RGIP est un processus impliquant la clathrine, le complex AP-2 et la dynamine, mais pas la région C-terminale du récepteur, ni les β-arrestines1/2 classiquement impliquées dans l'internalisation de ce type de récepteur. Nous avons également montré que le N-acétyl-GIP, qui présente une activité agoniste pleine sur la production d'AMPc et sur la sécrétion d'insuline dans les cellules endocrines pancréatiques MIN-6-B1, n'est pas capable de stimuler l'internalisation du RGIP. Cela suggère que le N-acétyl-GIP pourrait être un agoniste biaisé du RGIP induisant préférentiellement la voie d'activation de l'adenylyl cyclase par Gs, comparativement à un adressage du récepteur vers des puits recouverts de clathrine et l'internalisation.

Nous avons également réussi à observer une persistance au cours du temps de la production d'AMPc induite par le GIP. Le signal persistant est dû à l'internalisation du RGIP et est irréversible après lavage du GIP de la membrane cellulaire. De plus, nous avons détecté d'une manière directe la forme active de Gαs au niveau d'endosomes contenant le RGIP en utilisant des plasmides codant pour des anticorps fusionnés à la protéine fluorescente, GFP. Enfin, en utilisant un biosenseur d'AMPc dirigé à la surface des endosomes précoces, nous avons également pu détecter d'une manière directe la production d'AMPc spécifiquement à la surface des endosomes contenant le RGIP internalisé. À notre connaissance, cette dernière observation est la première de ce genre, prouvant le concept de signalisation à partir d'endosomes par une approche de détection directe.

Les résultats de cette étude apportent des informations quant à la régulation pharmacologique de l'internalisation et de la signalisation du RGIP, ouvrant des perspectives prometteuses dans le domaine de l'endocrinologie du RGIP et de son ciblage.

Prix de Recherche en Endocrinologie Pfizer 2014 (30 K€)

Dr Anne-Marie FRANÇOIS-BELLAN
Codirection elle-même **& Pr Alain ENJALBERT**
Centre de Recherche en Neurobiologie et Neurophysiologie de Marseille (CRN2M) - CNRS UMR 7286 – Aix-Marseille Université (AMU)

Rôle du long ARN non-codant Neat1 dans la rythmicité circadienne de l'horloge hypophysaire.

Des corpuscules du noyau de la cellule font rythmer l'expression des gènes sur 24 heures.

Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements.

Résumé
Le long ARN non-codant Neat1 associé à des protéines « RNA-binding » forme des sous domaines nucléaires appelés paraspeckles dont le rôle et le fonctionnement sont largement méconnus. On sait que ces corpuscules nucléaires peuvent contrôler l'expression d'ARNm qui leur sont associés en contrôlant leur rétention dans le noyau. Nous avons montré que le nombre de ces paraspeckles dans le noyau varie au cours d'une période circadienne, ce qui permet une rythmicité d'expression des ARNm qui leur sont associés. Ce travail nous a permis d'identifier non seulement un mécanisme post-transcriptionnel impliqué dans la rythmicité d'expression des gènes mais également l'ensemble des ARNm qui sont associés aux paraspeckles dans le noyau de cellules hypophysaires.

Abstract
The long non-coding RNA Neat1 associated with RNA-binding proteins form the nuclear bodies called paraspeckles whose role and function are largely unknown. It is known that these nuclear bodies regulate the expression of associated mRNA by controlling their nuclear retention. We showed that the number of paraspeckles in the nucleus of cells follows a circadian pattern, allowing a circadian expression of associated mRNA. This work allowed us to identify not only a post-transcriptional mechanism involved in the control of circadian gene expression but also all mRNAs that are associated with paraspeckles in the nucleus of pituitary cells.

Publication

Manon Torres, Denis Becquet, Marie-Pierre Blanchard, Séverine Guillen, Bénédicte Boyer, Mathias Moreno, Jean-Louis Franc, Anne-Marie François-Bellan* (* : Faculté de Médecine Nord, Aix Marseille Université, CNRS UMR 7286, CRN2M, Marseille, France)
Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements.
eLife, 2016, 5:e14837. http://dx.doi.org/10.7554/eLife.14837.001

Abstract
Paraspeckles are nuclear bodies form around the long non-coding RNA, Neat1, and RNA-binding proteins. While their role is not fully understood, they are believed to control gene expression at a post-transcriptional level by means of the nuclear retention of mRNA containing in their 3'-UTR inverted repeats of Alu sequences (IRAlu). In this study, we found that, in pituitary cells, all components of paraspeckles including four major proteins and Neat1 displayed a circadian expression pattern. Furthermore the insertion of IRAlu at the 3'-UTR of the EGFP cDNA led to a rhythmic circadian nuclear retention of the egfp mRNA that was lost when paraspeckles were disrupted whereas insertion of a single antisense Alu had only a weak effect. Using real-time video-microscopy, these IRAlu were further shown to drive a circadian expression of EGFP protein. This study shows that paraspeckles, thanks to their circadian expression, control circadian gene expression at a post-transcriptional level.

Rapport

Introduction

La rythmicité circadienne de l'activité de l'antéhypophyse est une composante essentielle de la physiologie de la glande. En effet, ses cinq types cellulaires, corticotrope, thyréotrope, gonadotrope, somatotrope et lactotrope présentent un profil sécrétoire rythmique, pulsatile et/ou circadien. Avec une position privilégiée au sein du système circadien, étant tout à la fois sous contrôle de l'horloge centrale (les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus) mais exerçant elle-même en retour un contrôle sur cette horloge via la rythmicité des hormones qu'elle génère, l'antéhypophyse, par ses sécrétions hormonales rythmiques, coordonne toutes les glandes endocrines périphériques et constitue donc l'oscillateur circadien endocrinien majeur de l'organisme.

La conception actuelle du système circadien attribue à chaque organe, le rôle d'oscillateur circadien autonome responsable de la rythmicité circadienne des fonctions physiologiques qui lui sont propres. L'antéhypophyse ne déroge pas à cette notion puisque, conformément à cette conception nouvelle de l'organisation du système circadien, les travaux conduits dans l'équipe ont permis de montrer que la rythmicité hormonale hypophysaire pouvait être générée localement dans les cellules antéhypophysaires (Guillaumond et al, 2011; Becquet et al, 2014). Dès lors, les cellules hypophysaires peuvent être considérées comme des oscillateurs cellulaires capables de générer, lorsqu'ils sont synchronisés entre eux, des rythmes circadiens autonomes, en particulier des rythmes hormonaux.

Un des axes majeurs développés en chronobiologie a trait à la recherche des mécanismes moléculaires qui vont permettre aux oscillateurs périphériques d'assurer la rythmicité des fonctions physiologiques qu'ils contrôlent. La nature de ces mécanismes est très diverse puisque le contrôle rythmique peut s'exercer au niveau de la transcription des gènes (Ripperger & Brown, 2010), de leur régulation post-transcriptionnelle (Petrillo et al, 2011) et même au niveau post-traductionnel, certaines protéines ayant en effet une expression ou une activité rythmique sans rythmicité d'expression de leurs ARNm (Jouffe et al, 2013). Si de nombreuses études dont les nôtres (Guillaumond et al, 2011; Becquet et al, 2014) se sont focalisées sur les régulations transcriptionnelles rythmiques, on sait aujourd'hui que la rythmicité de la majorité des ARNm ne repose pas sur une transcription rythmique (Koike et al, 2012; Menet et al, 2012). En effet, il est apparu clairement que si 1 à 10% des gènes exprimés dans un organe présentent un profil rythmique, seulement 20% des ARNm rythmiques sont contrôlés au niveau transcriptionnel. Bien que largement méconnus, les mécanismes post-transcriptionnels impliqués dans la rythmicité circadienne pourraient inclure différentes étapes de la maturation des ARNm telles que l'épissage, la polyadenylation, la stabilité des ARNm ainsi que leur export cytoplasmique (Partch et al, 2014; Koike et al, 2012; Menet et al, 2012).

Travaux effectués

Nos travaux ont permis d'identifier un de ces mécanismes dans des cellules somatolactotropes hypophysaires, les cellules GH4C1 (Torres et al., eLife, 2016;5:e14837). Ce mécanisme implique un long ARN non-codant, Neat1 (Nuclear-Enriched Abundant Transcript 1) également connu sous le nom de Men1 (multiple endocrine neoplasia 1) dont nous avons montré l'expression rythmique non seulement dans les cellules GH4C1 mais également dans de nombreux oscillateurs périphériques (hypophyse, glandes surrénales, rate) ainsi que dans l'horloge centrale. Ce long ARN non-codant sert de matrice à des protéines de liaison aux ARN, l'ensemble formant des sous-domaines nucléaires qui ont été appelés paraspeckles. Nous avons montré que dans les cellules GH4C1, l'ensemble des constituants des paraspeckles (le long ARN non-codant Neat1 et les quatre protéines majeures qui lui sont associées NONO, SFPQ, PSPC1 et RBM14) présente une expression rythmique. Nous avons également montré qu'il existe un rythme du nombre de paraspeckles par noyau cellulaire identifiés en microscopie confocale après FISH (hybridation in situ de fluorescence) de Neat1.

Fonctionnellement, on sait que ces paraspeckles participent à la régulation de l'expression de gènes en contrôlant la rétention nucléaire de certains transcrits en particulier ceux qui contiennent dans leur région 3' non codante (3'-UTR) des séquences répétées et inversées de type « Alu » (séquence IRAlu) pouvant former des boucles d'ARN double brin susceptibles d'être soumises à des mécanismes d'édition (édition des adénosines en inosines) (Chen & Carmichael, 2009; Prasanth et al, 2005). Après clonage à partir de la région 3'-UTR d'un de ces transcrits, le gène Nicoline1, une séquence IRAlu a été insérée avant le site de polyadénylation en 3'-UTR de l'ADN codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP). Après transfection de cette construction dans des cellules GH4C1 et sélection de lignées exprimant de manière stable cette construction, nous avons montré que l'introduction de cette séquence de type IRAlu dans la région 3'-UTR du gène rapporteur Egfp va entrainer un rythme circadien de la rétention nucléaire de l'ARNm Egfp associé à un rythme circadien de l'expression de la protéine EGFP détecté par vidéo-microscopie en temps réel. Lorsque les paraspeckles sont détruits après transfection des cellules par des siRNA ou des ologonucléotides antisens dirigés contre Neat1, ces rythmes disparaissent (Torres et al., eLife, 2016;5:e14837).

Il apparaît donc qu'un des mécanismes post-transcriptionnels qui peut concourir au contrôle rythmique de l'expression de gènes repose sur une rétention nucléaire rythmique d'ARNm par les paraspeckles avec en corollaire un export cytoplasmique rythmique de ces ARNm (Torres et al., eLife, 2016;5:e14837).

Pour évaluer la contribution de Neat via les paraspeckles au transcriptome rythmique hypophysaire, il fallait pouvoir identifier l'ensemble des ARNm retenus par les paraspeckles dont l'expression est rythmique. Pour cela nous avons développé une approche permettant d'identifier l'ensemble des ARNm associés à Neat1, donc aux paraspeckles. Cette approche a été adaptée de deux techniques récemment décrites dénommées respectivement ChIRP (chromatine isolation by RNA purification ; (Chu et al, 2012)) et CHART (capture hybridization analysis of RNA targets ; (Simon, 2013)) qui permettent de définir les cibles ADN d'un ARN (le plus souvent un long ARN non codant) isolé à l'aide d'oligonucléotides anti-sens biotinylés. Nous avons adapté ces techniques en vue d'identifier non plus les cibles ADN mais les cibles ARN associées à Neat1 isolé par des oligonucléotides biotinylés. Nous avons dénommé cette approche RIRP pour « RNA Isolation by RNA Purification ».

En couplant cette technique à du séquençage haut débit des ARN (RNA-Seq), nous avons identifié l'ensemble des ARNm associés à Neat1 et donc retenus par les paraspeckles dans notre modèle cellulaire. En confrontant cette liste d'ARNm aux données disponibles de la littérature telles que la liste des ARNm rythmiques dans l'hypophyse de souris (Hughes et al, 2007) ou celle des ARNm dont le rythme est contrôlé au niveau post-transcriptionnel dans le foie de souris (Menet et al, 2012), nous avons obtenu des taux de recouvrement importants respectivement de 18 et 27%, sachant que ces taux sont vraisemblablement sous-estimés puisqu'ils proviennent de la comparaison de listes obtenues à partir de structures et d'espèces différentes.

En sélectionnant quelques gènes dans notre liste, nous avons montré que les ARNm de ces gènes présentent un rythme circadien de leur rétention nucléaire et que ce rythme est aboli lorsque les paraspeckles sont détruits confirmant sur des ARNm endogènes, la fonctionnalité des paraspeckles dans le contrôle post-transcriptionnel rythmique des gènes (Torres et al., eLife, 2016;5:e14837).

Conclusion

Ce travail s'inscrit dans un domaine de recherche qui associe **la neuroendocrinologie à la chronobiologie** que les avancées majeures actuelles positionnent clairement comme une discipline incontournable de la physiologie. Au-delà du décodage des mécanismes moléculaires souvent complexes qui sont à la base de la rythmicité circadienne d'une pléiade de gènes dans l'organisme, l'ambition, au plan neuroendocrinien, est de reconsidérer le rôle de l'hypophyse dans le contrôle des grandes fonctions physiologiques rythmiques en mettant en exergue l'importance de son autonomie au sein du système circadien.

La poursuite de ce travail s'ouvrira vers la clinique en proposant l'étude des perturbations de ce système circadien dans certaines pathologies, avec l'ambition de souligner l'importance du bon fonctionnement de ce système dans le maintien de l'intégrité des fonctions endocriniennes.

Production scientifique

Article original

Torres M, Becquet D, Blanchard MP, Guillen S, Boyer B, Moreno M, Franc JL, François-Bellan AM
Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements.
eLife, 2016;10.7554/eLife.14837

Communications lors de Congrès

Communications orales :

Manon Torres, Denis Becquet, Séverine Guillen, Bénédicte Boyer, Mathias Moreno, Marie-Pierre Blanchard, Jean-Louis Franc and Anne-Marie François-Bellan
Rythmicité circadienne d'ARNm dépendante de séquences IRAlu de la région 3'UTR liées par les paraspeckles.
45ème congrès de la Société Francophone de Chronobiologie associée à la Société Canadienne de Chronobiologie, Strasbourg, France, 14-16 Septembre 2016.

Manon Torres, Denis Becquet, Séverine Guillen, Bénédicte Boyer, Mathias Moreno, Marie-Pierre Blanchard, Jean-Louis Franc and Anne-Marie François-Bellan
Rythmicité circadienne d'ARNm dépendante de séquences IRAlu de la région 3'UTR liées par les paraspeckles.
41ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie et 5ème franco-Québécois, Corte, France, 5-8 octobre, 2016.

Manon Torres, Denis Becquet, Séverine Guillen, Bénédicte Boyer, Mathias Moreno, Marie-Pierre Blanchard, Jean-Louis Franc and Anne-Marie François-Bellan
Mécanismes moléculaires à la base de la rythmicité circadienne hypophysaire.
41ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie et 5ème franco-Québécois, Corte, France, 5-8 octobre, 2016.

Communications affichées :

Torres M., Becquet D., Guillen S., Boyer B., Moreno M., Blanchard M.P., Franc J.L., François-Bellan A.M.
Neat1 a long non-coding RNA involved in pituitary circadian rhythms: characterization of its interactome.
XIV European Biological Rhythms Society, Manchester, UK, 2-6 august, 2015.

Torres M., Becquet D., Guillen S., Boyer B., Moreno M., Blanchard M.P., Franc J.L., François-Bellan A.M.
Neat1 a long non-coding RNA involved in pituitary circadian rhythms: characterization of its interactome.
40ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie et 3ème BSN-SNE joint meeting, Lille, France, 23-25 septembre, 2015.

Valorisation Scientifique

Brève INSB dans la lettre bi-mensuelle " En direct des labos " (13 septembre 2016).

http://www.cnrs.fr/endirectdeslabos/lettre.php?numero=181

Article

Des corpuscules du noyau de la cellule font rythmer l'expression des gènes sur 24 heures

Pour s'adapter à l'alternance quotidienne de jour et de nuit, tous les organismes ont développé une rythmicité de leurs fonctions sur 24 heures. Au niveau cellulaire, de nombreux gènes suivent une telle rythmicité dont les mécanismes restent méconnus. L'équipe d'Anne-Marie François-Bellan au Centre de recherche en neurobiologie- neurophysiologie de Marseille révèle l'implication dans cette expression rythmique de corpuscules nucléaires dont le nombre varie au cours de 24 heures et le ciblage thérapeutique pourrait permettre de contrôler les pathologies associées à des dysfonctionnements rythmiques. Cette étude est publiée dans la revue *eLife*.

L'adaptation aux contraintes d'un environnement en évolution permanente impose aux êtres vivants des fluctuations rythmiques de leurs paramètres biologiques. Ces fluctuations rythmiques concernent une multitude de processus, depuis le métabolisme cellulaire jusqu'aux activités comportementales et physiologiques y compris la température corporelle, la pression sanguine et les taux d'hormones. Les recherches en chronobiologie ont permis de montrer à quel point cette rythmicité, et en particulier sa composante dite « circadienne » pour exprimer le fait qu'elle se manifeste sur une base proche de 24h, est une composante essentielle de cette adaptation des êtres vivants. C'est vraisemblablement parce qu'ils jouent un rôle primordial en tant que mécanismes adaptatifs indispensables à la survie que le dérèglement des rythmes circadiens est associé à de nombreuses pathologies dont les plus étudiées sont les pathologies hormonales et métaboliques, cardiovasculaires, neuropsychiatriques et les cancers.

La rythmicité de bon nombre de fonctions biologiques repose en partie sur la rythmicité d'expression d'ARNm au sein de la cellule. On sait aujourd'hui, contrairement aux idées initiales, que la rythmicité de la majorité des ARNm ne repose pas sur une transcription rythmique. Il est en effet récemment apparu que si jusqu'à 20% des gènes exprimés dans un organe présentent un profil rythmique, seulement 20% des ARNm rythmiques sont contrôlés au niveau transcriptionnel. Un des enjeux actuels en chronobiologie est la recherche de ces mécanismes largement méconnus qui s'exercent après la transcription et sont impliqués dans la régulation des rythmes circadiens.

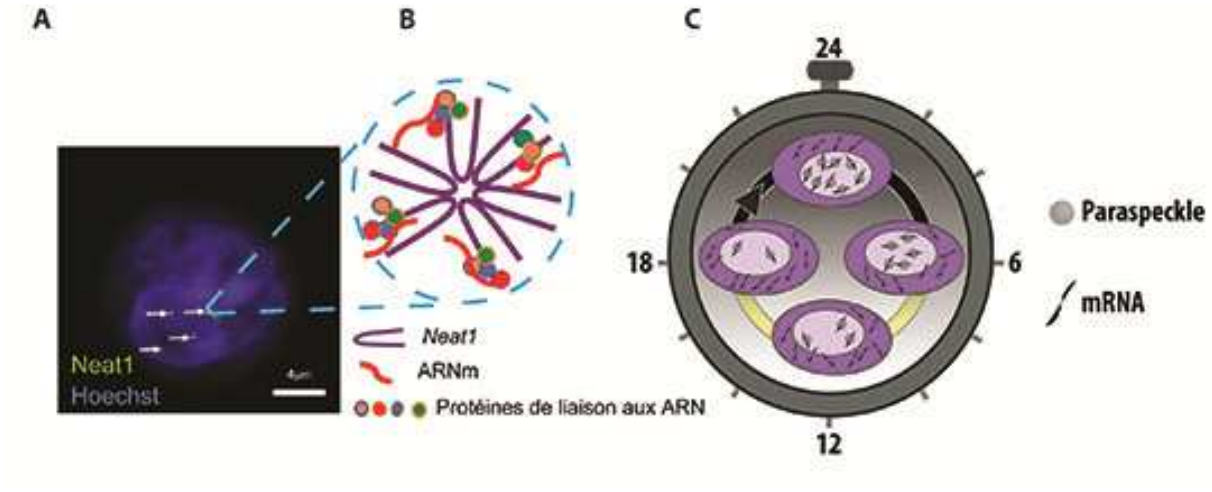
L'équipe d'Anne-Marie François-Bellan a caractérisé un de ces mécanismes post-transcriptionnels qui permet l'expression rythmique d'ARNm dans des cellules de l'hypophyse. Ce mécanisme implique un long ARN non-codant, Neat1 (Nuclear-Enriched Abundant Transcript 1) dont l'expression rythmique a pu être mise en évidence non seulement dans les cellules hypophysaires mais également dans de nombreux autres oscillateurs circadiens ainsi que dans l'horloge hypothalamique circadienne. Ce long ARN non-codant sert de matrice d'assemblage à des protéines de liaison aux ARN, l'ensemble formant des corpuscules nucléaires qui ont été appelés paraspeckles. Les chercheurs ont montré que tous les composants des paraspeckles ainsi que le nombre des paraspeckles, présentent une rythmicité circadienne d'expression et d'association à l'intérieur des cellules hypophysaires.

Bien que leur fonction soit largement méconnue, on sait que ces paraspeckles peuvent entrainer une rétention nucléaire d'ARNm lorsque ceux-ci présentent dans leur région 3'UTR des séquences répétées et inversées de type Alu (IRAlu), ce qui va empêcher leur export cytoplasmique et permettre dès lors le contrôle de leur niveau d'expression. Les chercheurs ont alors émis l'hypothèse selon laquelle la rythmicité du nombre de ces corps nucléaires pourrait permettre la rythmicité circadienne des ARNm qu'ils retiennent dans le noyau. De fait, ils ont montré que l'insertion d'une séquence IRAlu

dans la région 3'UTR du gène rapporteur egfp, induit une rétention nucléaire rythmique de l'ARNm egfp. Cette rétention est abolie après destruction des paraspeckles par des siRNA ou des oligonucléotides antisens de Neat1. Par vidéo microscopie en temps réel, ils ont montré que cette séquence IRAlu en 3'UTR de l'egfp entraîne une expression cytoplasmique rythmique de la protéine EGFP. Grâce à une technique de précipitation spécifique de l'ARN Neat1, ils ont isolé et, après séquençage haut débit, identifié l'ensemble des ARNm associés à Neat1. A partir d'exemples d'ARNm sélectionnés dans cette liste, ils ont montré que les ARNm associés à Neat1 présentent une rétention nucléaire rythmique abolie après destruction des paraspeckles.

Ces données montrent que les paraspeckles, grâce à leur expression circadienne, peuvent contrôler la rythmicité circadienne d'expression des ARNm qui leur sont associés et permettent de proposer un nouveau mécanisme post-transcriptionnel original impliqué dans le fonctionnement du système circadien.

Le ciblage thérapeutique des paraspeckles pourrait être à la base de nouvelles stratégies permettant de contrôler les rythmes circadiens, avec l'objectif d'améliorer les situations, en pathologique humaine, qui sont associées à un dysfonctionnement de la rythmicité des fonctions, en particulier des fonctions hormonales. Outre le décryptage d'un mécanisme post-transcriptionnel impliqué dans la régulation circadienne de l'expression de gènes, une problématique ancrée dans le domaine de la chronobiologie, cette étude, dans le domaine de l'endocrinologie fondamentale et/ou clinique, permet d'attribuer un rôle, dans la physiologie et la pathologie de l'hypophyse, à ce long ARN non-codant, Neat1, dont les fonctions demeurent énigmatiques.



Légende. Structure des paraspeckles et implication fonctionnelle dans l'expression rythmique d'ARNm.
A : Visualisation des paraspeckles identifiés par leur constituant principal, le long ARN non-codant, Neat1, à l'intérieur du noyau des cellules coloré en bleu par le colorant de Hoechst.
B : Organisation schématique des différents constituants des paraspeckles.
C : La rythmicité du nombre de paraspeckles à l'intérieur du noyau permet le contrôle de l'expression des ARNm associés.

Ce travail a bénéficié d'un prix de recherche Pfizer-Société Française d'Endocrinologie.

Références

Becquet D, Boyer B, Rasolonjanahary R, Brue T, Guillen S, Moreno M, Franc JL, François-Bellan AM. 2014. Evidence for an internal and functional circadian clock in rat pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* **382**: 888-898. doi:10.1016/j.mce.2013.11.004.

Chen LL, Carmichael GG. 2009. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol Cell* **35**: 467-478. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.027.

Chu C, Quinn J, Chang HY. 2012. Chromatin isolation by RNA purification (ChIRP). *J Vis Exp* **61**: e3912. doi:10.3791/3912.

Guillaumond F, Boyer B, Becquet D, Guillen S, Kuhn L, Garin J, Belghazi M, Bosler O, Franc JL, François-Bellan AM. 2011. Chromatin remodeling as a mechanism for circadian prolactin transcription: rhythmic NONO and SFPQ recruitment to HLTF. *FASEB J* **25**: 2740-2756. doi:10.1096/fj.10-178616.

Hughes M, Deharo L, Pulivarthy SR, Gu J, Hayes K, Panda S, Hogenesch JB. 2007. High-resolution time course analysis of gene expression from pituitary. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **72**: 381-386. doi:10.1101/sqb.2007.72.011.

Jouffe C, Cretenet G, Symul L, Martin E, Atger F, Naef F, Gachon F. 2013. The circadian clock coordinates ribosome biogenesis. *PLoS Biol* **11**: e1001455. doi:10.1371/journal.pbio.1001455.

Koike N, Yoo SH, Huang HC, Kumar V, Lee C, Kim TK, Takahashi JS. 2012. Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science* **338**: 349-354. doi:10.1126/science.1226339.

Menet JS, Rodriguez J, Abruzzi KC, Rosbash M. 2012. Nascent-Seq reveals novel features of mouse circadian transcriptional regulation. *Elife* **1**: e00011. doi:10.7554/eLife.00011.

Partch CL, Green CB, Takahashi JS. 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol* **24**: 90-99. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.002.

Petrillo E, Sanchez SE, Kornblihtt AR, Yanovsky MJ. 2011. Alternative splicing adds a new loop to the circadian clock. *Commun Integr Biol* **4**: 284-286. doi:10.4161/cib.4.3.14777.

Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL. 2005. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* **123**: 249-263. doi:10.1016/j.cell.2005.08.033.

Ripperger JA, Brown SA. 2010. Transcriptional regulation of circadian clocks. *The Circadian Clock:* 37-78.

Simon MD2013. Capture hybridization analysis of RNA targets (CHART). *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 21**: Unit 21.25. doi:10.1002/0471142727.mb2125s101.

Allocation de Recherche en Endocrinologie SFE 2014 (50 K€)

Dr Pierre VAL
Codirection lui-même **& Pr Chantal VAURY-ZWILLER**
GReD (Génétique, Reproduction et Développement), CNRS UMR 6293 - Université de Clermont-Ferrand - Blaise Pascal, Faculté de Médecine, Campus des Cézeaux, Aubière

Rôle de EZH2 et du complexe PRC2 dans la physiopathologie de la cortico-surrénale.

Analysis of a mouse model of adrenal insufficiency resulting from Eed gene ablation.

Résumé

Les facteurs épigénétiques sont des acteurs clés du développement, de l'homéostasie tissulaire et de la tumorigenèse. Nous venons de démontrer que l'histone méthyl-transférase EZH2 qui pose la marque répressive H3K27me3 est surexprimée dans les corticosurrénalomes dans lesquels elle participe à l'acquisition de caractéristiques agressives. Afin d'évaluer le rôle physiologique de EZH2 dans la surrénale, nous l'avons invalidé génétiquement chez la souris. Cette invalidation conduit à une hypoplasie surrénalienne et à une insuffisance en glucocorticoïdes. Nos analyses moléculaires montrent que EZH2 joue un rôle précoce essentiel pour la détermination de l'identité surrénalienne au cours du développement et qu'il est ensuite indispensable au maintien de l'identité de la zone fasciculée après la naissance. Ces résultats mettent en avant EZH2 comme un régulateur essentiel de l'homéostasie et de l'activité endocrine du cortex surrénalien.

Abstract

Epigenetic factors are essential regulators of development, tissue homeostasis and tumorigenesis. We have recently shown that the histone methyl-transferase EZH2, which catalyses deposition of the repressive H3K27me3 mark, is overexpressed in adrenal cortex carcinomas, where it favours acquisition of malignant characteristics. We have evaluated the physiological role of EZH2 in the adrenal by gene ablation in mouse. EZH2 knockout results in adrenal hypoplasia and glucocorticoid insufficiency. Molecular analyses show that EZH2 plays an early role in determining adrenal cortex identity during embryonic development and that it is essential for maintenance of zona fasciculata identity after birth. These data show that EZH2 is an essential regulator of adrenal cortex homeostasis and endocrine activity.

Publications

Drelon C, Berthon A, Mathieu M, Ragazzon B, Kuick R, Tabbal H, Septier A, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Sahut-Barnola I, Dumontet T, Pointud JC, Lefrançois-Martinez AM, Baron S, Giordano TJ, Bertherat J, Martinez A, **Val P**.
EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression.
Hum Mol Genet, 2016, pii: ddw136

Drelon C, Berthon A, Sahut-Barnola I, Mathieu M, Dumontet T, Rodriguez S, Batisse-Lignier M, Tabbal H, Tauveron I, Lefrançois-Martinez AM, Pointud JC, Gomez-Sanchez CE, Vainio S, Shan J, Sacco S, Schedl A, Stratakis CA, Martinez A & **Val P**.
PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour progression.
Nature Communications, 2016, *in press*.

Rapport

Les facteurs épigénétiques sont des acteurs clés du développement, de l'homésotasie tissulaire et de la tumorigenèse. Ils comprennent des enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN et des histones, permettant la transmission de patterns d'expression génique. La méthylation des histones peut conduire à l'activation ou l'inactivation de l'expression génique en fonction des résidus ciblés. La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est une marque répressive mise en place par l'histone méthyl-transférase EZH2 au sein d'un complexe répressif appelé PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Dans ce complexe, EZH2 est associé à SUZ12 et EED qui sont essentiels pour son activité catalytique. La marque répressive H3K27me3 est impliquée dans la répression des gènes HOX au cours du développement précoce, dans l'inactivation du chromosome X chez la femme et dans la maintenance de l'identité et de la pluripotence des cellules souches. Les composants du complexe PRC2 sont fréquemment surexprimés dans les cancers et associés à la progression maligne. A contrario, l'invalidation génique EZH2 chez la souris a permis de démontrer son rôle essentiel dans l'ontogenèse tissulaire et l'homéostasie des tissus adultes, grâce à l'établissement de patterns spatio-temporels d'expression de gènes

développementaux et du cycle cellulaire. Nous venons de montrer que EZH2 est surexprimé dans le corticosurrénalome (CCS), dans lequel il est associé au mauvais pronostic. Son inhibition pharmacologique et par ARN interférence freine la prolifération de cellules de CCS en culture (H295R) et induit leur apoptose. Ces effets sont amplifiés par le mitotane, suggérant que EZH2 pourrait constituer une cible thérapeutique pertinente dans le CCS (Drelon C. et al., 2016 Hum Mol Genet). Toutefois, le rôle de EZH2 dans le développement et le contrôle de l'homéostasie du cortex surrénalien sont inconnus.

Afin d'identifier les fonctions physiologiques de EZH2, nous l'avons invalidé dans la cortico-surrénale grâce à deux drivers permettant l'expression de la recombinase Cre au cours du développement embryonnaire (Sf1:Cre) et en période périnatale (AS:Cre). Nous avons alors conduit une analyse histologique, hormonale et moléculaire des souris invalidées.

Nos résultats montrent que l'invalidation de EZH2 induit deux phénotypes surrénaliens majeurs distincts :

1/ L'analyse histologique de marqueurs de différenciation zonale, complétée par une analyse d'expression génique par micro-arrays montre que les souris Sf1:Cre Ezh2 Fl/Fl présentent un défaut majeur de différenciation de la zone fasciculée du cortex surrénalien au profit d'une expansion de la zone glomérulée. Ces défauts tissulaires sont associés à une insuffisance isolée en glucocorticoïdes et à un excès d'ACTH, alors que les taux d'aldostérone plasmatique sont normaux. Les défauts de différenciation fasciculée pourraient résulter d'un blocage de la conversion de lignage glomérulée vers fasciculée qui constitue le mécanisme principal de renouvellement du cortex. De fait, l'invalidation avec le driver tardif AS:Cre induit également un défaut de différenciation fasciculée et une expansion de la glomérulée. Nous venons de montrer que la conversion de lignage repose sur un subtil équilibre entre voies de signalisation WNT, induisant la différenciation glomérulée et PKA, bloquant la différenciation glomérulée et induisant la différenciation fasciculée (Drelon C. et al., 2016 Nature Communications). L'analyse des données d'expression génique montre une surexpression de nombreuses phosphodiestérases chez les souris KO EZH2, suggérant que EZH2 pourrait favoriser l'acquisition de l'identité fasciculée en bloquant l'expression d'antagonistes de la signalisation PKA. Cette hypothèse est en cours d'évaluation au laboratoire.

2/ L'analyse histologique des surrénales ayant subi l'invalidation précoce met en évidence un épaississement capsulaire et un envahissement du cortex par des cellules d'aspect fibroblastique. Ces cellules expriment de manière anormale des marqueurs précoces exprimés dans le primordium adrénogonadique tels que WT1 et GATA4. Leur accumulation dans le cortex est associée à une activation de la voie de signalisation Hedgehog, mise en évidence par une surexpression des marqueurs Gli1 et Patched 1, alors même que l'expression du ligand Shh n'est pas induite. Ce phénotype n'est pas retrouvé chez les souris invalidées avec le driver tardif AS:Cre, indiquant que le phénomène a une origine développementale. Cette hypothèse est confirmée par l'observation d'une expression anormale de GATA4 dans l'ensemble des cellules corticales des souris KO, alors même que l'expression de ce facteur est normalement éteinte dans la surrénale dès E12.5. D'un point de vue moléculaire, des données de ChIP indiquent que EZH2 pourrait agir comme un master-régulateur de l'identité surrénalienne en inhibant l'expression de WT1 et GATA4, deux déterminants de l'identité gonadique, dès l'émergence de l'ébauche surrénalienne à partir du primordium adrénogonadique. L'observation d'une surexpression de TCF21 et GLI1 chez les souris invalidées pour EZH2 est en accord avec cette hypothèse, ces deux facteurs étant contrôlés positivement par WT1. De manière intéressante, au cours du vieillissement des souris, les cellules présentant une identité gonadique anormale semblent contribuer à compenser l'hypoplasie initiale de la zone fasciculée, en subissant une différenciation surrénalienne partielle. La contribution de ces cellules au maintien de la fonction surrénalienne est actuellement évaluée en invalidant conjointement GATA4 et EZH2 grâce à Sf1:Cre.

Dans l'ensemble, nos résultats mettent en évidence un rôle crucial de EZH2 pour l'établissement de l'identité surrénalienne au cours du développement et pour la différenciation fonctionnelle de la zone fasciculée. Ces phénotypes sont également observés en réponse à l'invalidation de EED, que nous avons conduite avec Sf1:Cre. Ceci suggère que le rôle de EZH2 dans la physiologie surrénalienne repose essentiellement sur son activité au sein du complexe PRC2. L'hypothèse d'un rôle de EZH2 et plus largement de PRC2 dans l'insuffisance familiale en glucocorticoïde chez les patients, est encore en cours d'évaluation au laboratoire.

Bourse de Recherche en Endocrinologie SFE 2014 (42 K€)

Dr Soazig LE PENNEC
Codirection **Dr Frédérique ALBERTINI SAVAGNER & Pr Angelo PARINI**
Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC) - INSERM UMR 1048 - équipe 6 : Remodelage cardiaque : aspects physiopathologiques et nouvelles thérapeutiques, Université Paul Sabatier Toulouse III (UPS)

Dérégulation énergétique, horloge circadienne et maladies métaboliques.

Résumé

Les fonctions physiologiques des êtres vivants oscillent sur une période de 24 heures. Ces rythmes sont assurés par l'horloge circadienne. Au niveau moléculaire, les gènes de l'horloge (*CLOCK*, *BMAL1*…) régulent de nombreux processus physiologiques, dont le métabolisme cellulaire. Les coactivateurs transcriptionnels PGC1α/β et PRC, impliqués dans le fonctionnement mitochondrial, permettent l'intégration de l'état métabolique cellulaire à l'horloge circadienne. PGC-1α, en association avec les récepteurs nucléaires RORs, stimule l'expression de *BMAL1*. Le rôle des autres coactivateurs de la famille PGC-1 comme régulateurs de l'horloge circadienne est peu connu. Les résultats de notre étude ont permis de démontrer l'implication du coactivateur PRC dans une boucle de contrôle de l'horloge circadienne et suggèrent que PRC, en association avec les facteurs de transcription ERRα et RORα, représente un niveau de régulation du métabolisme énergétique des cellules tumorales thyroïdiennes en intégrant les signaux de l'horloge circadienne.

Abstract

In living organisms, physiological functions oscillate during a 24-hour period. These rhythms are controlled by the circadian clock. At the molecular level, circadian clock genes (*CLOCK*, *BMAL1*…) regulate many physiological processes, including cellular metabolism. Transcriptional coactivators PGC1α/β and PRC, involved in mitochondrial function, enable the integration of cellular metabolic state to the circadian clock. PGC1α, in combination with nuclear receptors RORs, stimulates the expression of *BMAL1*. The role of the other PGC-1 coactivators as regulators of the circadian clock is not known. The results of our study have demonstrated the involvement of the PRC coactivator in a control loop of the circadian clock and suggest that PRC, in combination with the transcription factors ERRα and RORα, represents a level of regulation of energy metabolism in thyroid tumor cells by integrating the signals of the circadian clock.

Rapport

Les fonctions physiologiques oscillent de façon régulière sur une période de 24 heures. Cette variation rythmique est assurée par un réseau d'oscillateurs moléculaires représentant l'horloge circadienne. Grâce à ce réseau, un organisme intègre les signaux de l'environnement (alternance jour-nuit, cycles alimentaires…) et établit l'organisation temporelle de son homéostasie (par exemple, chez l'animal : le cycle veille-sommeil, la fréquence cardiaque, le catabolisme des nutriments et la sécrétion de nombreuses hormones). Les protéines *CLOCK* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) et *BMAL1* (Brain and Muscle ARNT-Like Protein 1) sont des acteurs majeurs de l'horloge circadienne. Ces facteurs de transcription interagissent avec des récepteurs nucléaires et permettent notamment la régulation du métabolisme cellulaire. Ainsi, l'homéostasie métabolique obéit à un rythme circadien. L'invalidation des gènes de l'horloge a été associée au développement de nombreuses pathologies telles que les maladies métaboliques ainsi que les cancers, notamment les tumeurs du système endocrinien. En effet, le flux d'informations entre variation circadienne et fonctions endocrines étant particulièrement étroit, toute dérégulation de l'horloge peut être un facteur de risque du développement de tumeurs endocrines. Les mécanismes associant l'horloge circadienne, et son complexe d'initiation *CLOCK/BMAL1*, à la régulation du métabolisme et du cycle cellulaire ne sont pas encore clairement établis mais les anomalies métaboliques des cellules cancéreuses sont maintenant considérées comme une conséquence du dysfonctionnement de l'horloge circadienne.

Dans les cellules normales, les mitochondries représentent la principale source de production d'énergie. Dans les cellules prolifératives, notamment cancéreuses, le métabolisme et les réseaux de production d'énergie sont modifiés. Dans le cas des cellules tumorales, ces modifications permettent la prolifération rapide et la survie des cellules dans des conditions difficiles et favorisent également les phénomènes d'invasion, de développement de métastases et de résistance aux thérapies anticancéreuses. Pour autant le dialogue entre les points de contrôle du cycle cellulaire et ceux de la prolifération et de la fonction mitochondriales n'est pas clairement défini. Les coactivateurs transcriptionnels de la famille PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1) ─ PGC-1α, PGC-1β et PRC (PGC-1-Related Coactivator) ─ jouent un rôle pivot entre le fonctionnement et la biogenèse de la chaîne respiratoire mitochondriale et les voies menant au catabolisme ou à l'anabolisme cellulaires. Ces coactivateurs sont exprimés de manière rythmique dans divers tissus. PGC-1α, en association avec les récepteurs nucléaires RORs (Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor), stimule l'expression de *BMAL1* et de ses gènes cibles, permettant ainsi l'intégration de l'état métabolique cellulaire à l'horloge circadienne. Le rôle des autres coactivateurs de la famille PGC-1 comme régulateurs de l'horloge circadienne est peu connu. La méthode de ChIP-chip (Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip) permet d'identifier les protéines interagissant avec l'ADN. En utilisant cette méthode dans le modèle de tumeur thyroïdienne XTC.UC1, nous avons montré que le coactivateur PRC était capable d'interagir avec une zone du promoteur de *CLOCK* et que les récepteurs nucléaires ERRα (Estrogen-Related Receptor α) et RORα se fixent également sur cette zone. Cette découverte a été le point de départ de mon projet visant à caractériser les interactions entre PRC/PGC-1α et *CLOCK*/*BMAL1* ainsi que les gènes régulant le métabolisme énergétique et le cycle cellulaire.

Trois éléments de réponse aux récepteurs aux œstrogènes (ERRE) ont été identifiés dans le promoteur du gène *CLOCK*. Pour déterminer le rôle d'ERRα et de PRC dans la régulation de l'expression de *CLOCK*, nous avons utilisé différentes constructions d'un vecteur contenant le promoteur du gène *CLOCK* (comportant 0, 1, 2 ou les 3 ERRE) couplé à la luciférase. Les cellules RO82 W-1, modèle de carcinome thyroïdien folliculaire exprimant faiblement PRC et ERRα, ont été co-transfectées avec ces différentes constructions et les plasmides d'expression d'ERRα et/ou de PRC. Ces expériences ont mis en évidence que la présence du complexe PRC-ERRα permet d'activer efficacement l'expression de *CLOCK*.

Nous avons ensuite vérifié par PCR quantitative que l'expression des gènes de l'horloge ainsi que celle des coactivateurs PRC et PGC-1α obéit à un rythme circadien dans le modèle XTC.UC1 (prélèvement de cellules toutes les 4 heures pendant 40 heures après induction de l'horloge circadienne par un choc sérique ou traitement par la déxamethasone).

Nous avons également étudié les impacts génomiques et fonctionnels de l'invalidation des gènes *PRC*, *PGC-1α* et *CLOCK* dans les cellules XTC.UC1 : mesure du niveau d'expression des gènes de l'horloge et de leurs cibles principales ainsi que mesure du statut proliératif cellulaire.

Les résultats de notre étude ont permis de démontrer l'implication du coactivateur PRC dans une boucle de contrôle de l'horloge circadienne et suggèrent que PRC, en association avec les facteurs de transcription ERRα et RORα, représente un niveau de régulation du métabolisme énergétique des cellules tumorales thyroïdiennes en intégrant les signaux de l'horloge circadienne.

Notre objectif à plus long terme est d'une part de proposer des biomarqueurs d'adaptation métabolique et des cibles thérapeutiques associées aux réseaux métaboliques interagissant avec les gènes de l'horloge ; et d'autre part d'étudier l'impact des dysfonctionnements de l'horloge circadienne sur le traitement des tumeurs endocrines par les thérapies ciblées.

Bourse de Master 2 SFE 2014 (32 K€)

Mlle Hélène HOTH GUECHOT
Codirection **Pr Marie-Christine VANTYGHEM-HAUDIQUET & Pr Julie KERR-CONTE & Pr François PATTOU**
INSERM UMR 1190 – EGID – Laboratoire de Recherche Translationnelle du diabète dirigé par le Pr F. Pattou - CHRU - Université de Lille 2 - Faculté de Médecine, Pôle Recherche, Lille

Effet du Sirolimus associé ou non au Tacrolimus sur les cellules adipocytaires et béta pancréatiques greffées chez la souris immunodéficiente.

Effet du sirolimus sur les cellules beta pancréatiques humaines greffées chez la souris immunodéficiente selon l'environnement métabolique.

Résumé

Introduction: La thérapie cellulaire du diabète insulino-prive permet d'obtenir 50% d'insulino-indépendance à 5 ans tandis que 75% des greffons sont fonctionnels à 10 ans sous une immunosuppression associant anti-récepteur de l'interleukine2, tacrolimus et sirolimus. Le sirolimus, inhibiteur de mTOR inhibe l'adipogenèse, mais ses effets métaboliques sont controversés. Nous avons testé l'hypothèse que le sirolimus avait un rôle dual sur les cellules béta, selon l'environnement métabolique sur un modèle de souris greffé d'îlots humains soumises à un régime normal ou hyperlipidique.

Méthodes: Dix souris immunodéficientes RAG2KO ont reçu une greffe de 400 îlots humains (Gargani 2013), puis ont été soumises 6 semaines à un régime normal (N) ou hyperlipidique (HFD). Les souris ont reçu 0,2 mg/kg/jour de sirolimus (S) ou d'une solution véhicule (C) par voie intrapéritonéale avec mesures itératives de: poids, glycémie, C-peptide humain, et analyse du volume des greffons par morphométrie.

Résultats: Le poids des souris traitées par sirolimus est inférieur à celui des souris non traitées quel que soit le régime N ou HFD. Les souris traitées par sirolimus sous régime HFD sont plus insulino-résistantes (HOMA2 IR: souris HFD/S 2,15±0,46 *vs.* HFD/C 1,89±0,40). Les souris traitées par sirolimus sous régime N sont plus insulino-sensibles (OGTT : N/S : AUC 166 ± 1.75 *vs.* Souris N/C : 236 ± 45.75) tandis que les souris HDF/S sont moins glucose-sensibles (AUC 315.6 ± 39.29 N=3 *vs.* Souris HFD/C : 268.8 ± 27.59 N=3). Le volume d'îlots humains greffés aux souris N/S (0.147±0,012 mm^2) est plus élevé que celui des souris N/C (0,097±0,044) et inversement pour les souris HFD/S (0,117±0,048) et HFD/C (0,167±0,086).

Conclusion : Le sirolimus entraîne une perte de poids ou une moindre prise pondérale. Ses effets métaboliques dépendent de l'environnement métabolique: il améliore le fonctionnement des cellules béta humaines en régime normal mais s'avère délétère en régime hyperlipidique.

Abstract

Introduction: Cell therapy of C-peptide-negative diabetes leads to 50% insulin-independence at 5 years and 75% functional grafts at 10 years under immunosuppression including anti-interleukine2-receptor, tacrolimus, and sirolimus. Sirolimus, a mTOR inhibitor, prevents adipogenesis, but its metabolic effects are controversial. Sirolimus may have a dual role on beta-cells, based on the underlying metabolic environment. This hypothesis was tested on a human-islets-engrafted mouse model, treated or not with sirolimus and fed a normal or high fat diet.

Methods: Ten mice RAG2KO transplanted with 400-human islet-equivalents under the kidney capsule, were fed for 6 weeks on a normal (N; n = 4) or high fat (HFD; n = 6) diet. Mice received 0.2 mg/kg/day of sirolimus (S) or a vehicle solution (C) intraperitoneally with repeated measures of: weight, blood glucose, human C-peptide, and analysis of the volume of islet-grafts after sacrificing mice.

Results: The weights of mice treated with sirolimus were lower than the untreated mice of either N or HFD diet. Mice treated with sirolimus on HFD diet were more insulin resistant (HOMA2 IR: Mouse HFD/S 2.15 ± 0.46 vs. HFD/C 1.89 ± 0.40). Mice treated with sirolimus on N diet were more insulin sensitive (OGTT: N/S: AUC 166 ± 1.75 *vs.* Mouse N/C: 236 ± 45.75) also mice HFD/S showed lower glucose sensitivity (AUC 315.6 ± 39.29 N=3 *vs.* Mouse HFD/C: 268.8 ± 27.59 N=3). The islet volume of human grafts in mice on sirolimus N/S (0.147 ± 0.012 mm2) was higher than mice N/C (0.097 ± 0.044) but the opposite for mice HFD/S (0.117 ± 0.048) and HFD/C (0.167 ± 0.086).

Conclusion: Sirolimus causes weight loss or less weight gain. Its metabolic effects depend on the metabolic environment: it improves the function of human beta-cells under normal conditions but is deleterious in High-fat diet.

Publications

Communications lors de Congrès

Communications orales :

H. Hoth Guechot, J. Thevenet, F. Pattou, M.-C. Vantyghem, J. Kerr-Conte
L'environnement métabolique influence l'effet du sirolimus sur les îlots de Langerhans humains greffés in vivo chez la souris immunodéficiente.
Annales d'Endocrinologie, 2016, 77 – n° 4 : 268. http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2016.07.096
Communication orale (CO-028) présentée au 33ème congrès la Société Française d'Endocrinologie (SFE), Bordeaux, France 5-8 octobre 2016

H. Hoth-Guechot, M.-C. Vantyghem, J. Kerr-Conte, J. Thevenet, G. Pasquetti, N. Delalleau, V. Gmyr, F. Pattou
L'environnement métabolique influence l'effet du sirolimus sur les îlots de Langerhans humains, in vivo, greffés chez la souris immunodéficiente.
Communication orale présentée au 15ème congrès de Société Francophone de Transplantation (SFT), Lille, France, 1er-4 décembre 2015.

Présentation orale de poster :

H. Hoth Guechot, K. Benobar, C. Leroy, G. Lion, P. Pigny, F. Pattou, M.-C. Vantyghem (CHRU de Lille)
Evolution de la fonction gonadotrope et du T-score après thérapie cellulaire du diabète de type 1 sous sirolimus-tacrolimus.
Annales d'Endocrinologie, 2016, 77 – n° 4 : 269. http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2016.07.100
Présentation orale de poster (POP-017) présentée au 33ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE), Bordeaux, France, 5-8 octobre 2016.

Communications affichées :

H. Hoth Guechot, M.-C. Vantyghem, J. Kerr-Conte, J. Thevenet, F. Pattou
L'environnement métabolique influence l'effet du sirolimus sur les îlots de Langerhans humains greffés in vivo chez la souris immunodéficiente
Poster présenté au congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD), Lyon, France, 22-25 mars 2016.

H. Hoth Guechot, M.-C. Vantyghem, J. Kerr-Conte, J. Thevenet, G. Pasquetti, N. Delalleau, V. Gmyr, F. Pattou
The environment influences the metabolic effect of sirolimus on human islets transplanted in vivo in immunodeficient mice.
Poster commenté au 6th EPITA Winter Symposium & 35th AIDPIT Workshop (EPITA : European Pancreas ans Islet transplantation Association), Igls_Innsbruck, Autriche, 24-26 janvier 2016.

Rapport

La thérapie cellulaire du diabète de type 1 permet d'obtenir 50% d'insulino-indépendance à 5 ans tandis que 75% des greffons sont fonctionnels à 10 ans sous une immunosuppression associant anti-récepteur de l'interleukine2, tacrolimus et sirolimus *(Vantyghem M-C, Diabetes care 2014*). Différents facteurs sont impliqués dans la perte de l'insulino-indépendance au cours du temps dont **les effets métaboliques des immunosuppresseurs.**

Le sirolimus, inhibiteur de mTOR, a des effets métaboliques débattus *(Fraenkel M, Diabetes 2008 ; Vodenik B, Transplant Proc 2009)* : il améliore l'insulinosécrétion des îlots humains en culture (*Marcelli-Tourvieille S, Transplant 2007*) alors que la prolifération *in vitro* des cellules canalaires humaines *(Bussiere, Diabetologia 2006*), et *in vivo* des cellules béta murines *(Zahr E, Transplant 2007)* diminue en présence de sirolimus. Les patients transplantés rénaux traités par sirolimus développent des diabètes post-transplantation alors que les patients greffés d'îlots améliorent leur équilibre glycémique.

L'objectif de l'étude était de vérifier **que les effets du sirolimus sur les cellules béta humaines, différaient selon l'environnement métabolique** sur un modèle de souris greffées avec des îlots humains et soumises à un régime normal (N) ou hyperlipidique (HFD) (4).

Sur le plan méthodologique, dix souris RAG2KO ont été transplantées de 400 îlots humains sous la capsule rénale *(Gargani S, Diabetologia 2013)*. Les souris ont été soumises pendant 6 semaines à un régime N (n = 4) ou HFD (n = 6) et ont reçu 0,2 mg/kg/jour de sirolimus (S) ou d'une solution véhicule (C) par injection intrapéritonéale. Des mesures itératives du poids, de la glycémie, du C-peptide humain, ainsi qu'une analyse du volume du greffon par morphométrie ont été réalisées.

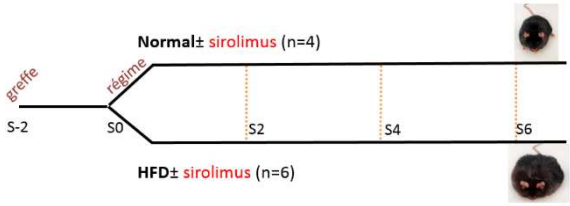


Figure 4.Design de l'étude

La première étape était de vérifier que les taux sériques de sirolimus étaient similaires à ceux attendus les 3 premiers mois chez les patients transplantés d'îlots. Les concentrations sériques de sirolimus obtenus chez nos souris étaient effectivement dans les objectifs (souris N/S : 9.4±7.29 et chez les souris HFD/S : 11.3±2.7ng/mL).

Les principaux résultats étaient les suivants :

L'administration de sirolimus a conduit à une perte de poids chez les souris soumises à un régime normal et a limité la prise de poids des souris soumises au régime hyperlipidique, malgré une consommation alimentaire identique. Le poids des souris N/Sirolimus était inférieur à celui des souris N/Contrôle. Le sirolimus a diminué la prise de poids des souris HFD/Sirolimus. Au 40e jour, le poids moyen des souris HFD/Sirolimus était de 30.80g *vs* 35.35g chez les souris HFD/Contrôle, correspondant à une différence significative de 4.55g ($p < 0.01$) (cf. figure 2).

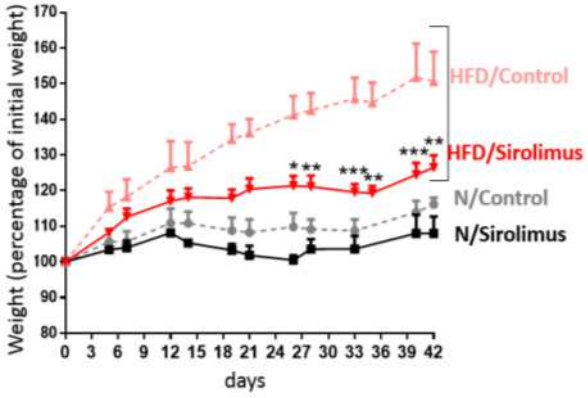


Figure 2.Evolution pondérale

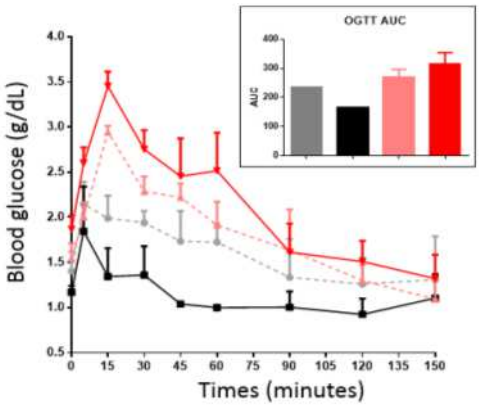


Figure 3. Test de tolérance au glucose à 6 semaines

Le sirolimus a amélioré la tolérance glucidique des souris soumises à un régime normal alors que paradoxalement, il a altéré la tolérance glucidique des souris soumises à un régime hyperlipidique, malgré leur prise de poids limitée. Les souris N/Contrôle étaient plus glucosensibles que les souris HFD/Contrôle lors de l'OGTT réalisé au 42e jour (AUC des souris N/C 236±45 *vs.* HFD/C 268±27*).* Le sirolimus a amélioré la glucosensibilité des souris N/Sirolimus (AUC 166±1) par rapport aux souris N/Contrôle alors que la glucosensibilité des souris HFD/Sirolimus (AUC 315±39) était altérée par rapport à celle des souris HFD/Contrôle (cf. figure 3).

Le sirolimus, administré pendant 6 semaines, a augmenté la masse des cellules endocrines humaines chez les souris soumises à un régime normal alors que chez les souris soumises à un régime hyperlipidique, le sirolimus a limité l'adaptation des îlots humains. La masse endocrine humaine des souris N/Contrôle était inférieure à celle des souris HFD/Contrôle. La masse endocrine des souris N/Sirolimus était plus importante que celle des souris N/Contrôle (souris N/S 0.14 ± 0.01 *vs.* N/C 0.09 ± 0.04 mm3). Inversement, le sirolimus a été délétère chez les souris HFD/Sirolimus : une diminution de la masse endocrine a été observée comparé aux souris HFD/Contrôle (souris HFD/S 0.12 ± 0.03 *vs.* HFD/C 0.17 ± 0.06 mm3**)** (cf. figure 4).

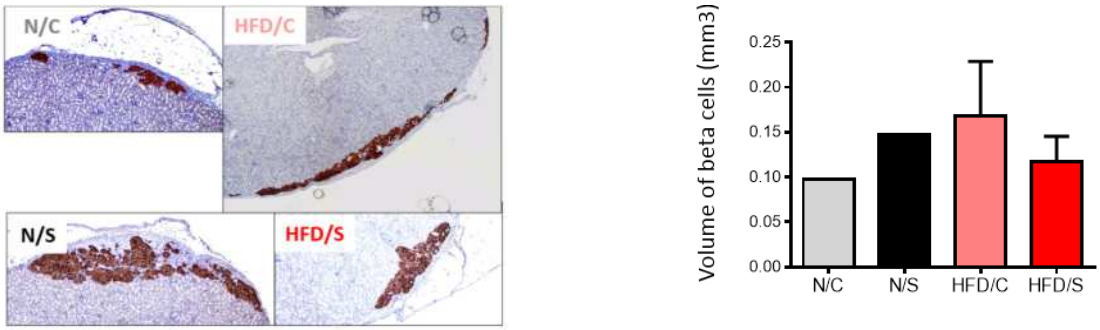


Figure 4. Greffons rénaux d'îlots humains des souris traités ou non par sirolimus (à gauche). Les cellules endocrines sont marquées à la chromogranine A (brun). Après immunomarquage des coupes, le volume des cellules bêta a été quantifié par morphométrie (à droite).

En **conclusion,** le sirolimus a entraîné une perte de poids ou une moindre prise pondérale chez les souris. Ses effets métaboliques étaient dépendants de l'environnement métabolique: le sirolimus a amélioré le fonctionnement des cellules béta humaines en régime normal mais s'est avéré délétère en régime hyperlipidique.

Perspectives : il est nécessaire de répéter les expériences sur un nombre plus important de souris afin de juger de la reproductibilité des résultats. Une étude additionnelle chez 12 souris est en cours de réalisation. Le rôle du sirolimus sur l'angiogénèse et l'inflammation des cellules béta pancréatiques devrait également être étudié afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du sirolimus sur le métabolisme du glucose. Enfin, l'étude de l'effet du sirolimus sur le tissu adipeux humain greffé permettrait d'explorer les conséquences d'environnement métaboliques sur la morphologie et la fonction des adipocytes.

Bourse de Master 2 SFE 2014 (32 K€)

M. Simon TRAVERS
Codirection **Dr Eric PUSSARD & Dr Marc LOMBES**
INSERM 1185 : Signalisation Hormonale, Physiopathologie Endocrinienne et Métabolique – Faculté de Médecine Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre

Profils stéroïdomiques au cours de la mise en place de la signalisation corticostéroïdienne : implications physiopathologiques lors du développement rénal.

Résumé

La grande prématurité est associée à un défaut de sécrétion d'aldostérone malgré une stimulation du système rénine-angiotensine. Cette altération de synthèse nous a conduits à mener une investigation complète de la voie minéralocorticoïde dans la cohorte PREMALDO (PHRC National). Or, une telle exploration repose actuellement sur des méthodes radio-immunologiques de faible spécificité, et se limite essentiellement au dosage de l'aldostérone sans explorer l'ensemble de ses précurseurs. Au cours de ce travail de Master 2, nous avons développé une technique de dosage par chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS) (TQ-S WATERS™) permettant pour la première fois l'exploration complète et simultanée des voies de synthèse des corticostéroïdes (Travers et al, JSBMB, 2016). Après validation analytique des étapes d'extraction et de dosage des stéroïdes, nous avons appliqué cette technique à des échantillons de sang de cordon de la cohorte PREMALDO, comptant 152 nouveau-nés répartis en nouveau-nés à terme (n = 39), prématurés (n = 67) et grands prématurés (n = 46). Nous avons ainsi confirmé le défaut de sécrétion d'aldostérone chez le grand prématuré et mis en évidence une altération globale de la synthèse des corticostéroïdes chez ces nouveau-nés. Nous avons également précisé, pour la première fois sur une cohorte aussi importante, l'existence d'un bloc enzymatique partiel touchant principalement le CYP11B1 (Travers et al, 2016 soumis). La LC-MS/MS, nouveau gold-standard de l'investigation endocrinienne, nous a donc permis de préciser l'impact de la prématurité sur la synthèse des hormones surrénaliennes. Cette méthode est en cours d'adaptation au dosage des stéroïdes urinaires afin de préciser la mise en place de ces voies de synthèse au cours de la première année de vie. Enfin, la LC-MS/MS constitue un outil diagnostic indispensable en biologie clinique adulte et pédiatrique, et est d'ores et déjà utilisée en recherche fondamentale sur des modèles animaux et cellulaires.

Abstract

Prematurity is associated with an aldosterone secretion deficiency, despite an activation of the renin-angiotensin system. This biosynthesis defect leads us to investigate the complete mineralocorticoid pathway upon the PREMALDO cohort (National Clinical Investigation Research Program; PHRC). Nevertheless, such an investigation relies on immuno-analytic methods displaying low specificity and is limited to aldosterone assaysl without regard to its precursors. During this work, we developed a new method using ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (TQ-S WATERS™), allowing us for the first time to explore completely and simultaneously all corticosteroid biosynthesis pathways (Travers et al, JSBMB, 2016). After analytical validation of extraction and steroid dosages, we applied our method to cord blood samples of the PREMALDO cohort, which included 152 newborns grouped according to their gestational age: term (n = 39), preterm (n = 67) and very preterm neonates (n = 46). Thus, we confirmed an aldosterone secretion defect in very preterm neonates and brought out a global alteration of corticosteroid biosynthesis in this population of newborns. We also pointed out, for the first time on such a cohort, a relative defect of CYP11B1 (Travers et al, 2016 soumis). LC-MS/MS, the new gold standard of endocrine investigation enables us to clarify the impact of prematurity on adrenal hormones biosynthesis. Our method is currently being adapted to urinary steroid assays in order to study the setting of those biosynthesis pathways during the first year of life. Finally, LC-MS/MS is of major interest and an essential tool for diagnosis in adult or pediatric clinical biochemistry and is already used in basic research on animal or cell models.

Publications

Travers S, Martinerie L, Bouvattier C, Boileau P, Lombès M, Pussard E
Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralo-corticoids pathways using a Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method.
J Steroid Biochem Mol Biol, 2016, in press.

Travers S, Martinerie L,Boileau P, Lombès M, Pussard E
Evidence for a partial and transient adrenal CYP11B1 deficiency in preterm infants.
2016, submitted.

S. Travers, L. Martinerie, C. Bouvattier, P. Boileau, M. Lombès, E. Pussard
Altération de la sécrétion corticostéroïdienne chez le grand prématuré : déficit partiel du CYP11B1 identifié par LC-MS/MS.
Annales d'Endocrinologie, 2016, 77 – n° 4 : 276. http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2016.07.114
Présentée sous forme de communication orale (CO-038) au 33ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie (SFE) à Bordeaux, France, 5-8 octobre 2016.

Rapport

Principaux résultats

A la naissance, les nouveau-nés à terme présentent une insensibilité rénale physiologique à l'aldostérone, associant un hyperaldostéronisme et un hyperréninisme qui contrastent avec des signes d'hypominéralocorticisme fonctionnel (hyponatrémie, hyperkaliémie, perte urinaire de sel). La prématurité aggrave ce pseudohypoaldostéronisme transitoire et, récemment, la cohorte du PHRC national PREMALDO a montré que les nouveau-nés prématurés présentaient une réduction de la production d'aldostérone malgré une stimulation du système rénine-angiotensine. Ce déficit suggère une altération des voies de synthèse surrénalienne de corticostéroïdes.

Si les glucocorticoïdes ont souvent été étudiés chez le nouveau-né (exploration de blocs enzymatiques, cortisol plasmatique et urinaire…), la voie minéralocorticoïde en période néonatale est peu documentée, notamment en raison de l'absence de méthodes d'analyse permettant une exploration complète de cette voie, de l'aldostérone comme de ses précurseurs.

L'objectif de ce Master 2 a été d'établir l'impact de la prématurité sur les voies de synthèse minéralo- et glucocorticoïdes : nous avons tout d'abord développé une méthode de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS, Xevo-TQS Waters™) permettant d'établir des profils stéroïdomiques complets à partir d'un faible volume de plasma. Nous avons ensuite appliqué cette technique à la plasmathèque de la cohorte PREMALDO (n=152), comprenant des nouveau-nés à grands prématurés (< 33 SG – semaines de gestation ; n=46), prématurés (33-36 SG ; n=67) et à terme (≥ 37 SG ; n=39).

Développement de la méthode d'analyse par LC-MS/MS

A partir d'un volume plasmatique de 250 µL, quinze stéroïdes sont séparés par chromatographie liquide puis quantifiés par spectrométrie de masse, avec un temps d'analyse de 14 minutes par échantillon. Notre méthode permet de doser : la progestérone (P), la 11-désoxycorticostérone (DOC), la corticostérone (B), la 18-hydroxycorticostérone (18-OH-B), l'aldostérone, la 17-hydroxyprogestérone (17-OH-P), le 11-désoxycortisol (S), le cortisol (F), la cortisone (E), le sulfate de DHEA (SDHEA), l'androstènedione (Δ4), la testostérone, la 18-hydroxy-11-désoxycorticostérone (18-OH-DOC), le 21-désoxycortisol (21DF) et la 11-déshydrocorticostérone (A).

Notre méthode a été validée analytiquement et récemment publiée (Travers et al, 2016, J Steroid Biochem Mol Biol).

Déficit partiel en CYP11B1 chez le prématuré

A partir des profils stéroïdiens obtenus sur les échantillons de la cohorte PREMALDO (au jour de la naissance jusqu'au troisième jour de vie), nous avons établi les index d'activités enzymatiques correspondant aux rapports [produit]/[substrat], estimant ainsi l'activité de chaque étape de biosynthèse. Outre un déficit global de synthèse corticostéroïdienne chez le grand prématuré, nous avons mis en évidence un déficit partiel de l'étape de 11β-hydroxylation touchant spécifiquement le CYP11B1 dans la population de grands prématurés (Travers et al, 2016, soumis à publication).

Conclusion et perspectives

Au cours de ce Master 2, nous avons développé une méthode innovante, sensible et spécifique d'exploration des hormones corticostéroïdiennes. Grâce à l'établissement de profils stéroïdomiques complets, nous avons mis en évidence, un déficit global partiel et transitoire de synthèse des hormones minéralo- et glucocorticoides chez le grand prématuré. Notre méthode nous a également permis de préciser l'existence d'un déficit partiel en CYP11B1 chez les nouveaux-nés de moins de 33 semaines de gestation.

Par ailleurs, l'analyse des profils stéroïdomiques urinaires chez ces nouveau-nés nous permettra de préciser la cinétique de la maturation de ces voies du métabolisme stéroïdien au cours de la première année de vie.

Bourse de Fin de thèse mutualisée H.A.C. Pharma & SFE 2014 (22 K€)

Mlle Coralie DRELON
Direction **Dr Pierre VAL & Dr Chantal VAURY-ZWILLER**
GReD (Génétique, Reproduction et Développement), CNRS UMR 6247 - INSERM U 1103, Université de Clermont-Ferrand - Blaise Pascal, Faculté de Médecine, Aubière

Identification de EZH2 comme un nouvel acteur de la progression tumorale dans les carcinomes cortico-surrénaliens.

Résumé

Les carcinomes cortico-surrénaliens (CCS) sont des tumeurs malignes rares de mauvais pronostic et pour lesquelles les options thérapeutiques efficaces sont inexistantes. Il est donc indispensable de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des CCS, afin d'améliorer leur prise en charge. Nous avons conduit une analyse rétrospective des données du transcriptome de trois cohortes de tumeurs corti-surrénaliennes humaines afin d'identifier d'autres perturbations. Nos données mettent en évidence une surexpression de l'histone methyltransférase EZH2 dans les CCS. Cette surexpression résulte de la dérégulation de la voie de signalisation P53/RB/E2F et est associée à une augmentation de la prolifération et à un mauvais pronostic chez les patients. Nos analyses en culture cellulaire montrent que l'inhibition de EZH2 par ARN interférence ou bien par un traitement pharmacologique au DZNep diminue les caractéristiques agressives et augmente l'apoptose des cellules de CCS. La prolifération cellulaire est davantage inhibée lors d'un traitement combinant le DZNep au mitotane, le traitement de référence des CCS. L'ensemble de nos données suggère donc que EZH2 est associé à la progression maligne et que ce facteur pourrait représenter une cible thérapeutique dans le cas des CCS.

Abstract

Adrenocortical carcinoma (ACC) is an aggressive tumour with poor prognosis and for which, efficient therapeutic approaches are not available. It is therefore essential to understand the molecular mechanisms involved in CCS development in order to improve their clinical management. We have conducted a study of publicly available gene expression data from three cohorts of ACC patients to identify relevant alterations. Our data show that the histone methyltransferase EZH2 is overexpressed in ACC in the three cohorts. This overexpression is the result of deregulated P53/RB/E2F pathway activity and is associated with increased proliferation and poorer prognosis in patients. Inhibition of EZH2 by RNA interference or pharmacological treatment with DZNep inhibits cellular growth, wound healing and clonogenic growth and induces apoptosis of H295R cells in culture. Further growth inhibition is obtained when DZNep is combined with mitotane, the gold- standard treatment for ACC. Altogether, these observations suggest that overexpression of EZH2 is associated with aggressive progression and may constitute an interesting therapeutic target in the context of ACC.

Publication

Coralie Drelon1, Annabel Berthon1,2,†, Mickael Mathieu1,†, Bruno Ragazzon3,†, Rork Kuick4, Houda Tabbal1, Amandine Septier1, Stéphanie Rodriguez1, Marie Batisse-Lignier1,5, Isabelle Sahut-Barnola1, Typhanie Dumontet1, Jean-Christophe Pointud1, Anne-Marie Lefrançois-Martinez1, Silvère Baron1, Thomas J. Giordano6, Jérôme Bertherat3, Antoine Martinez1 and Pierre Val1,*

1CNRS, UMR6293, GReD, Inserm U1103, Clermont Université, F-63001 Clermont-Ferrand, France ; 2Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, MD 20892-1103, USA ; 3Inserm U1016, CNRS UMR 8104, Université Paris Descartes, Institut Cochin, Paris, France ; 4Department of Biostatistics, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109, USA ; 5Centre Hospitalier Universitaire, Service d'Endocrinologie, Faculté de Médecine, F- 63000 Clermont-Ferrand, France and 6Department of Pathology, University of Michigan Health System, Ann Arbor, MI 48109, USA

EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression

Human Molecular genetics, 2016, Vol. x, N°x, 1-12. http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddw136

Abstract

Adrenal Cortex Carcinoma (ACC) is an aggressive tumour with poor prognosis. Common alterations in patients include constitutive WNT/b-catenin signalling and overexpression of the growth factor IGF2. However, the combination of both alterations in transgenic mice is not sufficient to trigger malignant tumour progression, suggesting that other alterations are required to allow development of carcinomas. Here, we have conducted a study of publicly available gene expression data from three cohorts of ACC patients to identify relevant alterations. Our data show that the histone methyltransferase EZH2 is overexpressed in ACC in the three cohorts. This overexpression is the result of deregulated P53/RB/E2F pathway activity and

is associated with increased proliferation and poorer prognosis in patients. Inhibition of EZH2 by RNA interference or pharmacological treatment with DZNep inhibits cellular growth, wound healing and clonogenic growth and induces apoptosis of H295R cells in culture. Further growth inhibition is obtained when DZNep is combined with mitotane, the goldstandard treatment for ACC. Altogether, these observations suggest that overexpression of EZH2 is associated with aggressive progression and may constitute an interesting therapeutic target in the context of ACC.

Rapport

Les carcinomes cortico-surrénaliens (CCS) sont des tumeurs malignes rares avec une incidence de 0.5 à 2 nouveaux cas par an et par million. Cependant ces tumeurs sont associées à un mauvais pronostic avec 80% des patients développant des métastases et une survie à 5ans inférieure à 40% [1,2]. La chirurgie reste le principal traitement des CCS, associée à un traitement adjuvant au mitotane. Toutefois, le mitotane induit de nombreux effets secondaires et ne conduit pas à une réponse thérapeutique durable [3]. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement tumoral du cortex surrénalien, afin d'assurer une prise en charge plus efficace des patients.

La combinaison d'approches tanscriptomiques et immunologiques a permis l'identification de dérégulations associées au développement de CCS chez l'Homme. Les altérations les plus fréquentes dans les CCS sont l'activation constitutive de la voie Wnt/β-caténine, dans 39% des tumeurs malignes [4] et la surexpression du facteur de croissance IGF2 retrouvée chez 80 à 90% des patients [5].

Notre équipe a mis en évidence le rôle oncogénique de la β-caténine à l'aide d'un modèle murin (souris ΔCat) présentant une activation constitutive de la β-caténine dans la corticosurrénale [6]. La faible pénétrance du phénotype malin suggère la nécessité d'autres altérations pour la progression tumorale. Nous avons donc testé l'hypothèse d'une coopération entre les voies Igf2 et β-caténine par le croisement des souris surexprimant Igf2 dans la corticosurrénale avec les souris ΔCat. La combinaison de ces deux altérations n'a qu'un effet modéré sur le développement de CCS [7]. Ces résultats suggèrent donc que la surexpression de Igf2 et l'activation de la β-caténine ne sont pas suffisantes dans notre modèle pour induire le développement de CCS et que d'autres altérations doivent être nécessaires pour la progression maligne dans le cortex surrénalien.

Afin d'identifier d'autres perturbations dans les CCS, nous avons conduit une analyse rétrospective des données de transcriptome de trois cohortes de tumeurs cortico-surrénaliennes humaines. Cette analyse a mis en évidence une augmentation de l'expression de l'histone méthyltransférase EZH2 dans les CCS, par rapport aux tumeurs bénignes et aux surrénales saines. De plus dans le groupe des CCS, la forte expression de EZH2 est associée à une survie globale plus courte. EZH2 est une histone methyltransférase responsable de la mise en place de la marque répressive H3K27me3. EZH2 est surexprimé dans de nombreux cancers tels que le cancer de la prostate et du sein. La surexpression de ce facteur est associée à des stades avancés et à un mauvais pronostic [8,9]. Ainsi, EZH2 pourrait participer au développement tumoral corti-surrénalien.

Avec le soutien de la SFE, j'ai pu montrer que le rôle de EZH2 dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne implique le contrôle de la prolifération. En effet nous avons pu mettre en évidence une forte association entre les niveaux d'expression de EZH2 et des marqueurs de prolifération PCNA et Ki67 dans les CCS humains. De plus l'inhibition de EZH2 par ARN interférence ou bien par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le DZNep, dans une lignée cellulaire de corticosurrénalome humain, les H295R, réduit significativement la prolifération cellulaire. D'autre part, le DZNep augmente l'apoptose des cellules H295R et diminue les capacités de migration et de prolifération de ces cellules en milieu semi-liquide. Ainsi l'inhibition de EZH2 induit l'apoptose et inhibe les caractéristiques agressives des cellules de CCS humain. Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de l'inhibition de EZH2 pour les CCS, l'effet du DZNep a été évalué en association avec le traitement de référence de ces tumeurs, le mitotane. Nous avons pu observer que la combinaison de ces deux molécules est plus efficace pour inhiber la prolifération des cellules H295R que le DZNep ou le mitotane seul. L'inhibition de EZH2 pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique pertinente pour les CCS.

Nos données nous ont également permis de démontrer que l'expression de EZH2 est sous le contrôle de la voie P53/RB/E2F dans les CCS. Nous avons montré que l'expression de EZH2 est plus importante dans les CCS humains présentant une délétion ou une mutation inactivatrice des gènes *P53* ou *RB1*, qui constituent un sous-groupe agressif de CCS. De plus l'expression de EZH2 dans ces tumeurs est fortement corrélée à l'expression du facteur de transcription E2F1. Dans les cellules H295R, E2F1 est recruté sur le promoteur du gène *EZH2* et l'inhibition de ce facteur de transcription de transcription par ARN interférence entraine une diminution de l'expression de EZH2, démontrant que E2F1 contrôle directement l'expression de EZH2 dans les cellules cortico-surrénaliennes. Nos données préliminaires (reposant sur des analyses bioinformatiques et de micro-arrays) suggèrent qu'en retour, EZH2 est capable

de stimuler l'activité transcriptionnelle de E2F1, sur des gènes cibles impliqués dans la progression tumorale (RRM2, PTTG1 et PRC1). Ceci pourrait constituer une boucle d'emballement, favorisant l'acquisition de caractéristiques agressives dans le CCS.

En conclusion, nos travaux ont permis de mettre en évidence un rôle clé de l'histone méthyltransférase EZH2 dans la tumorigenèse cortico-surrénalienne. De plus nos analyses en culture cellulaire suggèrent que le ciblage de ce facteur pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante pour la prise en charge des CCS. L'ensemble de ces résultats a donné lieu à une publication dans Human Molecular Genetics [10] et constitue la base de travaux plus larges, ayant pour but de comprendre le rôle de EZH2 dans la pathophysiologie surrénalienne grâce à des modèles murins d'invalidation génique.

Références bibliographiques

1. Abiven, G. *et al.* Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab* **91,** 2650–5 (2006).

2. Icard, P. *et al.* Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg* **25,** 891–7 (2001).

3. Kirschner, L. S. The next generation of therapies for adrenocortical cancers. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **23,** 343–350 (2012).

4. Berthon, A., Martinez, A., Bertherat, J. & Val, P. Wnt/beta-catenin signalling in adrenal physiology and tumour development. *Mol Cell Endocrinol* **351,** 87–95

5. Ribeiro, T. C. & Latronico, A. C. Insulin-like growth factor system on adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* **351,** 96–100

6. Berthon, A. *et al.* Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* **19,** 1561–76 (2010).

7. Drelon, C. *et al.* Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models. *PLoS ONE* **7,** e44171 (2012).

8. Kleer, C. G. *et al.* EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 11606–11611 (2003).

9. Varambally, S. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419,** 624–629 (2002).

10. Drelon, C. *et al.* EZH2 is overexpressed in adrenocortical carcinoma and is associated with disease progression. *Hum. Mol. Genet.* (2016). doi:10.1093/hmg/ddw136.

Sylvia Delplanque
Secrétaire de la SFE

Société Française d'Endocrinologie

Adresse de correspondance (Centre d'affaires) :
Chez Regus Paris Gare de Lyon
37-39, avenue Ledru-Rollin – 75012 PARIS

Siège social : 88, rue de la Roquette – 75011 Paris

☎ : +33 (0)1 40 24 02 72 – 📧 : sfesecret@gmail.com

Site Internet : http://www.sfendocrino.org