Lauréats des années 2015, 2016, 2017 et 2018

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 « ANGERS 2015 » 5

Bourse de Fin de thèse mutualisée (6 mois) H.A.C. Pharma & SFE 2015 (22 K€) 6
Dr Thi Thu Huong DO 6

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2015 (32 K€) 9
Dr Selma HOUSNI 9

Bourse de « Master » (1 an) LILLY 2015 (32 K€) 11
Dr Marie VERMALLE 11

Bourse de Recherche de Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2015 (32 K€) 14
Dr Nelly RAMOS 14

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2015 (30 K€) 17
Dr Estelle LOUISET 17

Bourse de Recherche en Endocrinologie (1 an) SFE 2015 (42 K€) 20
Dr Justine BOULLY 20

Bourses SFE « BORDEAUX 2016 » 23

Bourse de Fin de thèse mutualisée (6 mois) H.A.C. Pharma & SFE 2016 (22 K€) 24
Dr Ingrid LEMA 24

Bourse de « Master » mutualisée – Surrénales (1 an) HRA Pharma & SFE 2016 (32 K€) ... 26
Dr Geoffrey BOULATE 26

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2016 (32 K€) 30
Dr Elise MATHY 30

Bourse de « Master » - Croissance (1 an) LILLY 2016 (32 K€) 32
Mlle Alyson DEPREZ 32

Bourse de Recherche en Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2016 (32 K€) 36
Mlle Clémence DELCOUR 36

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2016 (30 K€) 39
Dr Philippe BERTOLINO 39

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 ans) SFE 2016 (50 K€) 43
Pr Frédéric CASTINETTI 43

Bourse de « Master » (1 an) SFE 2016 (32 K€) 46
Mme Valentine COURANT SUTEAU 46

Bourse de Fin de Thèse (6 mois) SFE 2016 (22 K€) 49
Dr Romain TEINTURIER 49

Bourses SFE « POITIERS 2017 » 52

Bourse de Fin de thèse mutualisée (6 mois) H.A.C. Pharma & SFE 2017 (22 K€) 53
Dr Mickaël MATHIEU 53

Bourse de « Master » mutualisée – Surrénales (1 an) HRA Pharma & SFE 2017 (32 K€) ... 55
Dr Loïc FOUSSIER 55

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2017 (32 K€) 57
Dr Fabien KRIEF 57

Bourse de « Master » (1 an) LILLY 2017 (32 K€) 59
M. Paul SIBILIA 59

Bourse de « Master » Recherche en Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2017 (32 K€) ... 62
Mlle Fanny CHASSELOUP 62

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2017 (30 K€) 65
Pr Lionel GROUSSIN-ROUILLER 65

Bourse de Recherche en Endocrinologie (1 an) SFE 2017 (50 K€) 67
Dr Florence ROUCHER-BOULEZ 67

Bourse de « Master » SFE 2017 (32 K€) 69
Mlle Annabelle NAMAN 69

Bourse de Fin de Thèse (6 mois) SFE 2017 (22 K€) 71
Dr Emilie COURTY 71

Bourses SFE « NANCY 2018 » 73

Bourse de « Master » mutualisée – Surrénales (1 an) HRA Pharma & SFE 2018 (32 K€) ... 74
M. Nicolas TONG YETTE 74

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2018 (32 K€) 77
Mlle Patricia Madalina VADUVA 77

Bourse de « Master » Recherche en Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2018 (32 K€) ... 79
Mlle Malanie ROY 79

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2018 (30 K€) 80
Dr Charlotte LUSSEY 80

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 an) SFE 2018 (28 K€) 82
Dr Isabelle BEAU 82

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 an) SFE 2018 (28 K€) 85
Dr David L'HÔTE 85

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 an) SFE 2018 (28 K€) 88
Dr David ROMANO 88

Bourse de « Master » SFE 2018 (32 K€) 90
Mlle Mathilda KRETZ 90

Bourse de Fin de Thèse (6 mois) SFE 2018 (22 K€) 93
Mlle Laurence DUMEIGE 93

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

Ce livret résume les travaux réalisés grâce aux Bourses, Prix et Allocations décernés lors des congrès annuels de la SFE, « ANGERS 2015 », « BORDEAUX 2016 », « POITIERS 2017 » et « NANCY 2018 ».

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. Soyons fiers de toutes ces réalisations.

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 poursuivre notre soutien à la recherche et éditerons un nouveau fascicule à l'avenir et souhaitons bonne chance à tous les contributeurs dans leurs futures recherches.

Dr Nadine BINART,
Présidente du Conseil Scientifique Pérenne SFE 2018-2019

Bourses SFE « ANGERS 2015 »

Bourse de Fin de thèse mutualisée (6 mois) H.A.C. Pharma & SFE 2015 (22 K€)

Dr Thi Thu Huong DO
Direction **Pr Bruno FEVE**
INSERM UMR_S938 - Lipodystrophies génétiques et acquises, Centre de Recherche Saint-Antoine – UPMC, 27 Rue Chaligny, PARIS

Effets délétères des glucocorticoïdes sur le métabolisme glucido-lipidique : impact différentiel sur les tissus adipeux.

Résumé

Une insulinorésistance est souvent présente chez patients présentant un excès de glucocorticoïdes (GC) comme avec syndrome de Cushing ou sous corticothérapie à fortes doses. De plus, d'autres similitudes entre le syndrome métabolique (obésité viscérale, hyperglycémie, dyslipidémie) et le syndrome de Cushing suggèrent que les GC pourraient jouer un rôle dans le développement des complications liées à l'obésité. Dans notre étude, une exposition à la corticostérone à long terme chez la souris induisait un gain de poids, une dyslipidémie ainsi qu'une hyperglycémie et une résistance systémique à l'insuline. De manière surprenante, sous l'effet de GC, une infiltration des macrophages est observée dans tous les tissus adipeux avec une prédominance des macrophages de type M2, et les GC peuvent agir directement sur les macrophages pour induire ce phénotype. De plus, l'infiltration des macrophages précédait le gain de masse et l'hypertrophie des adipocytes. Il est à noter que la déplétion spécifique de macrophages dans le tissu adipeux gonadique a réduit les macrophages de type M2 et a partiellement restaurée la sensibilité à l'insuline chez les souris présentant une obésité et une insulino-résistance induites par les GC. Ces données mettent en évidence que les GC agissent sur le tissu adipeux de manière dépôt-dépendante et que les macrophages gonadiques sont des effecteurs clés de la résistance à l'insuline associée aux GC.

Abstract

Insulin resistance is frequently present in patients with glucocorticoid (GC) excess (Cushing's syndrome) or treated with high doses of GCs. Furthermore, others similarities between metabolic syndrome (visceral obesity, elevated blood glucose levels, dyslipidemia) and Cushing's syndrome suggest that GCs could play a role in obesity-linked complications. In our study, long-term corticosterone exposure in mice induced weight gain, dyslipidemia as well as hyperglycaemia and systemic insulin resistance. Surprisingly, GC treatment promoted macrophage infiltration within all adipose tissues along with predominant M2-like macrophage phenotype, and can directly act on macrophages to induce this phenotype. Moreover, macrophage infiltration preceded mass gain and adipocyte hypertrophy. Of note, specific macrophage depletion in gonadal fat preferentially reduced the M2-like macrophage content, and partially restored insulin sensitivity in mice with GC-induced obesity and insulin resistance. These data provide evidence that GCs act on adipose tissue in a depot-dependent manner and that gonadal adipose macrophages are key effectors of GC-associated insulin resistance.

Publications

Do TTH, Garcia M, Dalle H, Dorothée G, Moldes M, Fève B, Buyse M. Glucocorticoid-induced insulin resistance is related to macrophage visceral adipose tissue infiltration.
J Steroid Biochem Mol Biol. 2019 Jan; 185: 150-162.

Dalle H, Garcia M, Antoine B, Boehm V, **Do TTH**, Buyse M, Ledent T, Lamazière A, Magnan C, Postic C, Denis RG, Luquet S, Fève B, Moldes M. Adipocyte glucocorticoid receptor deficiency promotes adipose tissue expandability and improves the metabolic profile under corticosterone exposure.
Diabetes. 2019 Feb; 68(2): 305-317.

Les hormones glucocorticoïdes (GC) et leurs analogues synthétiques sont largement utilisés chez les patients atteints de maladies inflammatoires, immunitaires et tumorales. Cependant, ils présentent de nombreux effets indésirables limitant leur utilisation au long cours tels que prise de poids, dyslipidémie, hypertension artérielle, intolérance au glucose associée à un diabète cortico-induit. De même, les similitudes entre le syndrome métabolique (observé le plus souvent dans l'obésité commune) et les effets indésirables imputables à une corticothérapie suggèrent que les glucocorticoïdes pourraient jouer un rôle important dans la physiopathologie de l'insulino-résistance associée à l'obésité commune. Notre travail visait à caractériser la population macrophagique au sein des différents tissus adipeux in vivo après traitement par les corticoïdes ainsi qu'à étudier l'impact de l'infiltration des macrophages sur la sensibilité à l'insuline.

Pour cela, les souris mâles C57Bl6/J ont été traitées par la corticostérone dans l'eau de boisson (CORT, 100 µg/mL) pendant 8 semaines. Les souris appelées CORT présentent une prise de poids importante accompagnée d'une augmentation accrue de leur masse grasse. Dans les dépôts adipeux viscéraux (TAE) et sous-cutanés (TASC), un infiltrat macrophagique marqué (F4/80, CD68) est observé chez les souris traitées. Cette infiltration macrophagique est associée à l'augmentation de la cytokine chémoattractante MCP1, favorisant le recrutement de macrophages au sein des tissus. De manière intéressante, la surexpression du MCP1 est plus marquée dans le TAE que dans le TASC. Ainsi l'induction de l'expression de l'IL-6 et du TNFα, caractéristique de la population M1 pro-inflammatoire est exclusivement retrouvée dans le TAE. A l'inverse, l'expression d'un marqueur pro-inflammatoire, le CD274, est diminuée dans le TASC chez les souris CORT (diminution non significative d'IL-6 et de TNFα). Ces résultats suggèrent un effet différentiel des GC sur le recrutement des sous-populations de macrophages dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané.

La présence d'un infiltrat macrophagique viscéral pro-inflammatoire induit par le traitement chronique par les glucocorticoïdes est surprenante puisque ces hormones exercent une puissante action anti-inflammatoire. Au vu de l'expansion des dépôts adipeux induite par les GC, nous avons en conséquence cherché à documenter si l'infiltrat macrophagique précède ou succède l'obésité induite par le traitement corticoïde. Ainsi, après une semaine de traitement, en absence de toute augmentation de la masse adipeuse, on observe une induction de l'infiltrat macrophagique (F4/80, CD68) exclusivement dans le TAE, sans modification dans le TASC. Ce résultat suggère qu'indépendamment de l'expansion du TAE, les GC exercent un effet propre de recrutement des macrophages dans ce dépôt.

Pour vérifier le potentiel effet direct de la corticostérone sur la polarisation des macrophages, nous avons traité les macrophages péritonéaux isolés de souris normales à la CORT, en présence ou absence de l'antagoniste du GR ou MR. Après 24h, la CORT réduit les marqueurs M1 pro-inflammatoires (CD274, IL-6, TNFα et CD11c) et augmente les marqueurs M2 anti-inflammatoires (CD206, FIZZ1, CD163, YM1, F13A1). De manière intéressante, l'antagoniste du GR, le RU486, prévient totalement ou partiellement ces effets alors que l'éplérenone, l'antagoniste du MR ne présente aucun effet. Ces résultats confirment que les GC favorisent la polarisation de macrophages de type M2 anti-inflammatoire par un mécanisme médié par le GR.

Ainsi le recrutement macrophagique au niveau viscéral est un événement délétère dans le développement du syndrome métabolique. Il est à noter que ces souris traitées chroniquement par les GC développent une insulino-résistance extrême et une hyperglycémie à l'état nourri ad libitum. Pour vérifier si l'infiltrat macrophagique au niveau viscéral est à l'origine des troubles métaboliques observés chez les souris traitées, nous avons traité les souris CORT et les souris contrôles par des liposomes de clodronate, dans le but de dépléter sélectivement les macrophages du tissu adipeux viscéral. L'administration en ip de ces liposomes pendant une semaine induit une diminution les marqueurs macrophagiques totaux (F4/80, CD68) associée à une réduction sélective de marqueur anti-inflammatoire (CD206) dans le TAE, sans aucun effet dans le dépôt sous-cutané. Cette déplétion des macrophages viscéraux conduit à une amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris précédemment rendues obèses et diabétiques par la CORT. Ces résultats suggèrent l'implication de macrophages M2 viscéraux dans l'insulino-résistance associée aux GC.

Pour conclure, notre travail met en évidence que les GC agissent sur le tissu adipeux de manière dépôt-dépendante et que les macrophages viscéraux sont des effecteurs clés de la résistance à l'insuline associée aux GC. L'ensemble de ces résultats a donné lieu à une publication parue en 2018 dans la revue Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, que je signe en premier auteur.

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2015 (32 K€)

Dr Selma HOUSNI
Direction **Pr Lionel GROUSSIN-ROUILLER**
INSERM U 1016 - CNRS UMR 8104, Institut Cochin – Université Paris Descartes, Département Endocrinologie, Métabolisme, Diabètes, PARIS

Mécanismes d'activation des facteurs NF-kappaB par l'oncogène BRAFV600E dans les cancers papillaires de la thyroïde.

Résumé

L'objet de cette année de recherche était d'identifier le mécanisme d'activation des facteurs NF-κB par l'oncogène BRAFV600E dans les cancers thyroïdiens de souche folliculaire.

Dans un premier temps nous avons confirmé les propriétés activatrices de BRAFV600E, de manière indépendante de MEK, sur les facteurs NF-κB dans deux lignées de cancers thyroïdiens (l'une dérivant d'un cancer papillaire, l'autre d'un cancer anaplasique), porteuses homozygotes de la mutation BRAFV600E.

Nous avons ensuite étudié différentes kinases (invalidation par interférence ARN) sélectionnées pour leur relation connue avec la voie NF-κB et/ou l'oncogène BRAF. Les premiers résultats obtenus étaient en faveur d'une possible implication de l'une d'entre elles, la kinase NIK dans l'activation de la voie NF-κB. En effet nos expériences de RT-qPCR ont montré que l'expression de gènes sous la dépendance de NF-κB était affectée par l'inhibition de l'expression de NIK. De même le niveau d'expression de la kinase NIK est affecté par l'inhibition de BRAF sans diminution de l'expression des ARNm ce qui est en faveur d'une régulation post transcriptionelle possiblement par stabilisation directe ou indirecte de NIK.

Abstract

The purpose of this year of research was to identify the mechanism of activation of NF-κB factors by the oncogene BRAFV600E in thyroid cancers.

Firstly, we confirmed the activating properties of BRAFV600E, independently of MEK, on NF-κB factors in two cell lines of thyroid cancers (one derived from a papillary cancer, the other from an anaplasic cancer), homozygous carriers of the BRAFV600E mutation.

We then studied different kinases (by RNA interference invalidation) selected for their known relationship with the NF-κB pathway and / or the BRAF oncogene. The first results obtained suggested a possible implication of one of them, the NIK kinase in the activation of the NF-κB pathway. Indeed, our RT-qPCR experiments showed that the expression of genes under NF-κB pathway dependence was affected by the inhibition of NIK expression. Similarly, the level of NIK kinase expression was affected by BRAF inhibition without a decrease in mRNA expression, which suggests a post-transcriptional regulation, possibly by direct or indirect stabilization of the kinase NIK.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Le cancer thyroïdien représente un enjeu majeur en termes de santé publique de par son incidence croissante. La résistance de certaines tumeurs aux traitements habituels et aux thérapies ciblées qui ont été développées plus récemment nécessitent de poursuivre l'étude des voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse thyroïdienne afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

La voie de signalisation des MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) est la plus fréquemment activée dans les cancers de la thyroïde d'origine folliculaire et des études ont démontré que l'oncogène BRAFV600E (présent dans 62% des cancers papillaires thyroïdiens) active la voie NF-κB dans ces tumeurs. Cette voie de signalisation est ubiquitaire et impliquée dans de nombreux processus biologiques via l'activation de facteurs de transcriptions (facteurs NF-κB, RelA et/ou RelB). En cancérologie, l'activation de cette voie conduit à une plus grande agressivité tumorale et à une résistance aux traitements.

L'objectif de cette étude était d'identifier le mécanisme d'activation des facteurs NF-κB par l'oncogène BRAFV600E dans les cancers thyroïdiens dérivés des cellules folliculaires.

Dans un premier temps nous avons confirmé les propriétés activatrices de BRAFV600E sur les facteurs NF-κ dans deux lignées de cellules de cancers thyroïdiens, l'une dérivant d'un cancer papillaire (BCPAP) et l'autre d'un cancer anaplasique (8505C), porteuses homozygotes de la mutation BRAFV600E. Nous avons par ailleurs validé que cette activation était indépendante de la kinase MEK.

Afin de mieux en comprendre le mécanisme, nous avons invalidé par interférence ARN les kinases MEKK1, NIK et PAK1, sélectionnées pour leur relation connue avec la voie NF-κB et/ou l'oncogène BRAF. Dans nos lignées, nous avons montré que la kinase NIK était nécessaire à l'activation des facteurs NF-κB, révélée par leur capacité à se fixer sur un site κB dans des expériences de retardement sur gel. Des expériences de RT-qPCR ont montré que l'expression de gènes dépendants de RelA et/ou RelB était affectée par l'inhibition de l'expression de NIK. Ces résultats sont donc en faveur de l'implication de NIK dans l'activation de facteurs NF-κB dans les lignées thyroïdiennes étudiées.

Des expériences d'inhibition pharmacologique ou par interférence ARN de BRAF ont abouti à la mise en évidence d'une relation entre BRAFV600E et le niveau d'expression de la kinase NIK. L'absence de diminution de l'expression des ARNm de NIK après inhibition de BRAFV600E est en faveur d'une régulation post-transcriptionnelle de NIK par BRAF. Cette hypothèse concorde avec le fait que le principal mécanisme d'activation de NIK connu est l'inhibition de sa dégradation par un complexe d'ubiquitines ligases.

Le mécanisme d'activation des facteurs NF-κB par l'oncogène BRAFV600E pourrait donc être en partie lié à la stabilisation directe ou indirecte de la kinase NIK.

Bourse de « Master » (1 an) LILLY 2015 (32 K€)

Dr Marie VERMALLE
Direction **Dr Frédéric CASTINETTI**
CNRS UMR 7286- INSERM MMG, CRN2M, MARSEILLE

Evaluation de variants de SIX3 et HESX1 comme nouvelle étiologie de déficit hypophysaire combiné multiple.

Résumé

HESX1 est un facteur de transcription à homéodomaine paired, dont les variants pathogènes ont été retrouvés chez des patients porteurs de déficit hypophysaire constitutionnel. Nous rapportons ici les résultats d'études fonctionnelles du variant S51L de HESX1, retrouvé à l'état hétérozygote chez une patiente porteuse de déficit hypophysaire combiné multiple avec syndrome d'interruption de tige. Les études in silico ne permettent pas de définir si ce variant est ou non pathogène. Des études fonctionnelles ont été réalisées : la mutation ne modifie pas l'expression protéique de HESX1, ni sa liaison à l'ADN en comparaison avec HESX1 wt. Par contre, après transfection, le variant S51L est à l'origine d'une diminution de l'activité répressive de HESX1 sur PROP1, un autre facteur de transcription à homéodomaine paired, impliqué dans les étapes intermédiaires de différenciation hypophysaire. Des modèles murins de surexpression de PROP1 ayant mis en évidence des anomalies de développement hypophysaire, il est probable que cette absence de répression puisse être à l'origine d'une anomalie de développement hypophysaire, et de la pathologie présentée par la patiente.

Abstract

HESX1 is a paired homeodomain transcription factor, for which pathogenic variants have been identified in patients with combined pituitary hormone deficiency. We report here the functional studies of a new variant of HESX1, S51L, found in a heterozygous state in a young patients presenting with combined pituitary hormone deficiency and pituitary stalk interruption syndrome. In silico studies did not provide a strong answer on the pathogenicity of this variant. Functional studies showed that this variant did not modify the protein expression (Western blot), not the DNA binding (Electromobility shift assay). Transfection studies showed that this variant was not able to repress PROP1 activation on its target promoters, in comparison with wild-type HESX1. As studies performed in mice showed that overexpression of PROP1 could lead to pituitary development anomalies, we think that this new variant could be responsible for CPHD because of a lack of repression of PROP1 in a timely manner during pituitary development.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Introduction et rationnel de l'étude

Dans le cadre de la réalisation d'exomes chez des familles portant des déficits hypophysaires combinés sans étiologie génétique identifiée, nous avons mis en évidence un variant hétérozygote p.74R de signification indéterminée de SIX3, un facteur de transcription impliqué dans le développement cérébral, chez 2 enfants porteurs de déficit en GH, TSH de révélation néonatale, avec interruption de tige à l'IRM. Ce variant de SIX3 a été considéré comme candidat étiologique potentiel du fait de données d'immunohistochimie montrant son expression hypophysaire au cours du développement et après la naissance. Des variants pathogènes de SIX3 ont été retrouvés chez des patients porteurs d'holoprosencéphalie. Ces patients étaient également porteurs à l'état hétérozygote d'un variant S50A du gène codant pour l'isoforme beta de POU1F1.

En parallèle, nous nous sommes intéressés à la pathogénie d'un nouveau variant du gène codant pour le facteur de transcription HESX1, le variant S51L. Ce variant a été identifié chez une jeune patiente porteuse d'un déficit en GH, TSH et ACTH. Ce variant est un variant très rare car non retrouvé dans les bases de données populationnelles ; les logiciels de prédiction (analyse in silico) ne s'accordent pas sur son caractère pathogène ou non. La patiente était également porteuse d'un variant N125S de HESX1, considéré comme non pathogène mais rare dans la population d'origine de la patiente.

Pour ces 2 exemples, l'objectif du Master 2 était donc la mise au point de techniques permettant de déterminer la pathogénicité de ces variants chez ces patients.

SIX3 et déficits hypophysaires combinés

L'expression des protéines SIX3 wt et muté a été étudiée par Western Blot à partir de protéines purifiées depuis une production bactérienne. La liaison à l'ADN de SIX3 sauvage et muté a été étudiée par gel retard, en utilisant une séquence consensus de liaison couplée à un fluorophore, le CY5. Nos résultats ont montré que le variant n'abolit pas l'expression de SIX3 et que le variant est capable de lier une séquence consensus ADN en gel retard. Nous ne sommes pas parvenus à trouver de cible évidente hypophysaire permettant de réaliser des études fonctionnelles en transfection cellulaire. EN effet, les analyses fonctionnelles effectuées à partir de SIX3wt sur les promoteurs GH et TSH couplés à la luciférase n'ont pas mis en évidence d'activation.

Nous avons donc monté une collaboration avec l'équipe de Sally Camper (Ann Arbor, MI, USA), pour générer un modèle de souris transgénique permettant de tester l'implication d'une atteinte hétérozygote de SIX3 dans le développement hypophysaire. A la naissance et à 4 semaines de vie, les souris *Six3+/-* n'ont pas de retard staturo-pondéral. Un double hétérozygote a ensuite été généré (*Six3+/- ; Pou1F1ßdw/+)* à partir d'un allèle hypomorphe de POU1F1. Là encore, les souris obtenues ne présentent pas de retard de croissance staturopondéral. Par contre l'invalidation hétérozygote de SIX3 dans les cellules exprimant HESX1 (via un système Cre-Lox) retrouve un retard pondéral, comme si l'absence plus tardive d'expression de SIX3 dans des cellules déjà orientées sur la voie de différenciation hypophysaire, pouvait aboutir à une anomalie de développement hypophysaire (ce qui suggèrerait aussi que l'absence précoce d'expression de SIX3 dans le cadre d'un modèle d'invalidation hétérozygote non ciblé est contrebalancée par un facteur compensateur, à déterminer). Des travaux sont en cours pour essayer de tester ces hypothèses dans d'autres modèles (zebrafish).

Figure 1 : Morphotype statural de souris présentant une invalidation hétérozygote de SIX3, ou une invalidation spécifique de SIX3 dans les cellules exprimant HESX1 (et qui donneront naissance aux cellules hypophysaires).

HESX1 et déficits hypophysaires combinés

L'expression des protéines HESX1 wt et muté a été étudiée par Western Blot à partir de protéines purifiées depuis une production bactérienne. La liaison à l'ADN de HESX1 sauvage et muté a été étudiée par gel retard, en utilisant une séquence consensus de liaison couplée à un fluorophore, le CY5. Les études fonctionnelles ont été réalisées à partir d'une protéine de fusion Gal4-HESX1 avec le promoteur minimal SV40 couplé au gène rapporteur de la luciférase, et précédé d'une séquence consensus de liaison pour HESX1 ou Gal4. Des cotransfections ont également été réalisées avec PROP1 et HESX1 sauvage ou muté pour définir le niveau de répression de HESX1 sur PROP1 (HESX1 étant connu pour être répresseur de l'activité de PROP1).

Nos résultats ont montré qu' aucun des 2 variants n'abolit l'expression de HESX1. Les 2 variants sont capables de lier une séquence consensus ADN en gel retard. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de répression en absence de PROP1. Par contre, le mutant S51L a une activité moins répressive que HESX1 wt en présence de PROP1. La cotransfection en quantités égales de HESX1 wt et HESX1 S51L n'est pas en faveur d'un effet dominant négatif. Le phénotype du patient est donc probablement lié à la présence à l'état hétérozygote du variant S51L : Il a en effet été montré dans des modèles murins que l'absence de répression précoce de PROP1 pouvait être à l'origine d'anomalies de développement hypophysaire. Le variant N125S ne semble pas être impliqué dans la pathologie présentée par la patiente.

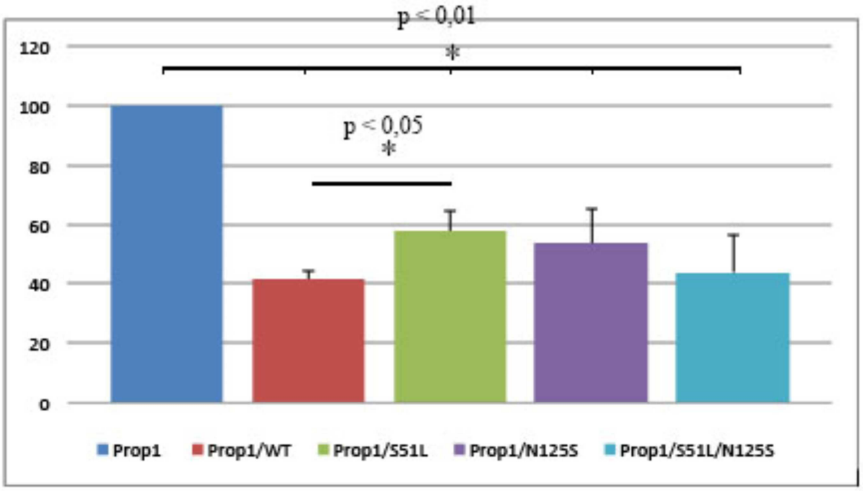


Figure 2 : Diminution de l'effet répresseur du variant HESX1-S51L par rapport à HESX1 wt en études fonctionnelles testant les capacités de transactivation de PROP1.

Bourse de Recherche de Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2015 (32 K€)

Dr Nelly RAMOS
Direction **Dr Marc LOMBES**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Physiopathologie des syndromes de résistance hormonale aux glucocorticoïdes : Caractérisation de nouvelles mutations du récepteur des glucocorticoïdes

Résumé

Au moment où ce travail a été réalisé, seules 20 mutations du récepteur des glucocorticoïdes (GR) avaient été décrites dans le cadre d'un syndrome de résistance aux glucocorticoïdes. Trois nouvelles mutations hétérozygotes faux-sens ont été récemment découvertes dans le cadre du PHRC national MUTA-GR et caractérisées par notre équipe. Les 2 mutations R477S et Y478C sont situées sur le domaine de liaison à l'ADN, et la mutation L672P est située sur le domaine de liaison du ligand du récepteur.

L'objectif était de poursuivre la caractérisation fonctionnelle de ces 3 mutations par des approches complémentaires, afin de mieux comprendre la signalisation glucocorticoïde.

Le mutant L672P est non fonctionnel par absence de liaison à la dexaméthasone. Son expression protéique est diminuée par rapport au récepteur sauvage dans les cellules HEK 293T transfectées, dont j'ai pu montrer qu'il s'agissait d'une dégradation accrue du mutant par le protéasome.

L'exploration des mutations Y478C et R477S à l'état hétérozygote, sur les fibroblastes des patients mutés, a retrouvé une diminution de la transactivation d'un gène cible FKBP5, en faveur d'une haplo-insuffisance du GR chez les patients mutés.

Enfin, nous avons tenté d'introduire de façon stable (knock-in) ces mutations du GR dans une lignée de corticosurrénalome humain H295R, par la nouvelle méthode d'édition du génome CRISPR/Cas9. Nous avons mis au point les différents outils nécessaires à cette technologie qui comprend une co-transfection séquentielle, dans une même cellule, d'un vecteur de sélection, suivi d'un ARN guide, de la protéine Cas9 purifiée et d'un oligonucléotide simple brin de réparation. Une anomalie du vecteur de sélection a rendu impossible la sélection de cellules potentiellement modifiées.

L'ensemble de ce travail a permis de mieux préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans le défaut de signalisation glucocorticoïde de certains patients. Nous avons démontré l'existence d'une dégradation accrue du mutant L672P par le protéasome et une altération de la signalisation glucocorticoïde sur les fibroblastes des patients mutés. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour parvenir à introduire les mutations du GR dans la cellule H295R, afin de préciser le rôle du GR au sein même de la cellule corticosurrénalienne.

Abstract

Only 20 mutations of the glucocorticoid receptor (GR) have been described in the context of a glucocorticoid resistance syndrome at the start of this project in 2016. Three novel heterozygous missense mutations were recently discovered with the MUTA-GR national PHRC and characterized by our group. Both R477S and Y478C mutations are located on the DNA binding domain, while the L672P mutation is located on the ligand binding domain of the receptor.

The objective was to pursue the functional characterization of these 3 original mutations by complementary approaches, in order to better understand glucocorticoid signaling.

L672P mutant is non-functional due to lack of binding to dexamethasone. Its protein expression was reduced relative to the wild-type receptor in transfected HEK 293T cells via increased proteasome degradation.

A decreased transactivation of the GR target gene FKBP5 was found on heterozygous Y478C and R477S mutated skin fibroblasts, suggesting GR haploinsufficiency in mutated GR patients.

Finally, we tried to introduce (knock-in) these GR mutations into a human adrenocortical cell line H295R by the new CRISPR/Cas9 genome editing approach. We have developed the tools required for this technology which consists on a sequential co-transfection, of a selection vector, followed by a guide.

RNA, the purified Cas9 protein and a single stranded DNA oligonucleotide. A defect of the selection vector made it impossible to select potential modified cells.

This work clarified molecular mechanisms involved in the defect of glucocorticoid signaling. We have demonstrated the existence of an increased degradation of the L672P mutant by the proteasome and an alteration of glucocorticoid signaling on the fibroblasts of the mutated patients. Further work is needed to introduce GR mutations into the H295R cell, in order to better understand the role of GR in adrenal cells.

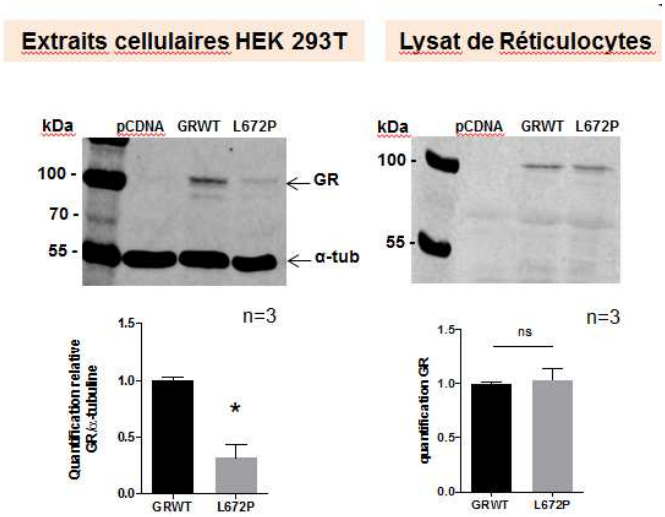
Publication

Vitellius G, Fagart J, Delemer B, Amazit L, Ramos N, Bouligand J, Le Billan F, Castinetti F, Guiochon-Mantel A, Trabado S, Lombès M. “Three novel heterozygous mutations of NR3C1 causing glucocorticoid resitance”.
Hum Mut., 2016 37: 794-803.

Rapport

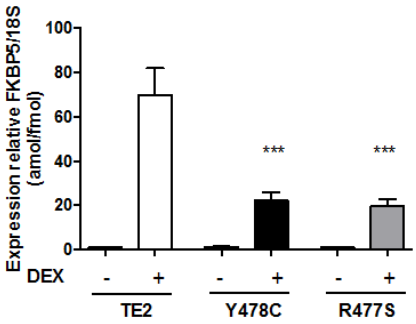
Par des approches moléculaires et cellulaires complémentaires, et l’utilisation de modèles ex-vivo, nous avons approfondi la caractérisation des 3 mutations du GR récemment décrites, issues de trois patients indépendants présentant tous un syndrome de résistance aux glucocorticoïdes.

L’expression protéique du GR a été évaluée par Western Blot, sur des extraits cellulaires totaux de cellules HEK 293T transfectées avec les plasmides codant le GR sauvage (WT) ou le mutant L672P. L’analyse quantitative a mis en évidence une diminution d’expression du GR muté L672P en comparaison au GR sauvage. L’expression protéique du GR dans un lysat de réticulocyte, système acellulaire de transcription/traduction in vitro dépourvu de matériel de dégradation protéique, est comparable pour le mutant L672P et le GR sauvage. Ces résultats sont en faveur d’un mécanisme intracellulaire de dégradation.



Afin de préciser le mécanisme impliqué dans cette dégradation, nous avons traité des cellules HEK 293T transfectées avec les plasmides codant le GRWT et le GR muté L672P, avec un inhibiteur du protéasome (MG132). L’expression du GR muté L672P est restaurée dans les cellules traitée par le MG132, en comparaison aux cellules non traitées. Ces résultats démontrent la dégradation protéique accrue du mutant L672P par le protéasome, expliquant ainsi l’haploinsuffisance du GR chez ce patient.

Dans les fibroblastes du patient porteur de la mutation Y478C, le niveau des transcrits et de protéine GR, déterminés respectivement par RT-qPCR et Western Blot, est comparable par rapport aux fibroblastes témoins. La transactication d'un gène cible endogène FKBP5 est diminuée de l'ordre de 70%, en faveur d'un défaut relatif de la signalisation glucocorticoïde.



Nous avons ensuite étudié en immunofluorescence la cinétique de la navette cyto-nucléaire hormono-induite du GR dans les fibroblastes mutés. En l'absence de ligand, le GR est localisé principalement dans le cytoplasme, pour les fibroblastes témoins et mutés. Après 20 minutes d'exposition à la dexaméthasone, le GR est très majoritairement nucléaire pour les fibroblastes des patients mutés, résultats comparables aux fibroblastes témoins. La navette cyto-nucléaire du GR muté ne paraît pas altérée.

L'étude des fibroblastes de la patiente porteuse de la mutation R477S s'est avérée plus compliquée en raison d'une entrée en sénescence précoce des cellules, avec des résultats douteux difficilement interprétables.

Enfin, nous souhaitions introduire les mutations R477S, Y478C et L672P de façon stable (knock-in) au niveau génomique dans une lignée cellulaire de corticosurrénalome humain, la lignée H295R, par la nouvelle méthode d'édition du génome CRISPR/Cas9.

Nous avons réalisé une transfection séquentielle d'un plasmide de sélection que nous avions construit, suivie dans les 24 à 48 h d'une transfection d'un ARN guide, de l'endonucléase Cas 9 purifiée, et d'un oligonucléotide simple brin de réparation.

Les cellules H295R ont la particularité d'être difficilement transfectables, ce qui a constitué une limitation très importante. Nous avons surtout été confrontés à l'inefficacité de notre vecteur de sélection rendant problématique la sélection de clones potentiellement recombinés.

L'exploration fonctionnelle de ces 3 mutants a apporté de nouveaux éléments sur la fonctionnalité du GR, la voie de signalisation glucocorticoïde, ainsi que sur les mécanismes moléculaires associés au syndrome de résistance aux glucocorticoïdes.

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2015 (30 K€)

Dr Estelle LOUISET
Direction **Pr Hervé LEFEBVRE**
INSERM U 982, Université de Rouen - UFR des Sciences et Techniques, MONT-SAINT-AIGNAN

Mécanismes responsables de l'expression anormale de l'ACTH dans les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales associées au syndrome de Cushing

Résumé

L'étude du mécanisme physiopathologique responsable de l'hypersécrétion de cortisol associé à l'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales (HMBS) a révélé que la production de cortisol est activée par des récepteurs membranaires anormalement exprimé (dont des récepteurs de la sérotonine [5-HT]), conduisant à la formation de systèmes illicites de régulation. De plus, l'hormone corticotrope (ACTH) produite par certaines cellules stéroïdogènes présentes dans les BMAH stimule la sécrétion de cortisol via l'activation de la voie de transduction AMPc/protéine kinase A (PKA). Nos résultats indiquent que le renforcement de l'activation de la voie AMPc/PKA induit par la production intrasurrénalienne d'ACTH dans les BMAH ou l'élévation de l'ACTH plasmatique chez les patients avec une maladie de Cushing, favorise la mise en place d'un système de régulation 5-HT-ergique dans le tissu surrénalien. La boucle 5-HT-ergique participe au développement de l'hypercortisolisme et pourrait représenter une cible thérapeutique pour freiner la production de cortisol.

Abstract

Pathophysiology studies of cortisol hypersecretion due to bilateral macronodular hyperplasia (BMAH) have shown that cortisol production is activated by abnormally expressed membrane receptors (including serotonin [5-HT] receptors), leading to formation of illicit regulatory systems. In addition, ACTH produced by some BMAH steroidogenic cells is able to stimulate cortisol secretion through activation of the cAMP/protein kinase A (PKA) pathway. Our results indicate that intense activation of the cAMP/PKA pathway resulting from intra-adrenal secretion in BMAH tissues or increase in plasma ACTH levels in patients with Cushing's disease or ectopic secretion of ACTH, favors an aberrant 5-HT-ergic stimulatory loop in adrenocortical tissu. The intraadrenal 5-HT signaling pathway participates in the pathophysiology of hypercortisolism and could represent a therapeutic target to reduce cortisol production.

Publications

Julie Le Mestre, Céline Duparc, Yves Reznik, Fidéline Bonnet-Serrano, Philippe Touraine, Olivier Chabre, Jacques Young, Mari Suzuki, Mathilde Sibony, Françoise Gobet, Constantine A. Stratakis, Gérald Raverot, Jérôme Bertherat, Hervé Lefebvre and Estelle Louiset. Illicit upregulation of serotonin signaling pathway in adrenals of patients with high plasma or intraadrenal ACTH levels.
J Clin Endocrinol Metab 2019, doi:10.1210.

Estelle Louiset, Céline Duparc and Hervé Lefebvre. Role of serotonin in the paracrine control of adrenal steroidogenesis in physiological and pathophysiological conditions.
Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 2019, 8:50–59.

L'hyperplasie macronodulaire bilatérale des surrénales (HMBS) est une cause rare de syndrome de Cushing. Elle se caractérise par la présence de multiples nodules surrénaliens bilatéraux. L'hypercortisolisme qui lui est associé réprime la sécrétion hypophysaire de l'hormone corticotrope (ACTH) via le mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par l'excès de cortisol. Des travaux anciens ont révélé que chez certains patients atteints d'HMBS, la production de cortisol est augmentée en réponse à l'activation de récepteurs membranaires exprimés anormalement par les cellules d'HMBS [1]. Les mécanismes à l'origine de l'expression des récepteurs illégitimes ne sont pas élucidés. Ces récepteurs illicites sont activés par des facteurs circulants ou produits dans les surrénales. Il peut s'agir de récepteurs ectopiques, comme celui liant l'hormone lutéinisante, ou de récepteurs eutopiques surexprimés, comme celui de la sérotonine de type 4 (5-HT4). Ces récepteurs classiquement couplés à la voie adénylyl cyclase/cAMP/PKA sont capables de stimuler la synthèse de cortisol par le même mécanisme que l'ACTH [2–4]. Par ailleurs, notre équipe a démontré que certaines cellules stéroïdogènes présentes dans les HMBS, expriment anormalement le gène POMC et produisent de l'ACTH [5]. La sécrétion d'ACTH intra-surrénalienne qui est activée par différents ligands des récepteurs illégitimes, stimule la synthèse de cortisol par un mécanisme paracrine et contribue au développement du syndrome de Cushing. L'expression anormale de différents types de récepteurs de la 5-HT observée dans une autre pathologie surrénalienne, la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales, qui est le siège d'une activation constitutive de la voie cAMP/PKA (due à une mutation inactivatrice du gène PRKAR1A) [6], nous a conduit à émettre l'hypothèse que dans les HMBS, la production intra-surrénalienne d'ACTH activant la voie cAMP/PKA pourrait faciliter l'émergence de récepteurs illégitimes de la 5-HT dans ces lésions.

Nous avons recherché la présence des acteurs de la transmission 5-HT-ergique dans une série d'HMBS. Nous avons constaté l'expression anormale de l'enzyme clé de la synthèse de sérotonine, la tryptophane hydroxylase responsable d'une production intrasurrénalienne de 5-HT, et de récepteurs 5-HT illégitimes de types 4, 6 et 7, qui sont tous couplés positivement à la voie cAMP/PKA [7]. Ces mêmes profils d'expression ont été retrouvés dans des tissus surrénaliens de patients présentant un syndrome de Cushing induit par une tumeur productrice d'ACTH de localisation hypophysaire ou ectopique. Par ailleurs, notre équipe a montré que l'activation de la PKA dans la lignée H295R de cellules cortiticosurrénaliennes humaines engendre une surexpression des gènes codant la tryptophane hydroxylase et les récepteurs 5-HT de types 4, 6 et 7 [6]. Ces données indiquent que la stimulation chronique de la voie AMPc/PKA par l'ACTH, produite localement dans les HMBS ou d'origine extrasurrénalienne pour les autres pathologies, déclenche un mécanisme adaptatif conduisant à l'émergence d'un système de régulation 5-HT-ergique dans les cellules corticosurrénaliennes [7]. Les récepteurs de la 5-HT mis en jeu étant eux aussi couplés positivement à la voie AMPc/PKA pourraient amplifier le processus. Sur le plan fonctionnel, nos travaux menés sur des explants surrénaliens démontrent d'une part que la 5-HT produite par les cellules stéroïdogènes peut être sécrétée, et d'autre part que la 5-HT stimule la production de cortisol via l'activation des récepteurs illégitimes. De plus, nous avons observé que l'inhibition pharmacologique de la tryptophane hydroxylase freine in vitro la production de cortisol, ce qui met en évidence l'existence d'un tonus stimulateur de la 5-HT sur la synthèse de cortisol. Dans les HMBS, la réponse sécrétoire du cortisol à la 5-HT est en partie relayée par la libération d'ACTH induite par cette amine.

Globalement, nos données révèlent l'existence d'une relation bidirectionnelle entre l'ACTH et la 5-HT dans une boucle stimulatrice intra-surrénalienne favorisant la surproduction de cortisol. Elles ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes pour le syndrome de Cushing associé aux HMBS. En effet, des antagonistes du récepteur de l'ACTH, le MC2R, pourrait freiner la sécrétion de cortisol. Par ailleurs, des inhibiteurs de la tryptophane hydroxylase ne traversant pas la barrière hémato-encéphalique, comme celui utilisé actuellement pour la prise en charge du syndrome carcinoïde [8], pourraient représenter dans le futur une option thérapeutique supplémentaire pour contrôler la production de cortisol. A l'inverse, l'utilisation des traitements inhibiteurs de la recapture de la sérotonine, largement prescrits dans les cas de troubles thymiques associés au syndrome de Cushing, pourrait être reconsidérée car ils seraient susceptibles d'aggraver l'hypercortisolisme en potentialisant le tonus 5-HT-ergique intrasurrénalien.

1. Lacroix A, Bourdeau I, Lampron A, Mazzuco TL, Tremblay J, Hamet P: Aberrant G-protein coupled receptor expression in relation to adrenocortical overfunction. Clin Endocrinol (Oxf) 2010, 73:1–15.

2. Bertherat J, Contesse V, Louiset E, Barrande G, Duparc C, Groussin L, Emy P, Bertagna X, Kuhn J-M, Vaudry H, et al.: In vivo and in vitro screening for illegitimate receptors in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome: identification of two cases of gonadotropin/gastric inhibitory polypeptide-dependent hypercortisolism. J Clin Endocrinol Metab 2005, 90:1302–1310.

3. Louiset E, Contesse V, Groussin L, Cartier D, Duparc C, Barrande G, Bertherat J, Vaudry H, Lefebvre H: Expression of serotonin7 receptor and coupling of ectopic receptors to protein kinase A and ionic currents in adrenocorticotropin-independent macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2006, 91:4578–4586.

4. Louiset E, Duparc C, Lenglet S, Gomez-Sanchez CE, Lefebvre H: Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells. Mol Cell Endocrinol 2017, 441:99–107.

5. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, Libé R, Bram Z, Groussin L, Caron P, et al.: Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. N Engl J Med 2013, 369:2115–2125.

6. Bram Z, Louiset E, Ragazzon B, Renouf S, Wils J, Duparc C, Boutelet I, Rizk-Rabin M, Libe R, Young J, et al.: PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. J Clin Investig Insight 2016, 1:e87958.

7. Le Mestre J, Duparc C, Reznik Y, Bonnet-Serrano F, Touraine P, Chabre O, Young J, Suzuki M, Sibony M, Gobet F, et al.: Illicit upregulation of serotonin signaling pathway in adrenals of patients with high plasma or intraadrenal ACTH levels. J Clin Endocrinol Metab 2019, doi:10.1210/jc.2019-00425.

8. Pavel M, Gross DJ, Benavent M, Perros P, Srirajaskanthan R, Warner RRP, Kulke MH, Anthony LB, Kunz PL, Hörsch D, et al.: Telotristat ethyl in carcinoid syndrome: safety and efficacy in the TELECAST phase 3 trial. Endocr Relat Cancer 2018, 25:309–322.

Bourse de Recherche en Endocrinologie (1 an) SFE 2015 (42 K€)

Dr Justine BOULLY
Direction **Pr Nelly PITTELOUD**
Service of Endocrinology, Diabetology and Metabolism Department of Physiology, Centre hospitalier universitaire vaudois (CHUV), LAUSANNE, Suisse

Genetic investigations of patients with deficiency in the hypothalamic gonadodropin-releasing hormone.

Résumé

La reproduction des vertébrés est régulée hormonalement par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. La sécrétion de l'hormone GnRH (gonadotropin-releasing hormone) par l'hypothalamus stimule la libération de gonadotrophines par l'hypophyse, stimulant à son tour la stéroïdogenèse et la gamétogenèse dans les gonades. Dans de rares cas, des patients présentent un défaut pubertaire en raison d'un déficit en GnRH, entraînant un défaut de maturation sexuelle et de fertilité, un trouble connu sous le nom d'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH), une maladie rare et héréditaire. Les mutations dans plus de 25 gènes sont responsables de la pathogénicité du CHH, cependant, plus de 50% des patients atteints de cette pathologie ne présentent aucune mutation dans les gènes connus. Ce projet vise à mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la pathogenèse des CHH en utilisant les données de séquençage par whole-exome d'une large cohorte de patients. Les résultats préliminaires montrent la présence de mutations dans les gènes de la famille *DCC*/*Netrin*, dont les protéines sont impliquées dans la migration des neurones à GnRH. Nous réalisons la caractérisation fonctionnelle des protéines mutées par le biais d'essais d'expression, de signalisation cellulaire et de migration neuronale afin d'élucider l'implication de ces gènes dans la physiopathologie de la CHH. En conclusion, cette étude permettra de mieux comprendre la biologie des neurones à GnRH et facilitera le diagnostic, le conseil génétique et la médecine personnalisé pour les patients et les membres de leur famille.

Abstract

Vertebrate reproduction is regulated hormonally by the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by the hypothalamus stimulates release of gonadotropins by the pituitary, which in turn stimulates steroidogenesis and gametogenesis in the gonads. In rare cases, patients do not initiate puberty due to GnRH deficiency, resulting in failure of sexual maturation and fertility—a condition known as congenital hypogonadotropic hypogonadism (CHH), a rare and heritable disease. Mutations in >25 genes are known to underlie CHH, however >50% of the patients with this condition lack mutations in these genes. This project aims to discover novel genes involved in CHH pathogenesis using human exomes in a large cohort of patients. Preliminary results demonstrate mutations in the DCC/netrin gene family, whose proteins are implicated in GnRH neuron migration. We propose the functional characterization of mutated proteins through expression, cell-signaling, and neuronal migration assays to elucidate the involvement of these genes in CHH pathophysiology. Ultimately, this will lead to an enhanced understanding of GnRH biology and will support the diagnosis, genetic counseling, and personalized medical treatment plans for patients and their family members.

Publication

J. Bouilly, A. Messina, G. Papadakis, B. Tata, D. Cassatella, C. Xu, JS. Acierno, G. Sykiotis, S. Santini, Y. Sidis, E. Elowe-Gruau, F. Phan-Hug, M. Hauschild, PM. Bouloux, R. Quinton, M. Lang-Muritano, P. Giacobini, AA. Dwyer, NJ. Niederländer, N Pitteloud. Mutations in the DCC/NTN1 complex impair GnRH neuron development in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism.

Hum. Mol Genet. – 2018 Jan; 27(2): 359–372

OBJECTIFS

L'hypogonadisme hypogonadotrope congénital (CHH) est une maladie rare due à un déficit en GnrH (gonadotropin-releasing hormone) entrainant une absence ou un retard pubertaire. Lorsque cette pathologie est associée à une anosmie, on parle alors de syndrome de Kallman (KS). Lors de ces 30 dernières années, les études génétiques utilisant la cytogénétique ou les approches gènes-candidats ont permis d'identifier plus de 25 gènes impliqués dans la pathogénicité du CHH, permettant une meilleure compréhension du processus de migration des neurones à GnRH.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence de nouveaux gènes candidats du CHH. Le premier gène muté mis en évidence dans cette pathologie, *KAL1*, code une protéine de la matrice extracellulaire contenant des domaines FN3. Cette protéine joue un rôle clé dans la migration des neurones à GnRH. Les mutations rapportées dans le gène *KAL1* sont majoritairement localisées dans les domaines FN3. De même, il a été mis en évidence d'autres gènes, codant des protéines à FN3-domaine, impliqués dans la pathogénicité du CHH ou d'autres pathologies présentant un développement neuronal altéré. Nous posons donc l'hypothèse que les gènes à FN3-domaine, ayant un rôle dans la migration neuronale peuvent être mutés dans les CHH.

Pour ce faire, nous avons utilisé les données de whole-exome sequencing (WES) réalisées dans une large cohorte de CHH afin de mettre en évidence de potentiels nouveaux gènes-candidats codant pour une protéine à FN3-domaine impliquée dans la migration neuronale.

RESULTATS OBTENUS

I- DCC : nouveau gène candidat impliqué dans le CHH :

Un WES a été réalisé chez 133 patients CHH (73 KS et 60 normosmic CHH [nCHH]), basé sur notre hypothèse que les gènes codant une protéine à FN3-domaine sont potentiellement mutés dans cette pathologie, nous filtrons nos résultats afin d'inclure : (i) les gènes codant une protéine à FN3-domaine, (ii) les protéines jouant un rôle dans la migration neuronale, (iii) les gènes impliqués dans une maladie génétique caractérisée par des défauts du système nerveux central, (iiii) les gènes présentant de rares variants (VAF <0.1% dans la cohorte contrôle Exac). Cette stratégie a permis d'identifier 5 gènes candidats, dont *KAL1* permettant de valider le filtrage bio-informatique. Basé sur la littérature, nous mettons en évidence que le gène *DCC* est un potentiel nouveau gène candidat.

Au sein du gène *DCC*, nous mettons en évidence 5 mutations faux-sens chez 7 patients (6 KS et 2 nCHH). Deux patients porteurs d'une mutation *DCC* présentent un variant dans le gène *Netrin-1* (*NTN1*), le ligand de *DCC*.

II- Les variants DCC et NTN1 sont perte-de-fonctions :

Afin de mettre en évidence l'activité biologique de ces variants, nous testons dans un premier temps la capacité des variants *DCC* à lier leur récepteur Netrin-1, et inversement. Deux variants *DCC* (N176S et S876E), et les 2 variants *NTN1* présentent une altération de liaison récepteur/ligand. Dans un second temps, nous testons la voie de signalisation DCC/NTN1 à l'aide d'un essai luciférase. Nous observons un défaut de signalisation pour tous les variants *DCC* et *NTN1*. Ces deux essais fonctionnels suggèrent que les variants de ce couple récepteur/ligand entrainent une altération des fonctions protéiques.

III- Les variants DCC induisent un défaut morphologique les neurones à GnRH immortalisés :

Nous avons examiné l'effet des mutants DCC sur la morphologie cellulaire de neurones à GnRH immortalisés (cellules GN11) afin d'observer l'impact de ces variants sur la mobilité et la mise en place des neurones à GnRH. Comme déjà observé, la surexpression de DCC-WT au sein de cellules immortalisées induit un changement drastique dans la morphologie des cellules due à une activation du remodelage du cytosquelette incluant la formation de lamellipodes et fillopodes comparé aux cellules contrôles. En revanche, la surexpression des mutants DCC ne permet pas d'induire cette même modification morphologique se traduisant par une diminution signification du périmètre cellulaire, de l'aire cellulaire et de l'indice de complexité comparé

aux cellules DCC-WT. Ces résultats confirment que les variants *DCC* entrainent un défaut de réarrangement du cytosquelette et de la membrane impliqués dans la migration neuronale.

III- Les variants NTN1 affectent la migration des neurones à GnRH :

Nous avons testé l'impact des variants *NTN1* sur la mobilité des neurones à GnRH immortalisés (cellules GN11) à l'aide d'un test de migration en utilisant du milieu conditionné (CM) contenant les protéines recombinantes NTN1-WT ou mutées. Comme attendu, le traitement par NTN1 WT-CM augmente de façon significative (55%) la migration des cellules GN11 comparé au Mock-CM. Cet effet est considérablement altéré pour les mutants R362C et T525R NTN1 avec un taux de migration équivalent au milieu contrôle (Mock-CM). Ces résultats confirment que les variants NTN1 sont des mutations perte de fonction, et qu'elles peuvent altérer la migration des neurones à GnRH.

CONCLUSIONS

En conclusion, dans cette étude nous rapportons pour la première fois des mutations perte de fonction dans *DCC*, un gène codant une protéine contenant un domaine FN3, et son ligand, *Netrin-1*, avec une prévalence de mutation de 5,2% pour ces deux gènes dans notre cohorte CHH. La prévalence des mutations *DCC*/*NTN1* est similaire à celle d'un autre gène codant une protéine à domaine FN3, *KAL1*, suggérant que la prévalence de cette famille de gènes est d'environ 10% chez les patients CHH, équivalent à *FGF8*/*FGFR1* rapportés comme la famille de gènes le plus fréquemment mutés dans les KS et nCHH avec une prévalence de 10-12%. Nos différents résultats obtenus, (i) une prévalence élevée des mutations *DCC*/*NTN1* dans CHH, (ii) une altération de la réorganisation du cytosquelette et de la migration cellulaire induite par un défaut de signalisation, ainsi que (III) l'expression de DCC et NTN1 dans le système GnRH humain en développement, permettent d'inclure *DCC* et *NTN1* dans la liste des gènes impliqués dans le CHH.

Bourses SFE « Bordeaux 2016 »

Bourse de Fin de thèse mutualisée (6 mois) H.A.C. Pharma & SFE 2016 (22 K€)

Dr Ingrid LEMA
Codirection **Dr Marc LOMBES & Dr Say VIENGCHAREUN**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Contrôle Post-transcriptionnel de l'Expression Rénale du Récepteur Minéralocorticoïde par les Variations de Tonicité Extracellulaire : Conséquences Physiopathologiques.

Résumé

L'aldostérone est une hormone stéroïde, qui agit en se liant au Récepteur Minéralocorticoïde (MR), un facteur de transcription régulant l'expression des gènes cibles impliqués dans le contrôle de la balance hydrosodée et de la pression artérielle. Les altérations de l'expression rénale du MR ou de la signalisation minéralocorticoïde sont associées à des pathologies chez l'homme (perte hydrosodée, hypertension artérielle, etc…). En utilisant un modèle de cellules rénales principales et des souris soumises à un stress osmotique, nous avons montré que l'expression rénale du MR est régulée au niveau post-transcriptionnel par les variations de tonicité extracellulaire puisque l'hypertonicité réprime son expression alors que l'hypotonicité l'augmente. Ce travail de thèse a permis de disséquer les mécanismes moléculaires sous-jacents, qui impliquent le recrutement de régulateurs post-transcriptionnels comme les protéines de liaison à l'ARN (Tis11b et HuR) et les microARNs (miARNs).

L'identification de ces mécanismes inédits, qui régulent l'expression du MR et qui ont un impact sur la voie de signalisation minéralocorticoïde, améliore notre compréhension de la physiopathologie de l'homéostasie hydrosodée, et pourrait déboucher sur de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Abstract

Aldosterone is a steroid hormone that acts by binding to the Mineralocorticoid Receptor (MR), a transcription factor that regulates expression of target genes involved in the control of salt and water balance and blood pressure. Alterations in renal MR expression or mineralocorticoid signaling are associated with human pathologies (salt and water loss, arterial hypertension, etc.). Using a model of principal renal cells and mice subjected to osmotic stress, we have shown that renal MR expression is regulated at the post-transcriptional level by variations of extracellular tonicity since hypertonicity represses its expression whereas hypotonicity increases it. This PhD program uncovered the underlying molecular mechanisms that involve the recruitment of post-transcriptional regulators such as RNA Binding Proteins (Tis11b and HuR) and microRNAs (miRNAs). Identification of these novel mechanisms that regulate MRexpression and impact the mineralocorticoid signaling pathway improves our understanding of the pathophysiology of salt and water homeostasis and may lead to new therapeutic strategies.

Publications

Lema I et al, "RNA-binding protein HuR enhances mineralocorticoid signaling in renal KC3AC1 cells under hypotonicity.
Cell. Mol. Life Sci. 74, 4587-4597 (**2017a**).

Lema, I. et al. HuR-Dependent Editing of a New Mineralocorticoid Receptor Splice Variant Reveals an Osmoregulatory Loop for Sodium Homeostasis.
Sci Rep 7, 4835 (**2017b**).

Communications

Communications à des congrès nationaux (SFE) et internationaux (Endocrine, ECE, Febs, Embl).

L'aldostérone, principale hormone minéralocorticoïde chez l'homme, exerce ses effets physiologiques grâce à sa liaison au Récepteur Minéralocorticoïde (MR). Ce récepteur nucléaire (NR3C2) agit comme un facteur de transcription qui module l'expression de gènes cibles impliqués dans la réabsorption de sodium et l'excrétion de potassium dans les tissus épithéliaux (rein, colon, glandes salivaires), permettant ainsi de maintenir la balance hydrosodée et la pression artérielle. La dérégulation de la voie de signalisation minéralocorticoïde peut avoir des conséquences majeures pour l'organisme avec le développement de certaines pathologies comme le pseudohypoaldostéronisme de type 1, l'hypertension artérielle ou l'atteinte rénale, d'où la nécessité de comprendre les mécanismes, qui régulent l'expression du MR.

Dans les segments néphroniques, les cellules rénales sont soumises à des variations importantes de tonicité extracellulaire du fait du gradient corticopapillaire. L'observation d'une expression différentielle rénale du MR qui est faible dans la médullaire profonde, là où la lumière du tubule est plutôt hypertonique alors que son expression est importante dans le cortex, là où la lumière du tubule est relativement hypotonique, suggérait la possibilité d'une régulation du MR par la tonicité extracellulaire. Ainsi, notre équipe avait préalablement démontré que l'hypertonicité réprime l'expression du MR alors que l'hypotonicité augmente son expression.

Ce travail de thèse a permis de préciser les mécanismes moléculaires sous-jacents, qui impliquent le recrutement de régulateurs post-transcriptionnels comme les protéines de liaison à l'ARN (Tis11b et HuR) et les microARNs (miARNs), ces effecteurs contrôlent la stabilité des transcrits cibles et leur traduction. En réponse à l'hypertonicité, la protéine Tis11b (Tetra-decanoyl Phorbol Acetate-induced sequence 11b) est induite et accélère la dégradation du transcrit MR, réduisant ainsi la signalisation minéralocorticoïde. Ces résultats ont été confirmés in vivo dans le rein de souris soumises à des conditions augmentant le flux sodé dans les segments tubulaires distaux (restriction hydrique, diurétiques de l'anse, régime riche en Na+). A l'opposé, l'hypotonicité provoque la relocalisation rapide dans le cytoplasme de la protéine HuR/ELAVL1 (Hu Antigen R/Embryonic lethal abnormal vision like 1), qui stabilise le transcrit MR, augmentant ainsi son expression et améliorant la sensibilité de la réponse rénale à l'aldostérone. Nous avons aussi mis en évidence le rôle de la protéine HuR dans l'édition d'un nouveau variant du transcrit MR dans lequel l'exon 6 est exclu. Ce variant d'épissage, appelé $\Delta 6$, aboutit à la formation d'une protéine MR tronquée de sa partie C-terminale et donc dépourvue du domaine de liaison à l'aldostérone. Ce mutant exprimé dans les tissus et les cellules cibles de l'aldostérone est constitutivement actif car ligand-indépendant et exerce un effet dominant négatif sur la protéine MR. Nous avons aussi montré que l'hypotonicité, en réduisant l'accumulation nucléaire de HuR, favorise l'inclusion de l'exon 6 et donc l'expression et la stabilisation de la protéine MR, aux dépens de l'isoforme tronquée conduisant à meilleure réponse à l'aldostérone.

Grâce au soutien financier de la Société Française d'Endocrinologie, nous avons pu poursuivre nos investigations sur les mécanismes de régulation post-transcriptionnels contrôlant l'expression rénale du MR en réponse aux variations de tonicité extracellulaire. L'utilisation de logiciels de prédiction (miRANDA et TargetScan) a permis d'identifier de nombreux sites putatifs de liaison aux miARN dans la région 3'-non traduite (3'-untranslated region ou 3'-UTR) du transcrit MR, suggérant que ce transcrit MR pourrait être régulé par les miARNs. Grâce à un crible haut débit utilisant des plaques TLDA (Taqman Low Density Array), nous avons montré que les variations de tonicité extracellulaire modulent l'expression d'une centaine de miARNs. L'expression différentielle de certains de ces miARNs candidats a pu être validée par RT-qPCR à la fois in vitro et in vivo. Des résultats préliminaires intéressants ont été obtenus puisque l'expression de certains de ces miARNs a été mesurée dans le plasma et les urines chez l'Homme. Ceci suggère que le rôle important des miARNs en conditions normales ou pathologiques. Nous abordons maintenant l'étude de ces miARNs plasmatiques et urinaires dans des pathologies cardiorénales, ces miARNs pourraient servir des biomarqueurs non invasifs diagnostiques ou prédictifs. L'étude des régulateurs post-transcriptionnels (protéines de liaison à l'ARN et miARNs) devrait faciliter une meilleure prise en charge de patients, chez lesquels la signalisation minéralocorticoïde est altérée.

Bourse de « Master » mutualisée – Surrénales (1 an) HRA Pharma & SFE 2016 (32 K€)

Dr Geoffrey BOULATE
Direction **Dr Eric BAUDIN**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Association Mitotane et Statines dans le traitement du corticosurrénalome : impact sur le métabolisme lipidique, la croissance tumorale et la stéroïdogenèse.

Résumé

Le mitotane est le traitement de choix du corticosurrénalome avancé avec métastase (ACC). La dyslipidémie induite par le mitotane est généralement traitée par des statines. Or, on sait que le mitotane et les statines exercent un effet antiprolifératif in vitro. Cependant, l'effet des statines n'a jamais été évalué directement chez les patients présentant des ACC ou dans les cellules corticosurrénaliennes. Des données préliminaires de notre équipe avaient montré que l'utilisation combinée de mitotane et de statines augmentait de façon significative le contrôle tumoral chez les patients atteints d'ACC. Ainsi, nous avons cherché dans cette étude à préciser l'effet de la rosuvastatine sur les cellules corticosurrénaliennes humaines. Il nous semblait important d'élucider les mécanismes moléculaires de cette potentialisation. Dans cette étude, nous avons examiné les effets du mitotane, de la rosuvastatine et de leur combinaison dans les cellules humaines H295R en utilisant des tests de prolifération, des analyses d'expression génique et de mesure du cholestérol intracellulaire libre. Les résultats ont confirmé que le mitotane réduisait la viabilité cellulaire, induisait l'apoptose et augmentait la concentration intracellulaire de cholestérol libre, considéré comme l'un des principaux marqueurs de l'action du mitotane, alors que la rosuvastatine seule réduisait la viabilité cellulaire et augmentait l'apoptose uniquement à fortes concentrations. Nous avons également démontré que la rosuvastatine potentialisait les effets du mitotane en réduisant la viabilité cellulaire, en induisant l'apoptose, en augmentant la concentration intracellulaire de cholestérol libre et en diminuant l'expression de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMGCR) et de l'ATP binding cassette subfamily a member 1 (ABCA1), gènes participant au métabolisme du cholestérol, tout en inhibant la stéroïdogénèse. Ainsi, la potentialisation des effets du mitotane par la rosuvastatine pourrait ouvrir sur de nouvelles stratégies thérapeutiques pour l'ACC. L'association de ces deux médicaments, moyennant une validation clinique, pourrait conduire à une meilleure prise en charge de l'ACC.

Abstract

Mitotane (also termed o,p' DDD) is the most effective therapy for advanced adrenocortical carcinoma (ACC). Mitotane induced dyslipidemia is treated with statins. Mitotane and statins are known to exert anti proliferative effects in vitro; however, the effects of statins have never been directly evaluated in patients with ACC and ACC cells, at least to the best of our knowledge. Thus, in this study, we aimed to examine the effects of the rosuvastatin on ACC cells. It has been shown that the combined use of mitotane and statins significantly increases the tumor control rate in patients with ACC; it remained of great interest to elucidate the molecular mechanisms involved in this potentiation. In this study, we examined the effects of mitotane, rosuvastatin and their combination in human H295R cells using proliferation assays, gene expression analyses and free intracellular cholesterol measurements. The results revealed that mitotane dose dependently reduced cell viability, induced apoptosis and increased intracellular free cholesterol levels, considered as one of the key features of mitotane action, while rosuvastatin alone reduced cell viability and increased apoptosis at high concentrations. We also demonstrated that rosuvastatin potentiated the effects of mitotane by reducing cell viability, inducing apoptosis, increasing intracellular free cholesterol levels, and by decreasing the expression of 3 hydroxy 3 methylglutaryl CoA reductase (HMGCR) and ATP binding cassette subfamily a member 1 (ABCA1), genes involved in cholesterol metabolism, and inhibiting steroidogenesis. Collectively, potentiating the effects of mitotane with the use of rosuvastatin may provide novel therapeutic strategies

for ACC, given that the combination of these drugs, pending clinical validation, may lead to the better management of ACC.

Publication

Boulate G et al. “Potentiation of mitotane action by rosuvastatin: New insightsfor adrenocortical carcinoma management”.

Int J Oncology (2019) 54: 2149-2156. doi: 10.3892/ijo.2019.4770.

Rapport

Les principaux résultats obtenus sont résumés sous forme de figures.

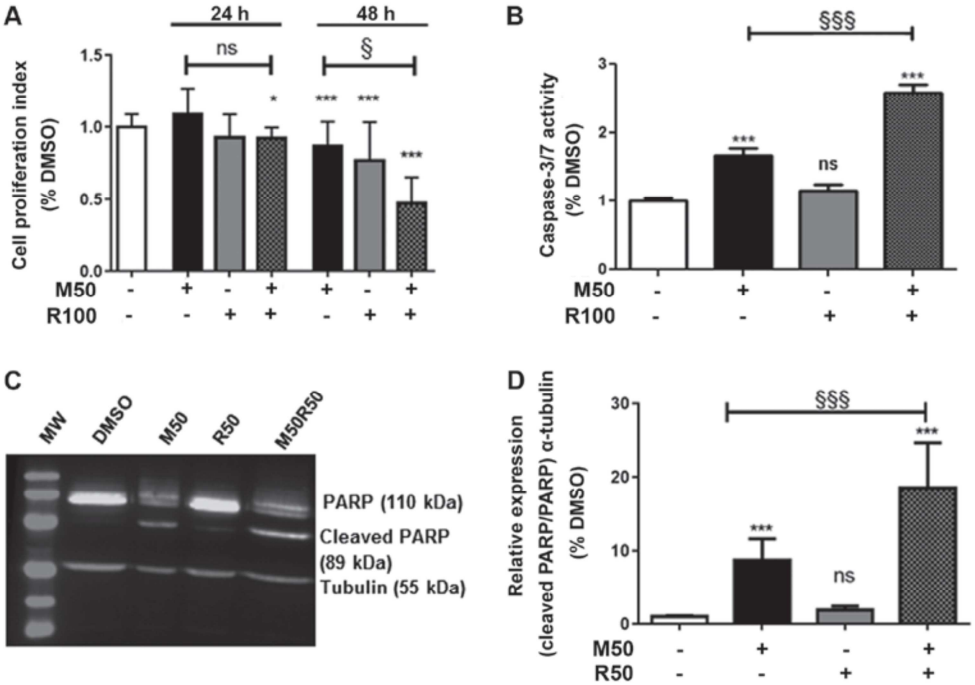


Figure 1. Viability and apoptosis of H295R cells treated with mitotane and/or rosuvastatin. (A) Cell viability in mitotane and/or rosuvastatin-treated H295R cells. H295R cells were treated for 24 and 48 h with mitotane (50 μM; M50), rosuvastatin (100 μM; R100), alone or in combination. Cell viability was measured by WST1 assay. Results are the means ± SEM of 8 to 32 independent determinations from 3 different experiments. (B) Activity of caspase-3/7 in H295R cells treated with mitotane and/or rosuvastatin. H295R cells were treated for 24 h with mitotane (50 μM; M50), rosuvastatin (100 μM; R100), alone or in combination. Apoptotic index was measured using the Caspase-Glo 3/7 kit by luminometry. Results are the means ± SEM to 16 independent determinations from 2 different experiments. (C) Expression of PARP in mitotane and/or rosuvastatin-treated H295R cells. H295R cells were treated for 24 h with mitotane (50 μM; M50), rosuvastatin (50 μM; R50), alone or in combination (M50 R50). Steady state levels of PARP and tubulin expression were analyzed by western blot analysis. Representative blots are shown. (D) Expression of PARP in mitotane and/or rosuvastatin-treated H295R cells shown by quantification of band intensities. Ratio between total PARP (110 kDa) and cleaved PARP (89 kDa) normalized to loading controls (tubulin, 55 kDa) are shown. Results are the means ± SEM of 7 to 18 independent determinations from 4 different experiments. Statistical analysis was carried out with the non-parametric Kruskal-Wallis multiple comparison tests followed by a Dunn's post hoc test. *P<0.05 and ***P<0.001 vs. DMSO condition; §P<0.05 and §§§P<0.001 vs. mitotane condition; ns, not significant.

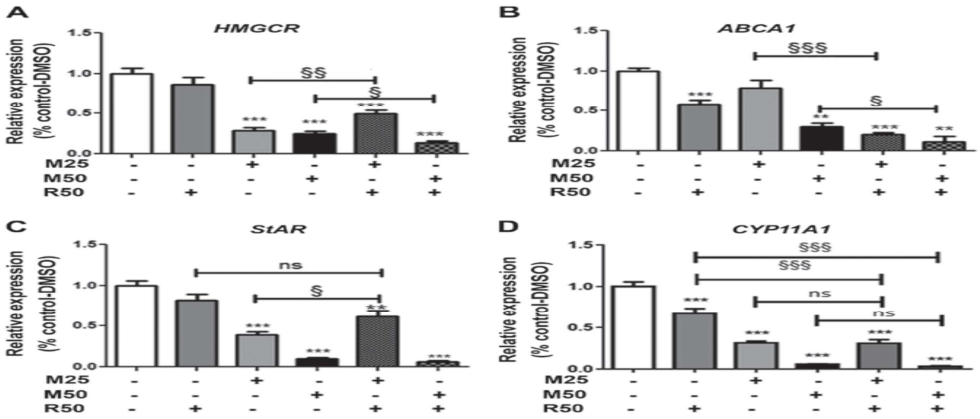


Figure 2. Expression of genes involved in cholesterol metabolism and steroidogenesis in H295R cells treated with mitotane and/or rosuvastatin. Gene expression was measured by RT-qPCR. H295R cells were treated for 48 h with mitotane (25 or 50 µM; M25, M50), rosuvastatin (50 µM; R50), alone or in combination. (A) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (*HMGCR*) gene expression. (B) ATP-binding cassette transporter (*ABCA1*) gene expression. Results are the means ± SEM of 8 independent determinations from 2 different experiments. Statistical analysis was carried out with the non-parametric Kruskal-Wallis multiple comparison tests followed by a Dunn's post hoc test. **P<0.01 and ***P<0.001 vs. DMSO condition; §P<0.05, §§P<0.01 and §§§P<0.001 vs. mitotane condition; ns, not significant.

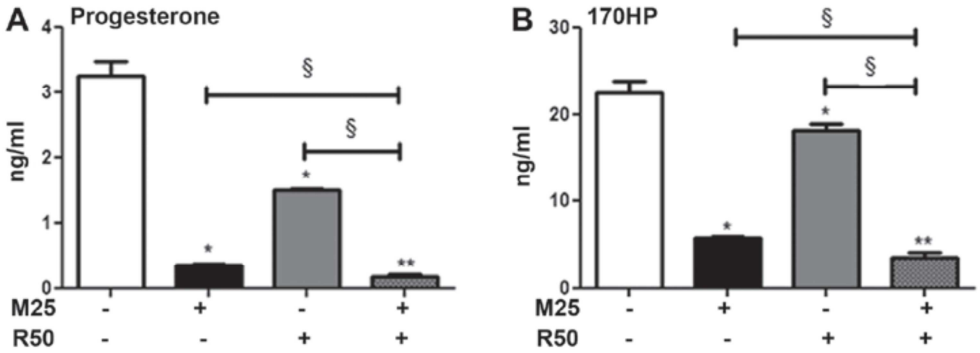


Figure 3. Steroidogenesis in H295R cells treated with mitotane and/or rosuvastatin. (A) Progesterone; (B) 17-hydroxyprogesterone (17OHP). H295R cells were treated for 48 h with mitotane (25 µM; M25), rosuvastatin (50 µM; R50) alone or in combination. Progesterone and 17OHP concentrations in cell supernatants were measured by LC-MS/MS. Results are the means ± SEM of 4 independent determinations. Statistical analysis was carried out with the non-parametric Kruskal-Wallis multiple comparison tests followed by a Dunn's post hoc test. *P<0.05 and **P<0.001 vs. DMSO condition; §P<0.05 vs. mitotane condition.

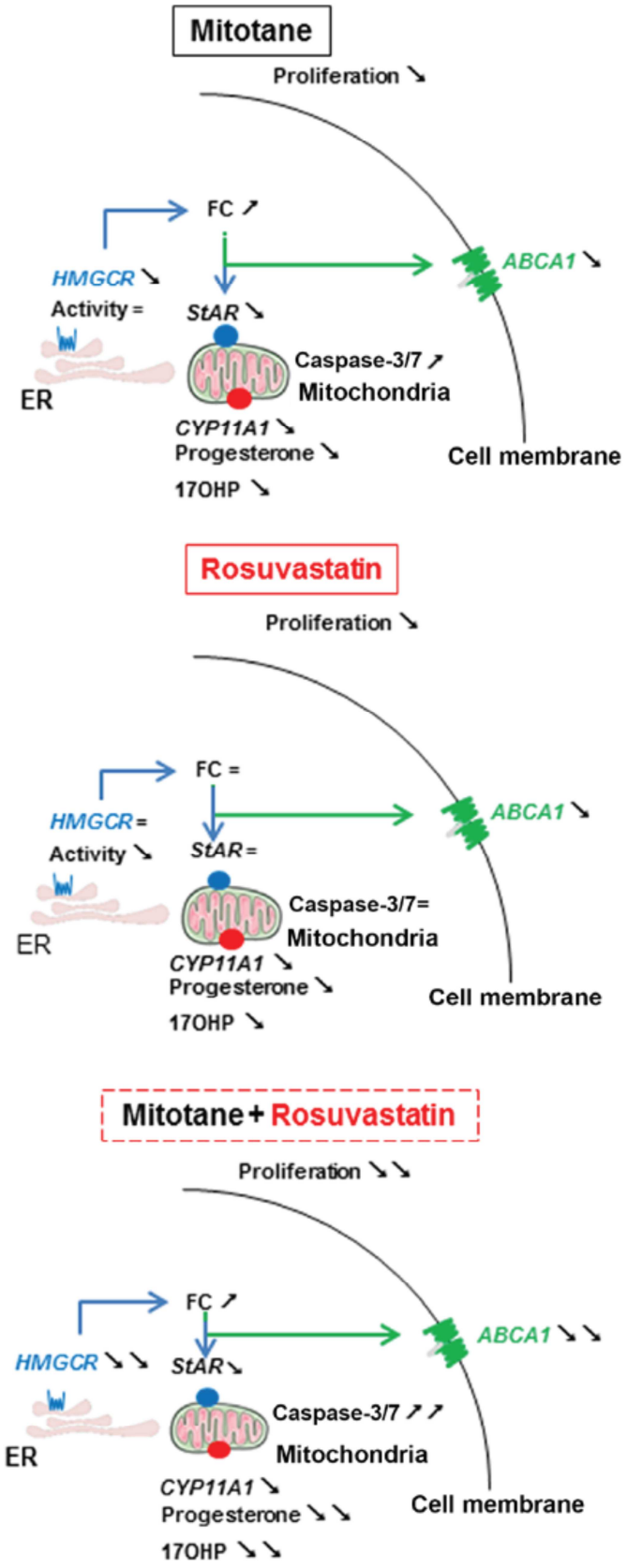


Figure 4. Mechanisms of action of mitotane and rosuvastatin in H295R cells. Arrows facing to the bottom right indicate decreased expression, concentration or activity compared to DMSO. Arrows facing to the top and right indicate an increased expression, concentration or activity compared to DMSO. The '=' symbol indicates the same expression, concentration or activity compared to DMSO. FC, free cholesterol; LDL-R, LDL receptor; SrB1, scavenger receptor B1; ABCA1, ATP-binding cassette transporter; ER, endoplasmic reticulum; HMGCR or HMGCoA reductase: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; CYP11A1, cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1; 17OHP, 17 hydroxyprogesterone.

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2016 (32 K€)

Dr Elise MATHY
Direction **Pr Lionel GROUSSIN-ROUILLER**
INSERM U 1016 - CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Département Endocrinologie, Métabolisme, Diabètes, PARIS

Rôle des partenaires de BRAF dans la physiopathologie et la résistance thérapeutique des cancers papillaires de la thyroïde.

Résumé

Les formes agressives de cancers thyroïdiens de souche folliculaire peuvent être dues à la présence de l'oncogène $BRAF^{V600E}$. Les inhibiteurs ciblant BRAF sont partiellement efficaces dans les cancers thyroïdiens. Les protéines partenaires de BRAF pourraient participer à une forme de résistance primaire à ces inhibiteurs. L'identification de ces partenaires pourrait aider à mieux inhiber ce puissant oncogène. Nous avons conduit des expériences d'immunoprécipitation de la protéine BRAF dans une lignée dérivant d'un cancer thyroïdien humain porteuse de la mutation $BRAF^{V600E}$ à l'état homozygote. Par analyse en spectrométrie de masse des protéines co-immunoprécipitées, nous avons identifié la protéine TJAP1 (Tight junction associated protein 1, située près de l'appareil de Golgi, dont la fonction reste inconnue) et la protéine NHE1 (Na^+/H^+ exchanger isoform 1) comme des partenaires potentiels de $BRAF^{V600E}$. Les résultats d'immunocytologie suggèrent une promiscuité intracellulaire de BRAF et TJAP1. L'interaction et la colocalisation de NHE1 avec BRAF reste à valider.

Ces premiers résultats ouvrent la perspective de nouveaux partenaires potentiels de $BRAF^{V600E}$ dans les cellules thyroïdiennes cancéreuses. A terme, cela pourrait découler sur de nouvelles thérapeutiques en ciblant $BRAF^{V600E}$ par l'intermédiaire de ses partenaires

Abstract

Aggressive forms of differentiated thyroid cancer may be due to the $BRAF^{V600E}$ oncogene. Inhibitors targeting BRAF are partially effective in thyroid cancers. BRAF's partner proteins may participate in some form of primary resistance to these inhibitors. The identification of these partners could help to better inhibit this powerful oncogene. We conducted immunoprecipitation experiments of the BRAF protein in a cell line derived from a human thyroid carcinoma harboring the homozygous $BRAF^{V600E}$ mutation. By mass spectrometry analysis of the co-immunoprecipitated proteins, we identified the protein TJAP1 (Tight junction associated protein 1, located near the Golgi apparatus, whose function remains unknown) and the NHE1 protein (Na + / H + exchanger isoform 1) as potential partners of $BRAFV^{600E}$. Immunocytology results suggest intracellular promiscuity of BRAF and TJAP1. The interaction and collocation of NHE1 with BRAF remains to be validated. These initial results open up the prospect of potential new partners for $BRAF^{V600E}$ in cancerous thyroid cells. Ultimately, this could result in new therapies by targeting $BRAF^{V600E}$ through its partners.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Les cancers thyroïdiens de souche folliculaire sont dus le plus souvent à une activation de la voie des MAPK par différentes anomalies moléculaires. La plus fréquente de ces anomalies est la mutation activatrice « hot spot » $BRAF^{V600E}$ de l'oncogène BRAF. Elle confère parfois une agressivité à ce type de cancers, rendant nécessaire des traitements à visée systémique. Les inhibiteurs de BRAF utilisés avec succès dans les mélanomes malins, sont moins efficaces dans les cancers thyroïdiens. Il existe des mécanismes de résistance variables en fonction des modèles tumoraux, qui ne sont que partiellement étudiés et compris. Cela conduit à une réactivation de la voie MAPK, soit en amont ou en aval de BRAF. La formation de dimères au sein des membres la famille Raf est l'un des mécanismes. Des stratégies alternatives pour l'inhibition de la kinase Raf sont donc encore nécessaires et pourraient être élaborées à partir de connaissances plus complètes des bases moléculaires de l'oncogénicité de $BRAF^{V600E}$ dans les cancers thyroïdiens. En effet, on sait que $BRAF^{V600E}$ peut interagir avec d'autres effecteurs que ceux de la voie MAPK. Par exemple $BRAF^{V600E}$ active PAK1 (p21 activated kinase : protéine régulant le cytosquelette**)** pour réguler la mobilité cellulaire, phosphoryle PAX3 (facteur de transcription) dans le noyau et conduit à la migration cellulaire indépendamment de MEK. Ainsi, $BRAF^{V600E}$, en interagissant avec d'autres protéines que celles de la voie MAPK pourrait entrainer leur dérégulation.

La connaissance de ses différentes interactions protéiques semble utile pour la progression des thérapeutiques en cancérologie thyroïdienne. Nous avons entrepris l'identification de nouveaux partenaires de la protéine $BRAF^{V600E}$.

Nous avons mis en œuvre, dans une lignée cellulaire dérivant d'un cancer humain anaplasique porteuse de la mutation $BRAF^{V600E}$ à l'état homozygote, la technique de purification par affinité de BRAF, suivie d'une analyse en spectrométrie de masse des peptides co-immunoprécipités. Dans un second temps nous avons validé les interactions et testé s'il existait une colocalisation subcellulaire éventuelle de BRAF et des protéines identifiées comme co-précipitant avec $BRAF^{V600E}$, par des techniques d'immunofluorescence.

Par cette approche, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction avec la kinase MEK située immédiatement en aval des protéines RAF sur la voie de signalisation en cascade des MAPK. La protéine $BRAF^{V600E}$ (forme mutée) pourrait être moins affine que la protéine BRAF sauvage pour la kinase MEK. De même, aucune des autres kinases de la famille RAF n'a été mise en évidence, leur hétérodimérisation avec $BRAF^{V600E}$ pourrait n'être observée qu'en présence d'un inhibiteur de la voie MAPK. Deux protéines partenaires candidates ont été identifiées : TJAP1 (Tight junction associated protein 1), qui est située à proximité de l'appareil de Golgi, et dont la fonction reste inconnue ; et la protéine NHE1 (Na^+/H^+ exchanger isoform 1).

En immunocytologie, $BRAF^{V600E}$ et TJAP1 semblent être colocalisées dans les cellules thyroïdiennes. TJAP1 est connu pour être un facteur de mauvais pronostic dans certains cancers. Son rôle et son lien avec BRAF muté reste à éclaircir. La co-localisation des protéines NHE1 et $BRAF^{V600E}$ restent à étudier, de même que le rôle et le lien de NHE1 avec BRAF. Les trois protéines BRAF, TJAP1 et NHE semblent avoir le même profil d'expression intracellulaire autour des endosomes ou vésicules proches de l'appareil de Golgi. Le rôle fonctionnel en terme de tumorigenèse de ses différents partenaires potentiels, que sont TJAP1 et NHE1, restent à étudier.

Ce travail s'inscrit donc dans une volonté de meilleure compréhension du rôle de $BRAF^{V600E}$ et son lien avec des partenaires peu connus et peu étudiés dans les cellules cancéreuses thyroïdiennes.

Bourse de « Master » - Croissance (1 an) LILLY 2016 (32 K€)

Mlle Alyson DEPREZ
Direction **Dr Mireille CASTANET**
INSERM U 982 - Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, Université de Rouen - Faculté des sciences, MONT-SAINT-AIGNAN

Voie minéralocorticoïde, mastocytes surrénaliens et adaptation à la vie extra-utérine.

Résumé

À la naissance, le taux d'aldostérone est élevé, indépendamment des taux maternels, suggérant une activation de la synthèse des minéralocorticoïdes dans la surrénale néonatale. Les mastocytes présents dès 20 semaines d'aménorrhée dans la surrénale foetale, pourraient être impliqués dans ce mécanisme comme observé dans la glande surrénale adulte au sein de laquelle ils stimulent la sécrétion d'aldostérone via la libération de sérotonine et activation de son récepteur 5-HT4.

Les mastocytes sont visualisés dans la zone sous-capsulaire dans les surrénales fœtales et néonatales mais leur densité est plus élevée dans la surrénale néonatale. De même, l'expression de l'aldostérone synthase était augmentée dans la surrénale néonatale par comparaison avec la surrénale fœtale. De façon surprenante, l'expression de la tryptophane hydroxylase de type 1, enzyme limitante de la synthèse de sérotonine, n'était pas limitée aux mastocytes mais concernait l'ensemble du cortex surrénalien sans différence significative entre la surrénale fœtale et la surrénale néonatale. Un profil d'expression similaire était observé pour le récepteur 5-HT4. Ces résultats suggèrent donc un contrôle de la synthèse d'aldostérone néonatale par les mastocytes dans l'adaptation à la vie extra-utérine. En revanche, le rôle de la voie de signalisation sérotoninergique reste imprécis.

Abstract

In newborns, plasma levels of aldosterone are high, independently of plasma maternal concentrations, suggesting an activation of mineralocorticoid production in the neonatal adrenal gland. Mast cells, which are present in the adrenal since 20 weeks of gestation could be involved in this process, like in the adult adrenal where they stimulate aldosterone secretion through local release of serotonin (5-HT) and activation of the serotonin receptor type 4 (5-HT4). Mast cells were observed in the subcapsular region of the cortex in both fetal and neonatal adrenals but their density was higher in neonatal versus fetal glands. Similarly, aldosterone synthase expression was increased in neonatal in comparison with fetal tissues. Surprisingly, expression of tryptophan hydroxylase type 1, a key enzyme for 5-HT synthesis, was not restricted to mast cells, but was also visualized in adrenocortical cells of the three layers of the cortex, in both neonatal and fetal glands without any significant difference between the two types of tissues. A similar expression profile was observed for the 5-HT4 receptor. These results suggested that aldosterone synthesis is positively controlled by intraadrenal mast cells during the intrauterine to extrauterine life transition. However, the role of the serotonergic signaling pathway remains to be elucidated.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

La glande surrénale humaine joue un rôle clé pendant la grossesse et les premiers jours de la vie. Dans la surrénale humaine adulte, il a été montré que la synthèse des minéralocorticoïdes est régulée par un mécanisme sérotoninergique de type paracrine. La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est produite à partir du tryptophane sous l'action de la tryptophane hydroxylase de type 1 (TPH1) dans les mastocytes intra-surrénaliens. Une fois libérée, la 5-HT vient stimuler la sécrétion d'aldostérone via l'activation de récepteurs de type 5-HT4 positivement couplés à la voie AMPc/PKA et à un influx cytosolique de calcium. Nous avions précédemment montré que la voie de signalisation sérotoninergique était présente dans la glande surrénale humaine en développement. Histologiquement et fonctionnellement, la surrénale foetale humaine est divisée en trois zones, de la périphérie vers le centre: la zone définitive, sous la capsule, qui exprime l'aldostérone synthase et la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2 (3β-HSD2), la zone de transition qui apparaît au deuxième trimestre de la gestation et la zone foetale interne. Les mastocytes deviennent visibles dans la zone définitive au cours du deuxième trimestre, juste avant l'expression des enzymes nécessaires à la biosynthèse de l'aldostérone. Ces résultats suggèrent l'implication des mastocytes dans l'établissement de la production d'aldostérone foetale, par le biais d'un mécanisme paracrine analogue à celui décrit dans la surrénale adulte.

L'adaptation à la vie extra-utérine nécessitant une stimulation de la production d'aldostérone indispensable au maintien de l'homéostasie hydro-sodée, nous avons postulé que les mastocytes surrénaliens pourraient également intervenir dans ce processus via la libération locale de 5-HT. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons évalué la densité mastocytaire et étudié l'expression de l'aldostérone synthase et de protéines de la voie de signalisation sérotoninergique dans des surrénales issues de foetus et de nouveau-nés.

I. Mastocytes et synthèse des minéralocorticoïdes

Les mastocytes ont été visualisés dans la région sous-capsulaire au sein de la zone positive pour 3β-HSD2 à la fois dans la surrénale foetale et la surrénale néonatale (Fig1A).

Globalement, la densité des mastocytes était significativement plus élevée dans la surrénale néonatale que dans la surrénale foetale (5.09 per mm2 versus 0.71 per mm2; $p = 0.004$). Cependant, la densité des mastocytes était variable tout au long de la gestation. En effet, dans la surrénale néonatale, la densité maximale de mastocytes était atteinte entre 28 et 32 semaines d'aménorrhée (grand prématuré) et diminuait considérablement à terme. Pour la surrénale foetale, aucune variation significative de la densité des mastocytes en fonction de l'âge gestationnel n'était observée (Fig. 1B). Pour fournir une analyse comparative de l'immunoréactivité de type aldostérone synthase, un H-score reflétant l'intensité et l'étendue du marquage a été établi en multipliant le pourcentage de cellules positives par un nombre allant de 0 à 3 (non présent [0], faible [1+], distinct [2+] et très fort [3+]). L'expression de l'aldostérone synthase était significativement augmentée dans la surrénale néonatale par rapport à la surrénale foetale (92.1 versus 15.2; $p = 0.02$) (Fig. 1C). Ainsi, ces résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de l'aldostérone synthase au cours de la transition entre la vie intra- et extra-utérine.

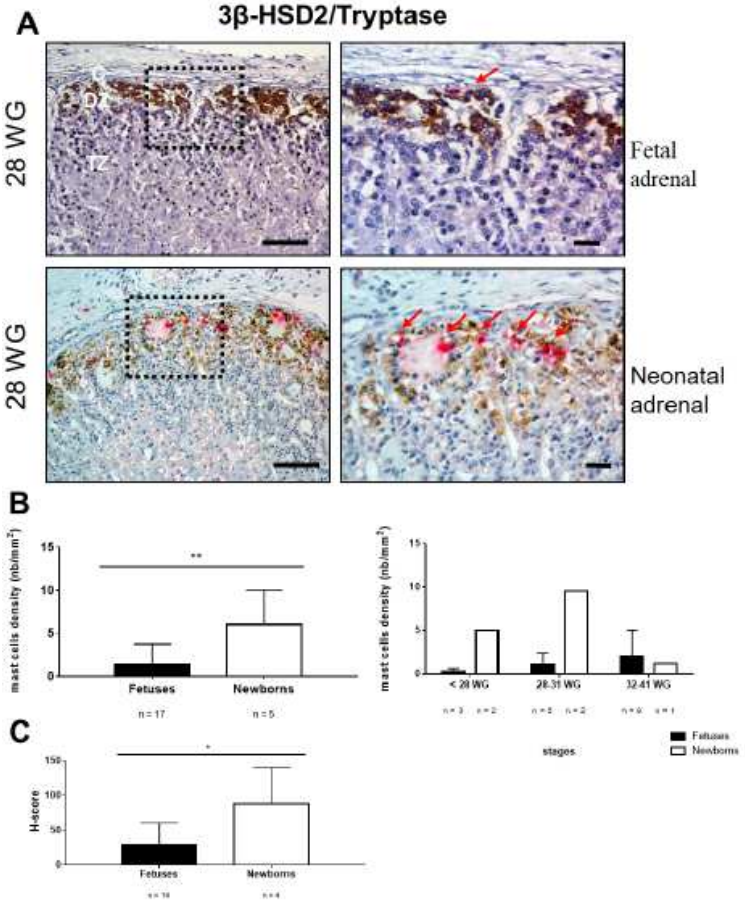


Fig. 1 Distribution of mast cells in the human fetal and neonatal adrenal gland.
(A) Detection of mast cells using tryptase antibody in the human fetal and neonatal adrenal gland at 28 WG. The number of tryptase-positive cells (arrows) is greater in the neonatal gland versus the fetal gland at similar term. The scale bar represents 50 µm on the left column and 10 µm on the right column. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ : Transitional Zone. (B) Mast cell density in fetal and neonatal adrenal glands. Tryptase immunoreactive cells density (nb/mm²) in the 3βHSD-positive area in human fetal and neonatal adrenal gland (C) H-score of CYP11B2 labeling compared between fetal and neonatal adrenal glands, at all stages. For each gestational age, "n" designates the number of tissues studied and the median value is indicated by the horizontal bar.

II. Voie sérotoninergique

Pour déterminer si les mastocytes surrénaliens foetaux sont capables de produire de la 5-HT, une immunohistochimie TPH1 a été réalisée. De manière surprenante, l'immunoréactivité de type TPH1 n'était pas limitée aux mastocytes mais était également détectée dans les cellules stéroïdogènes de la zone définitive dans la surrénale foetale. Un profil similaire a été observé dans la surrénale néonatale (Fig. 2A). L'expression du récepteur 5-HT4 était retrouvée dans l'ensemble des zones de la surrénale foetale humaine avec une prédominance dans la zone définitive, aussi bien dans la surrénale foetale que dans la surrénale néonatale (Fig. 2B).

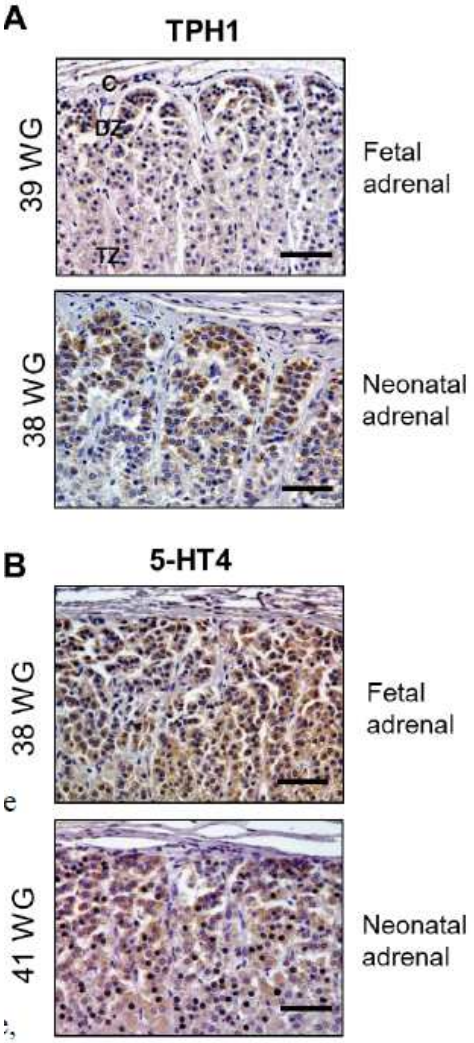


Fig. 2 TPH1 expression in the human fetal and neonatal adrenal gland.
(A) TPH1 immunoreactivity and (B) 5-HT4 immunoreactivity compared between fetal and neonatal adrenal glands. The scale bar represents 50 µm. C: Capsule, DZ: Definitive Zone, TZ : Transitional Zone.

Au total, nos résultats suggèrent un rôle des mastocytes dans l'adaptation à la vie extra-utérine via un contrôle paracrine de la sécrétion d'aldostérone, notamment en cas de grande prématurité, période où le rein est particulièrement sensible à l'aldostérone. Le rôle des acteurs de la voie sérotoninergique, surexprimés dans la surrénale fœtale, reste en revanche à préciser.

Bourse de Recherche en Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2016 (32 K€)

Mlle Clémence DELCOUR
Direction **Dr Isabelle BEAU**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Caractérisation de variants d'autophagie, nouveaux acteurs de la physiopathologie ovarienne.

Résumé

L'insuffisance ovarienne primaire (IOP) est un trouble fréquent qui affecte environ 1% des femmes de moins de 40 ans. L'IOP se caractérise par un épuisement prématuré des follicules ovariens associé à des taux plasmatiques élevés d'hormone folliculostimulante (FSH), et conduit à une infertilité chez la femme. Différentes étiologies ont été décrites dont des anomalies chromosomiques et des mutations de gènes mais dans la grande majorité des cas, aucune cause n'est identifiée pour expliquer l'IOP. Le but de notre travail était de caractériser sur le plan fonctionnel deux nouveaux variants de gènes d'ATG (AuTophagy-related Genes) identifiés chez deux patientes avec une IOP.

Nous avons ré-analysé, *in silico*, les données du séquençage de l'exome provenant d'un travail précédent réalisé sur 69 femmes non apparentées qui présentaient une IOP sans étiologie évidente. Nous avons étudié le retentissemaent fonctionnel de deux variants de gènes ATG, en utilisant la protéine LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3β), un marqueur classique de cette voie de dégradation lysosomale.

Nous avons mis en évidence un lien fonctionnel entre les variants d'*ATG7* et d'*ATG9A* et l'IOP. Nous avons démontré que les deux variants entraînaient une diminution de la biosynthèse des autophagosomes et, par conséquent, une altération de l'autophagie, un processus biologique clé impliqué dans la préservation des follicules primordiaux constituant la réserve ovarienne.

Nos résultats révèlent que l'altération de l'autophagie est un nouveau mécanisme physiopathologique impliqué dans l'IOP humaine.

Abstract

Primary ovarian insufficiency (POI) is a frequent disorder that affects ~1% of women under 40 years of age. POI, which is characterized by the premature depletion of ovarian follicles and elevated plasma levels of follicle-stimulating hormone (FSH), leads to infertility. Although various etiological factors have been described, including chromosomal abnormalities and gene variants, most cases remain idiopathic. The aim of our study was to identify and validate functionally new sequence variants in ATG (autophagy-related genes) leading to POI.

We have reanalyzed, in silico, the exome sequencing data from a previously reported work performed in 69 unrelated POI women. Functional experiments using a classical hallmark of autophagy, the microtubule-associated protein 1 light chain 3β (LC3), were then used to link these genes to this lysosomal degradation pathway.

We venture a functional link between ATG7 and ATG9A variants and POI. We demonstrated that variant ATG7 and ATG9A led to a decrease in autophagosome biosynthesis and consequently to an impairment of autophagy, a key biological process implicated in the preservation of the primordial follicles forming the ovarian reserve.

Our results unveil that impaired autophagy is a novel pathophysiological mechanism involved in human POI.

Publication

Delcour C, Amazit L, Patino LC, Magnin F, Fagart J, Delemer B, Young J, Laissue P, Binart N, Beau I. ATG7 and ATG9A loss-of-function variants trigger autophagy impairment and ovarian failure.

Genet. Med. 2019, 21(4): 930-938. doi: 10.1038/s41436-018-0287-y.

Communications

- **SFE 2017, 34ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Poitiers, France, octobre 11-14.** C. Delcour, LC Patiño, F. Magnin, L. Amazit, P. Laissue, J. Young, N. Binart et I. Beau.

  Première mise en cause de l'autophagie dans l'étiologie de l'insuffisance ovarienne primaire

- **Journées ReproSciences, 2019, Toulouse, France.** Beau I.

  Autophagie et ovaire : de nouveaux variants impliqués dans l'insuffisance ovarienne primaire

Rapport

Chez les mammifères, la folliculogenèse ovarienne est un phénomène complexe et continu, marqué par la succession de différentes étapes du développement du follicule, depuis le moment où il sort de la réserve ovarienne jusqu'à sa rupture lors de l'ovulation ou à son involution par atrésie. Une déplétion du stock folliculaire, un blocage dans l'une des étapes de maturation folliculaire, ou une atrésie folliculaire accélérée ont pour conséquence une insuffisance ovarienne primaire (IOP). Cette pathologie multifactorielle est caractérisée par une aménorrhée associée à une élévation des gonadotrophines. L'IOP est une pathologie fréquente puisqu'elle touche environ 1% des femmes avant l'âge de 40 ans. Elle peut survenir en période pré-pubertaire et s'accompagne d'une aménorrhée primaire. Elle peut aussi apparaitre plus tardivement au cours de la vie reproductive de la femme et se manifeste alors par une aménorrhée secondaire. L'hétérogénéité de l'IOP tient à la variété de ses causes et en dehors des anomalies du chromosome X (X-fragile, syndrome de Turner…), elle reste idiopathique dans plus de 80% des cas. Les différentes étiologies identifiées sont iatrogènes secondaires à la chimiothérapie et/ou la radiothérapie, auto-immunes, virales ou génétiques. Ces dix dernières années ont été marquées par une augmentation de la connaissance des étiologies génétiques.

Dans le cadre du séquençage de l'exome (Whole Exome Sequencing) d'une série de 69 patientes caucasiennes avec une insuffisance ovarienne primaire isolée, sans anomalie du caryotype ou du nombre de répétitions CGG dans le gène *FMR1*, nous avons identifié deux variants dans des gènes *ATG* (*AuTophagy related Gene*) impliqués dans l'autophagie. L'autophagie est un processus de dégradation lysosomale qui permet de contrôler l'homéostasie cellulaire.

Plusieurs études utilisant des modulateurs pharmacologiques de l'autophagie ont montré un effet sur la réserve ovarienne des souris suggérant que l'autophagie pourrait être impliquée dans le développement folliculaire. Par ailleurs, les souris déficientes en autophagie ont une réduction voire une absence totale de cellules germinales. L'autophagie serait donc un mécanisme de survie des cellules germinales dans l'ovaire de souris. Récemment, un modèle de souris *Atg7*$^{-/-}$ invalidées spécifiquement dans l'ovaire montre que les femelles ne sont fertiles que pendant quelques semaines après l'apparition du cycle oestrien, mimant ainsi la pathologie chez la femme. Ces données suggèrent donc qu'un défaut d'autophagie pourrait expliquer certains cas d'IOP.

Les variants identifiés chez les deux patientes induisent le changement d'un acide aminé dans les protéines ATG7 et ATG9A qui sont directement impliquées dans la formation des autophagosomes. La fréquence de ces variants est faible dans la population générale et ils sont prédits délétères par différents logiciels de prédiction.

Nous avons étudié le retentissement fonctionnel de ces mutations sur le processus autophagique dans des cellules transfectées transitoirement avec des vecteurs d'expression

contenant les ADNc d'ATG7 ou ATG9 sauvages ou mutés. Nous avons montré que les mutations n'affectent pas l'expression des protéines ni leur localisation cellulaire.

Une analyse quantitative en microscopie à haut débit a permis de montrer que les cellules exprimant les variants des protéines ATG7 et ATG9 présentent une diminution du nombre d'autophagosomes comparé à celles qui expriment les protéines sauvages. L'évaluation par des tests fonctionnels de l'activité des deux variants ATG7 et ATG9A montre que dans des conditions où l'autophagie est induite (par carence nutritionnelle par exemple), les cellules qui expriment ces variants présentent une diminution de la biosynthèse des autophagosomes donc un défaut d'autophagie.

En conclusion, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, une association entre des variants délétères pour l'autophagie et l'IOP (9). Ces résultats sont appuyés par le phénotype des souris invalidées pour le gène *Atg7* dans l'ovocyte qui présentent une diminution du nombre de follicules antraux et en croissance à 6 mois de vie (8). Le mécanisme qui lie le maintien du stock de follicules primordiaux, le contrôle de leur entrée en croissance et l'autophagie reste encore à caractériser. Une autophagie intègre semble cependant indispensable au maintien du stock de follicules primordiaux en quiescence. Cette étude qui a conduit à l'identification de nouveaux gènes a aussi permis d'élargir le champ d'investigation des causes génétiques de l'IOP.

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2016 (30 K€)

Dr Philippe BERTOLINO

INSERM U 1052 - Equipe : Tumour Environment & Pituitary Oncology, Cancer Research Center-Lyon (CRCL), LYON

Etude des mécanismes de régulation et des fonctions du récepteur ALK7 dans la progression tumorale et l'agressivité des Prolactinomes.

Résumé

Les prolactinomes représentent les tumeurs hypophysaires hormono-dépendantes les plus fréquentes. Elles sont souvant bénigne mais peuvent devenir agressives/envahissantes via des mécanismes inconnus. La découverte de marqueurs est donc essentielle pour développer de nouvelles stratégies diagnostiques/pronostiques. Les membres des voies de signalisation TGFβ-Activine/BMP constituent des acteurs importants du/des développement/fonctions adultes hypophysaires, mais leurs rôles dans la tumorigénèse de l'hypophyse restent mal définis. Grâce à un modèle d'allogreffe dérivé d'un prolactinome de rat, nous rapportons que le récepteur des activines ALK7 est exprimé dans les cellules de prolactinomes alors qu'il est absent des cellules saines productrices de prolactine. La validation de ces observations sur une série de tumeurs humaines confirme que l'expression d'ALK7 est également induite chez l'Homme. Nos résultats soulignent que les tumeurs exprimant fortement d'ALK7 présentent un index Ki67 de prolifération accrue, un résultat confirmé par l'analyse rétrospective des données cliniques de 38 patients. Ces observations suggèrent l'utilisation d'ALK7 comme un nouveau marqueur candidat de l'agressivité des prolactinomes. Au-delà de ces observations, nos travaux révèlent que l'expression du récepteur ALK7 est retrouvée dans une fraction importante de cellules présentant une expression réduite de prolactine suggérant son implication dans le contrôle de la production de cette hormone. Un résultat confirmé par l'identification d'une sous population de cellules tumorales n'exprimant pas ALK7 et étant fortement immuno-réactives pour la prolactine. Dans leur ensemble, nos observations suggèrent que la signalisation des activines médiée par ALK7 pourrait donc contribuer à l'hétérogénéité hormonale et à la prolifération accrue des prolactinomes.

Abstract

Prolactinoma represents the most frequent hormone-secreting pituitary tumours. These tumours appear in a benign form, but some of them can reach an invasive and aggressive stage through an unknown mechanism. Discovering markers to identify prolactinoma proliferative and invading character is therefore crucial to develop new diagnostic/prognostic strategies. Interestingly, members of the TGFβ-Activin/BMP signalling pathways have emerged as important actors of pituitary development and adult function, but their role in prolactinomas remains to be precisely determined. Here, using a heterotopic allograft model derived from a rat prolactinoma, we report that the Activins orphan type I receptor ALK7 is ectopically expressed in prolactinomas-cells. Through immunohistological approaches, we further confirm that normal prolactin- producing cells lack ALK7-expression. Using a series of human tumour samples, we show that ALK7 expression in prolactinomas cells is evolutionary conserved between rat and human. More interestingly, our results highlight that tumours showing a robust expression of ALK7 present an increased proliferation as address by Ki67 expression and retrospective analysis of clinical data from 38 patients, presenting ALK7 as an appealing marker of prolactinoma aggressiveness. Beside this observation, our work pinpoints that the expression of prolactin is highly heterogeneous in prolactinoma cells. We further confirm the contribution of ALK7 in these observations and the existence of highly immunoreactive prolactin cells lacking ALK7 expression. Taken together, our observations suggest that Activin signalling mediated through ALK7 could therefore contribute to the hormonal heterogeneity and increased proliferation of prolactinomas.

Publications

Principe M, Chanal M, Karam V, Wierinckx A, Mikaélian I, Gadet R, Auger C, Raverot V, Jouanneau E, Vasiljevic A, Hennino A, Raverot G, Bertolino P. ALK7 expression in prolactinoma is associated with reduced Prolactin and increased proliferation.
Endocr Relat Cancer. 2018 Sep;25(9):795-806.

Principe M, Chanal M, Karam V, Wierinckx A, Mikaélian I, Gadet R, Auger C, Raverot V, Jouanneau E, Vasiljevic A, Hennino A, Raverot G, Bertolino P. L'expression d'ALK7 dans le prolactinome est associée à une réduction de la prolactine et à une prolifération accrue.
Annales d'Endocrinologie, Sept. 2018, 79(4):321.

Communications

- **ECE 2019, 21st European Congress of Endocrinology. 2019.** Ilie MD, Vasiljevic A, Raverot G, Bertolino P.
The microenvironment of pituitary neuroendocrine tumors: focus on folliculostellate cells (Oral comm).

- **ECE 2019, 21st European Congress of Endocrinology 2019.** Principe M, Chanal M, Ilie MD, Vasiljevic A, Jouanneau E, Hennino A, Raverot G and Bertolino P.
Infiltrating CD68+/CD163+ macrophages regulate Gonadotroph-tumour invasion through collagen remodelling (Poster).

- **ECE 2019, 21st European Congress of Endocrinology 2019**. Mirela Diana Ilie, Marie Chanal, Moitza Principe, Nicolas Gadot, Alexandre Vasiljevic, Emmanuel Jouanneau, Gérald Raverot, Philippe Bertolino.
Characterizing the microenvironment of pituitary neuroendocrine tumours, new approaches and tools to explore the function and contribution of folliculostellate cells (Poster).

- **Club de L'hypophyse 2018, Paris, France.** Bertolino P (invited speaker).
Identification du récepteur ALK7 comme marqueur et acteur de la biologie des prolactinomes (Oral comm).

- **SFE 2018, 35ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, France, septembre 12-15.** Principe M, Chanal M, Karam V, Wierinckx A, Mikaélian I, Gadet R, Auger C, Raverot V, Jouanneau E, Vasiljevic A, Hennino A, Raverot G, Bertolino P.
L'expression d'ALK7 dans le prolactinome est associée à une réduction de la prolactine et à une prolifération accrue (Poster).

- **European Congress of Immunology (ECI) 2018, September 2-5, 2018, Amsterdam, Netherlands.** Principe M, Chanal M, Vasiljevic A, Jouanneau E, Hennino A, Raverot G and Bertolino P.
Deciphering the role of Macrophages in pituitary tumours development (Poster).

- **EACR Conference "Defense is the best attack: Immuno-Oncology Breakthroughs", October 09-11, 2017, Barcelona, Spain.** Principe M, Chanal M, Vasiljevic A, Jouanneau E, Hennino A, Raverot G and Bertolino P.
Immune cell landscape in Pituitary tumours microenvironment (Poster).

- **3rd International Cancer Symposium Cancer Research Center of Lyon (CRCL), September 25-27, 2017, Lyon, France.** Principe M, Chanal M, Vasiljevic A, Jouanneau E, Hennino A, Raverot G and Bertolino P.
Immune cell landscape in Pituitary tumours microenvironment (Poster).

- **3rd International Cancer Symposium Cancer Research Center of Lyon (CRCL), September 25-27, 2017, Lyon, France.** Fomekong F, Principe M, Chanal M, Vasiljevic A, Hennino A, Jouanneau E, Bertolino P and Raverot G.
Systematic Establishment and characterization of primary cell culture derived from pituitary adenomas (Poster).

OBJECTIFS

Les adénomes hypophysaires ont une incidence proche de 15,5/million/an et une prévalence estimée de 0,02 à 0,1 %. Ces lésions se développent à partir d'un des cinq types cellulaires qui composent l'antéhypophyse. On retrouve par fréquence les prolactinomes (PRL, 40%), les adénomes gonadotropes (LH et/ou FSH, 30%), les adénomes somatotropes (GH, 25%), les adénomes corticotropes (10%) et enfin les rares adénomes thyréotropes. La diversité cellulaire, fonctionnelle et l'évolution difficile à prédire de ces tumeurs rendent leurs analyses et leurs traitements complexes, ce qui explique que malgré de nombreuses études, les mécanismes moléculaires associés à l'agressivité tumorale restent indéterminés.

Les travaux de notre équipe visent à mieux comprendre ces tumeurs au travers de leur cartographie génétique et fonctionnelle afin d'identifier et d'étudier la fonction de nouveaux marqueurs moléculaires a visé thérapeutique. A la soumission de notre demande de financement à la SFE, nos recherches avaient déjà pointé le récepteur ALK7 de la famille TGFb comme un candidat intéressant dans les tumeurs produisant la prolactine.

Les objectifs de notre projet visaient donc à déterminer l'importance du récepteur ALK7 dans les prolactinomes et étudier l'impact de son expression sur la fonctionnalité/agressivité de ces tumeurs.

METHODE ET RESULTATS

I- Etude fonctionnelle du rôle d'ALK7 dans les prolactinomes :

Le rôle d'ALK7 et de sa signalisation dans la biologie et l'agressivité des prolactinomes, a été étudié sur le modèle de greffe SMtTW (Prolactinome de rat maintenu par greffes sériées). Nous avons confirmé la phosphorylation spécifique des effecteur Smad2, Smad3 en aval de la signalisation des ligands TGFb/Activins et et l'absence de l'activation de Smad1 en aval des BMPs. Ces analyses réalisées nous ont permis de confirmer l'importance des voies Activin/TGFb dans les tumeurs lactotropes SmtTW. Nos données chez le rat ont donc confirmé qu'Alk7 est, comme chez l'homme, fortement présent dans les prolactinomes SmtTW alors que son expression est absente des cellules saines.

Nous avons identifié une corrélation entre niveau d'expression d'ALK7 et l'agressivité accrue qui apparait au fil des passages de xénogreffes et mis en évidence que les mécanismes régulant l'expression du gène *Acvr1c* (codant pour ALK7) impliquaient le complexe Polycomb (PRC2) et le remodelage des marques H3K27me3 inhibitrice sur son locus.

II- Validation du potentielle clinique d'ALK7 pour les prolactinomes :

Des travaux complémentaires réalisés sur 37 nouvelles biopsies (19 Prolactinomes, 5 tumeurs somatotropres, 7 tumeurs corticotropes et 6 tumeurs gonadotropes) nous ont permis de confirmer que 36% des prolactinomes testés (7/19) exprimaient ALK7. Des travaux immuno-histologiques sur des tissus humains nous ont également permis de préciser la localisation d'ALK7 et de confirmer que l'expression d'ALK7 qui est absente des cellules lactotropes saines était fortement induite au cours de leur tumorigénèse. Nous avons également pu confirmer par double IF que 40% des prolactinomes de patients exprimaient des niveau élevés d'ALK7 (4/10 échantillons testés). En parallèle, des études de corrélation entre les données cliniques (sexe, ki67, invasion, …) et les taux d'expression d'ALK7 nous ont conduit à identifier un lien entre le taux d'ALK7 exprimé et la capacité proliératrice des prolactinomes testés.

Pour mieux comprendre le rôle d'ALK7, un étude bio-informatique (Ingenuity), nous a permis de comparer différents critères d'expression d'ALK7 chez les patients. Bien que ces données soient encore en cours d'analyses, elles pointent une série de gènes cibles spécifiquement associée à l'expression d'ALK7 dans les prolactinomes de patients.

Nous sommes actuellement en train de teste la validité de ces analyses. Enfin, la faisabilité d'utiliser l'expression d'ALK7 comme un outil de diagnostic histologique. Le phénotypage de lésions a été validé sur automate Ventana en collaboration avec le service d'anatomopathologie

des Hospices Civils de Lyon. Les résultats obtenus sont actuellement analysés en détails afin de mieux évaluer l'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression d'ALK7.

III- Evaluation thérapeutique de molécules bloquant ALK7 :

Une série 4 Anticorps bloquant l'ActivinB, le ligand d'ALK7 a été développer en collabortion avec un partenaire Européen. Nous devrions rapidement les tester *in vitro* sur nos lignées avant d'évaluer leur impact sur le modèle de greffe de prolatinomes de rat SmtTW qui expriment fortement ALK7.

IV- Identification de nouveaux marqueurs :

Signalons que les travaux financés par le Prix PFIZER nous a également permis (en parallèle d'ALK7), d'identifier 5 autres nouveaux biomarqueurs et cibles cliniques : le récepteur de type2 a l'AMH (AMHRII) dans les tumeurs gonadopes (29/34) et le récepteur de type2 des Activins (ActrIIA) dans les tumeurs non fonctionnelles agressives (Etude croisé transcriptomique). Nous avons également identifié l'AMH dans les tumeurs gonadotropes (13/34), ainsi que 2 molécules inhibitrice de la signalisation des Activins : Follistatin (FST) dans les tumeurs Corticotropes (10/11) et Follistatin Like 3 (FSTL3) dans les tumeurs non fonctionnelles agressives. L'étude fonctionnelle de ces molécules devraient nous permettre de mieux comprendre la complexité des voies de signalisation TGFb/BMP dans la tumorigenese hypophysaires.

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 ans) SFE 2016 (50 K€)

Pr Frédéric CASTINETTI

Service d'Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques, CHU de la Conception, MARSEILLE

OPTO_GH.

Résumé

La prise en charge des déficits hypophysaires est souvent peu physiologique. Une substitution optimale pourrait être basée sur la greffe de cellules hypophysaires dérivées de cellules souches induites pluripotentes. La question de la greffe pose cependant le problème de l'accessibilité de ces cellules à l'influx hypothalamique, nécessaire à l'obtention d'une sécrétion hormonale appropriée. L'objectif de ce travail est de produire un récepteur couplé rhodopsine/GHRH, de l'intégrer via une technique Crispr-Cas9 dans le génome de cellules iPS, et de les différencier en cellules somatotropes. Les données préliminaires ont permis de caractériser ce récepteur, et des travaux sont actuellement en cours pour déterminer son effet dans des cellules GH3 et GH4C1 transfectées.

Abstract

The management of pituitary deficiencies remain far from physiology. An optimal treatment could be to use grafted pituitary cells derived from induced pluripotent stem cells. This however raises the issue of the way to control the secretion of these cells in terms of hypothalamic inputs (depending on the area of grafting, these stimuli might indeed be absent). The aim of this work is to produce a chimeric coupled Rhodopsin/GHRH receptor, integrate it to iPS via Crispr-Cas9 techniques, and differentiate these cells into somatotroph cells. This should allow to get cells in which GH secretion would be under the control of light. Work is ongoing to determine whether this generated chimeric receptor is able give expected results in GH3 and GH4C1 cells.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

INTRODUCTION ET RATIONNEL DE L'ETUDE

Les déficits hypophysaires nécessitent un traitement substitutif prolongé ou permanent. Ce traitement ne reproduit pas nécessairement le rythme physiologique sécrétoire, ce qui occasionne des comorbidités et une altération de la qualité de vie. Un traitement idéal pourrait être représenté par l'utilisation de cellules souches différenciées en cellules hypophysaires.

Ce modèle de greffe nécessiterait cependant une régulation physiologique par des influx hypothalamiques ou un mécanisme de régulation exogène. L'objectif de ce projet est de réaliser une étude preuve de concept à 2 niveaux en combinant des approches de différenciation de cellules souches induites pluripotentes (iPS), d'optogénétique et d'édition du génome.

PREMIERS RESULTATS

La première partie consistait à produire et caractériser un récepteur chimère rhodopsine-GHRH récepteur en remplaçant les boucles intracellulaires de la rhodopsine par celles du récepteur de la GHRH. Nous avons d'abord déterminé les séquences potentielles de l'Opto- GHRHR. L'alignement de séquences du GHRHR et de récepteurs les plus proches dans l'arbre phylogénétique (récepteurs du Glucagon et du CRH) a permis de déterminer quels résidus dans les boucles intracellulaires sont vraisemblablement cruciaux pour la transduction du signal. La conservation partielle de la 2e boucle intracellulaire de la Rhodopsine semble toutefois importante pour maintenir la conformation globale du récepteur.

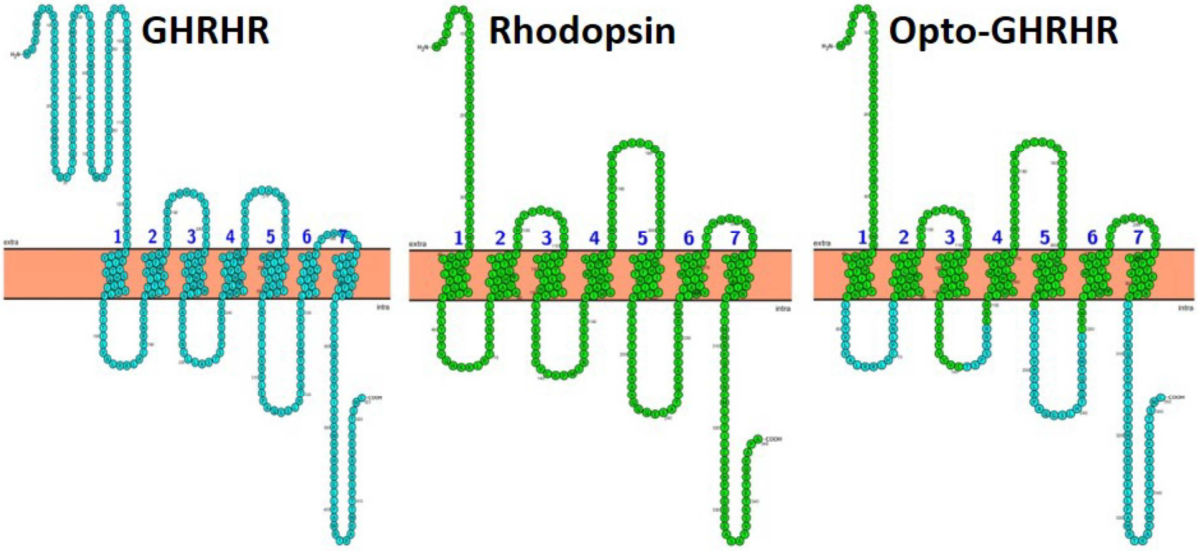


Figure 1 : modèle théorique du récepteur Opto-GHRHR. Dans ce modèle, les domaines intramembranaires et extracellulaires, ainsi que les 10 premiers résidus de la 2e boucle intra-cellulaire de la rhodopsine sont conservés (vert). Les parties intracellulaires sont essentiellement issues du GHRHR (bleu)

Nous avons ensuite réalisé des modèles 3D, afin de vérifier la structure globale du récepteur, et notamment que le positionnement des hélices transmembranaires, n'est pas modifié par le changement des boucles intracellulaires (figure 2). La modélisation du site de liaison de la rhodopsine ne semble que très peu impacté.

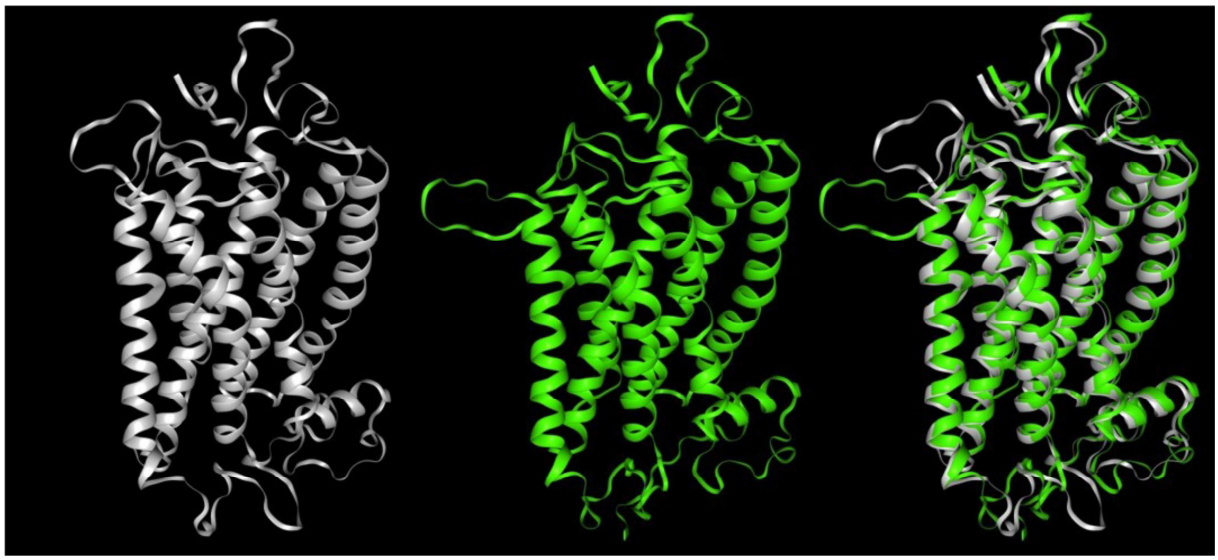


Figure 2 : La superposition (droite ; vert et gris) des modèles 3D de la rhodopsine (gauche, gris) et de l'Opto- GHRHR (centre, vert), suggère que le positionnement des hélices transmembranaires n'est pas affecté

Nous avons fait synthétiser le cDNA codant pour la séquence du Opto-GHRHR, et l'avons inséré dans un vecteur d'expression pRK5-HA. La séquence codant pour la protéine fluorescente td-Tomato a également été insérée en 3' afin que l'Opto-GHRHR dispose d'un rapporteur fluorescent lié à sa queue C-terminale.

Simultanément, nous avons développé des outils nous permettant de réaliser l'étude fonctionnelle de l'Opto-GHRHR. Celui-ci devrait activer la voie des protéines Gs. Nous avons donc généré des lignées de cellules HEK293T exprimant de manière stable un rapporteur bioluminescent de la concentration en cAMP (GloSensor™ ; Promega). Les essais de transfection par électroporation (Neon system, Invitrogen) ont montré que le récepteur a un effet toxique sur les cellules HEK293T, et conduit à une forte mort cellulaire. En revanche, des expériences préliminaires dans les cellules GH3 et GH4C1 indiquent que le récepteur est bien exprimé et bien adressé à la membrane. Nous sommes donc en train d'essayer d'obtenir des lignées GH3 et GH4C1 exprimant de manière stable le GloSensor™.

Les dosages de GH par la techniques ELISA ont été mis au point, et nous permettront de confirmer que la lumière visible devrait pouvoir stimuler la production de GH (sans GHRH). Nous serons donc prochainement en mesure de savoir si les cellules exprimant l'Opto-GHRHR répondent à un stimulus lumineux par une augmentation de la concentration intracellulaire en cAMP et par une sécrétion de GH. Nous vérifierons également par RT-qPCR les variations éventuelles dans l'expression de POU1F, GH et GHRHR, gènes dont on sait qu'ils sont la cible directe de l'action du GHRH.

PERSPECTIVES

Si les résultats de ces expériences s'avèrent être négatifs, nous disposons déjà d'autres séquences possibles pour l'Opto-GHRHR. Dans une deuxième partie, par une technique d'édition CRISPR-CAS9, nous intègrerons ce récepteur dans des cellules iPS, que nous différencierons ensuite en cellules somatotropes. Nous avons généré un modèle de différenciation de cellules iPS en cellules hypophysaires, en particulier somatotropes. Ces cellules seront greffées dans la capsule rénale de souris little, présentant une mutation spontanée du récepteur de GHRH et une absence de GHRH fonctionnelle, pour étudier si nous pouvons restaurer une croissance normale grâce à une stimulation lumineuse du récepteur.

Bourse de « Master » (1 an) SFE 2016 (32 K€)

Mme Valentine COURANT SUTEAU
Direction **Pr Patrice RODIEN**
INSERM UMR 1083 - CNRS 6214 - Biologie neuro-vasculaire et mitochondriale intégrée, Université d'ANGERS

Action des perturbateurs endocriniens sur le récepteur de l'INSL3 (RXFP2).

Résumé

Objectif : Caractériser l'implication de RXFP2 dans le mode d'action de trois perturbateurs endocriniens : les phtalates DEHP et DBP ainsi que le Bisphénol A (BPA).

Méthodes : Pour étudier l'impact des perturbateurs endocriniens sur RXFP2, des cellules HEK293 ont été transfectées de manière transitoire avec RXFP2 et l'activité du récepteur a été analysée en quantifiant la production d'AMPc intracellulaire.

Résultats : Seul, le DEHP à une concentration comprise entre 10-9M et 10-7M augmentait l'action de l'INSL3 à 10-6M) d'environ 25%. De la même manière, le DBP entre 10-8 et 10-5M et le BPA entre 10-11 et 10-9M potentialisaient la réponse à l'hormone à 10-9M de 15-35% et 10-25%, respectivement. Cet effet était spécifique de RXFP2. En cocktails ternaires, ils inhibaient la réponse à l'INSL3.

Conclusion : Ces résultats montrent pour la première fois qu'un mélange de phtalates et de BPA peut perturber l'activité du récepteur RXFP2 aux concentrations retrouvées dans les liquides biologiques. De plus, les effets antagonistes de ce mélange n'étaient pas retrouvés pour les substances individuellement.

Abstract

Aim: To characterize the involvement of RXFP2 in the effects of three endocrine disruptors: phthalates DEHP and DBP, and bisphenol A (BPA).

Methods: To investigate the impact of endocrine disruptors on RXFP2, HEK293 cells were transiently transfected with RXFP2 and receptor activity was analyzed by measuring intracellular cAMP production.

Results: Alone, DEHP at concentrations between 10-9M and 10-7M increased the action of 10-6M INSL3 by 25%. In the same way, DBP between 10-8 and 10-5M and BPA between 10-11 and 10-9M potentiated the response to the hormone by 15-35% and 10-25% respectively. This effect was specific to RXFP2. In ternary cocktails, they inhibited the INSL3-response.

Conclusion: These findings demonstrate for the first time that mixture of phthalates and BPA can disturb the RXFP2 activity at concentrations reported in human fluids. Moreover, the antagonist effects of the mixture were no observed with individual compounds.

Publication

Environmental Health Perspectives : Article en cours de soumission.

Communications

- **SFE 2018, 35ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, France, septembre 12-15** : Communication orale.
- **ECE 2019, 21th European Congress of Endocrinology, Lyon, France, may 18-21** : Poster.

OBJECTIFS

Des études épidémiologiques et expérimentales in vivo mettent en évidence des effets reprotoxiques des perturbateurs endocriniens (PE) (malformations des organes génitaux, infertilité…) en particulier les phtalates DBP et DEHP ainsi que le bisphénol A (BPA). Nous savons aujourd'hui que le développement fœtal du testicule implique la voie de signalisation INSL3/RXFP2. Or, il a été retrouvé une association inverse entre la concentration plasmatique du DEHP, du DBP ou du BPA et celle de l'hormone INSL3 chez l'homme. A ce jour, aucune donnée n'est disponible sur l'impact de ces PE sur la signalisation d'INSL3. Le récepteur de cette hormone sexuelle est RXFP2, un récepteur couplé aux protéines G. L'équipe dans laquelle j'ai réalisé mon master 2 a déjà montré que le BPA diminuait l'activité du récepteur de la FSH, un autre récepteur couplé aux protéines G (Munier et al. 2016). L'objectif de mon master 2 a donc été de comprendre les mécanismes moléculaires du BPA et des phtalates DEHP et DBP sur l'activité de RXFP2 de façon individuelle et combinée.

RESULTATS

I- Effets individuels du DEHP, DBP et BPA sur l'activité de RXFP2

Afin d'étudier les effets des PE sur l'activité du récepteur, nous avons utilisé un système d'expression hétérologue où RXFP2 humain était surexprimé dans des cellules HEK293. Ce modèle a été choisi afin d'identifier un potentiel effet sur le récepteur de façon indépendante des autres mécanismes d'action de ces PE. RXFP2 étant un récepteur couplé à la voie Gs, l'activité du récepteur a été analysée en mesurant la production d'AMPc intracellulaire (bioluminescence sur cellules vivantes).

Nous avons tout d'abord vérifié que les différents PE testés n'induisaient pas de toxicité cellulaire (test MTT).

Les PE ont ensuite été testés de façon individuelle dans des gammes de concentrations retrouvées dans le liquide amniotique. La production d'AMPc stimulée par l'INSL3 a été testée à deux concentrations (10-6 et 10-9M). Le DEHP à une concentration comprise entre 10-9M et 10-7M augmentait l'action de l'INSL3 d'environ 25% pour une concentration maximale de 10-6M mais sans avoir d'effet à 10-9M. Au contraire, le DBP et le BPA n'avaient pas ou très peu d'effets à 10-6M d'INSL3 mais potentialisaient la réponse à l'hormone à 10-9M de 15-35% pour le DBP (concentration comprise entre 10-8 et 10-5M) et de 10-25% pour le BPA (concentration comprise entre 10-11 et 10-9M).

Nous avons ensuite vérifié que cet effet était bien spécifique de RXFP2 car ils n'induisaient pas d'effet sur des cellules HEK293 non transfectées et ils ne modulaient pas l'activité de l'adénylate cyclase (synthèse AMPc) ou des phosphodiestérases (dégradation AMPc).

Pour conclure, chaque composé testé individuellement potentialise la réponse de RXFP2 à l'INSL3.

II- Effets combinés du DEHP, DBP et BPA sur l'activité de RXFP2

Nous avons choisi de tester les mélanges de ces trois PE en cocktails binaires et ternaires. Ces mélanges ont été testés à trois concentrations 0.1X, 1X, 10X, où la concentration 1X correspondait à la concentration moyenne de chaque PE dans le liquide amniotique humain (10-7M pour le DEHP et le DBP, 10-9M pour le BPA).

Les effets des différents mélanges sur l'activité de RXFP2 étaient variables. Le mélange DEHP+DBP augmentait l'activité du récepteur en condition basale et en présence d'INSL3 à 10-6M. Le mélange DBP+BPA n'avait un effet positif que sur l'activité basale. Au contraire, le mélange DEHP+BPA diminuait l'activité de RXFP2 en présence d'INSL3 à 10-9M. Enfin et de manière très intéressante, le mélange ternaire entrainait également une diminution de la réponse du récepteur à son propre ligand.

Un modèle de prédiction a enfin été utilisé pour comparer les effets prédits (selon un modèle supposé additif) et les effets observés. Cette approche nous a permis de montrer que le mélange

ternaire semblait avoir un effet antagoniste sur l'activité basale de RXFP2 et en présence d'INSL3 à 10-9M.

Ainsi, la combinaison de ces trois PE diminue la réponse de RXFP2 à l'INSL3.

CONCLUSION

Alors que les études se sont toujours intéressées à l'impact du DEHP, DBP et BPA sur l'INSL3, ce travail a permis, pour la première fois, de tester l'impact de ces PE sur le récepteur RXFP2. Ces résultats suggèrent donc que RXFP2, comme d'autres récepteurs couplés aux protéines G, peut être impliqué dans le mode d'action des PE.

Un des points importants de ce travail est la différence des effets observés entre les composés pris de manière individuelle et en mélange montrant l'importance de ne pas réduire l'étude des PE, un par un, mais bien d'étudier l'effet cocktail de ces substances.

De manière intéressante, les effets observés ont été retrouvés à des concentrations comparables à celles dosées dans les liquides biologiques montrant ainsi la pertinence in vivo de ces résultats. Ainsi, en association avec les effets anti-androgéniques connus, le mélange DEHP+DBP+BPA via une diminution de l'activité de RXFP2 en réponse à une faible concentration d'INSL3 pourrait participer aux effets reprotoxiques et en particulier à l'augmentation de l'incidence de la cryptorchidie chez l'homme.

Bourse de Fin de Thèse (6 mois) SFE 2016 (22 K€)

Dr Romain TEINTURIER
Direction **Dr Chang Xian ZHANG**
INSERM U 1052, Centre de Recherche en Cancérologie de LYON (Crcl)

Activation différentielle des effecteurs de la voie de signalisation mTOR dans les différents types de tumeurs neuroendocrines pancréatiques.

Résumé

La mise en évidence de l'activation différentielle de la voie mTORC1 entre les insulinomes et les glucagonomes pourrait être une des explications au succès partiel de l'everolimus dans le traitement des PanNETs, ouvrant la porte à des alternatives thérapeutiques. Basée sur des outils solides, comme notre modèle murin Men1F/F-Ptf1aCre et la disponibilité des échantillons de PanNETs humaines, nous avons pu confirmer les résultats préliminaires, et élargir notre champ d'investigation sur la perturbation des événements en aval de la voie mTORC1. Parmi ces facteurs, l'interaction entre eiF4E et eiF4G d'une part, et eiF4A et eiF4G d'autre part pourrait être décisive pour la prolifération cellulaire et la progression tumorale des cellules endocrines pancréatiques. Notre étude a pu donner des indices importants pour savoir si la dérégulation de ménine et de la voie AKT/mTOR pourrait affecter ces facteurs et comment. Nos travaux permettront de mieux comprendre les événements en aval de la voie mTOR, afin de proposer des alternatives thérapeutiques dans le traitement des PanNETs.

Abstract

The demonstration of the differential activation of the mTORC1 pathway between insulinomes and glucagonomers could be one of the explanations for the partial success of everolimus in the treatment of PanNETs, opening the door to therapeutic alternatives. Based on solid tools, such as our mouse model Men1F/F-Ptf1aCre and the availability of human PanNET samples, we were able to confirm the preliminary results, and expand our field of investigation on the perturbation of events downstream of the mTORC1 pathway. Among these factors, the interaction between eiF4E and eiF4G on the one hand, and eiF4A and eiF4G on the other hand could be decisive for cell proliferation of pancreatic endocrine cells and tumor progression. Our study was able to obtain important clues as to whether deregulation of menin and the AKT / mTOR pathway could affect these factors and how. Our work will be of help to better understand the downstream events of the mTOR pathway, in order to propose therapeutic alternatives in the treatment of PanNETs.

Publication

Bonnavion R, Teinturier R, Gherardi S, Leteurtre E, Yu R, Cordier-Bussat M, Du R, Pattou F, Vantyghem MC, Bertolino P, Lu J, Zhang CX. Foxa2, a novel protein partner of the tumour suppressor menin, is deregulated in mouse and human MEN1 glucagonomas.
J Pathol. 2017 May; 242(1): 90-101.

I- Présentation du contexte et des objectifs du projet

Les tumeurs neuroendocrines pancréatiques (PanNETs) sont le deuxième type le plus fréquent de tumeurs malignes du pancréas. Parmi ces tumeurs, on retrouve notamment des PanNET nonfonctionnelles, insulinomes et des glucagonomes. Ces tumeurs peuvent survenir de manière sporadique, ou être associées à des syndromes héréditaires, comme le syndrome des Néoplasies Endocriniennes Multiple de type 1 (NEM1). Un des enjeux majeurs pour le traitement des PanNETs réside dans une meilleure compréhension des mécanismes d'activation de la voie de signalisation mTOR, connue pour être altérée dans une très large majorité des PanNETs. De nombreuses études cliniques utilisant l'everolimus, un inhibiteur de la voie mTORC1, ont montré des résultats prometteurs. Néanmoins l'efficacité de cette molécule reste à ce jour trop modeste, et la résistance développée chez les patients traités limite le succès de cet inhibiteur.

L'utilisation d'un modèle murin ayant une invalidation du gène Men1 dans les cellules endocrines pancréatiques, nous a permis de mettre en évidence une activation différentielle de la voie mTOR dans les différents types de PanNETs. Nos analyses révèlent une augmentation du niveau de phosphorylation de S6RP spécifiquement dans les glucagonomes, et à l'inverse, une diminution d'expression de 4EBP1 dans tous les insulinomes testés. Cela nous incite à mener une étude approfondie sur les évènements en aval de la voie mTOR dans différent types de PanNETs, liées ou non à l'inactivation du gène *MEN1*, afin d'identifier des indices pour concevoir des nouvelles stratégies thérapeutiques. Rappel des objectifs du projet :

- Validation de l'activation distincte de la voie mTORC1 dans les PanNETs humaines.
- Approfondir des données déjà acquises en utilisant les modèles cellulaires.
- Déterminer le niveau d'interaction entre eiF4e et eiF4G dans les insulinomes et les glucagonomes.

II- Résultats du projet

1. Confirmation de l'activation différentielle de la voie de signalisation mTORC1 dans de PanNETs.

Nous avons pu tout d'abord confirmer nos résultats concernant l'expression différentielle de pS6RP et 4EBP1 dans différents types d'îlot-tumeur chez des souris mutantes Ptf1a-Men1. En effet, en utilisant l'approche de triple IF, nous avons pu clairement démontrer que le niveau de phosphorylation de S6RP était augmenté uniquement dans les glucagonomes, et non dans les insulinomes. A l'inverse, le niveau de phosphorylation de 4EBP1 était diminué uniquement dans les insulinomes, et non dans les glucagonomes.

A la suite de ces résultats décrits ci-dessus, nous avons tenté d'effectuer les mêmes analyses sur les échantillons humains. Ces analyses nous ont permis de confirmer que l'expression différentielle des effecteurs en aval de mTORC1 est observée dans les différents types de contreparties humaines de PanNET.

2. Etude du niveau d'interaction parmi eiF4A, eiF4E et eiF4G dans les PanNETs humaines.

- Pour ce faire, nous disposons d'une large série de PanNETs sporadiques humaines, et plus d'une dizaine de PanNETs MEN1, sur lesquelles nous pourrons réaliser des PLA in situ. Nos résultats ont révélé que la présence du complexe eiF4E/4EBP1, jouant un rôle négatif dans la traduction, a diminué dans les insulinomes murins développés chez nos souris mutantes pour le gène *Men1*
- Nos analyses des interactions dans les différents types de PanNETs entre eiF4A et eiF4G d'une part, et eiF4E/eiF4G d'autre part ont pu montrer qu'il y une augmentation de la formation du complexe eiF4A/eiF4G spécifiquement dans les insulinomes, alors que le complexe eiF4E/eiF4G prédomine dans les glucagonomes. De façon très intéressante, nos données ont révélé également que la présence de ces deux complexes se varie dans les PanNETs de type non fonctionnel, corrélant très probablement l'origine soit de cellules b soit de cellules a de ces tumeurs, comme rapportée récemment dans la littérature.

3. L'utilisation de siRNA dirigé contre le gène Men1 dans les lignées cellulaires tumorales.

Pour établir un lien direct entre l'expression de menin et la dérégulation des facteurs cibles de la voie mTORC1, nous avons effectué des analyses sur l'expression de ces mêmes facteurs dans les lignées cellulaires issues des îlots pancréatiques. Comme le nombre de ces derniers sont limitées, nous avons également élargi nos analyses sur des lignées cellulaires établies des cancers hormonodépendants. Nos résultats ont montré qu'effectivement, une expression réduite de menin par Si-MEN1 conduit à la dérégulation des facteurs testés, comme l'augmentation de la phosphorylation de 4EBP1 dans les cellules Min6, et l'augmentation de la phosphorylation de S6K1 et S6RP dans les cellules MCF7, LNCaP et 22RV1, ainsi que la diminution de l'expression de 4EBP1 total dans ces trois lignées. L'ensemble d'analyse indique une activation de la voie mTORC1 suite à l'inactivation de ménine.

III- Difficultés rencontrées

Le projet de recherche soumis a été conçu pour une période d'un an. Etant donné que la bourse attribuée n'a été que pour 6 mois, le dernier objectif du projet, « Approche thérapeutique : inhibition de l'interaction eiF4e-eiF4G dans notre modèle murin *Men1F/F-Ptf1aCre* », n'a pas pu être étudié.

IV- Perspectives

Le progrès acquis dans la réalisation du projet jusqu'ici nous a permis d'avancer de façon solide le programme préalablement défini. Et surtout, nous avons pu décortiquer précisément l'altération des événements en aval de la voie mTORC1, notamment des facteurs jouant un rôle crucial dans le contrôle de l'initiation de la machinerie de traduction. Parmi ces facteurs, l'interaction entre eiF4E et eiF4G d'une part, et eiF4A et eiF4G d'autre part pourrait être décisive pour la prolifération cellulaire et la progression tumorale. Depuis peu, des inhibiteurs visant à bloquer l'interaction eiF4e-eiF4G, comme le 4GEI (2), ont été développés. Nous allons approfondir cette étude pour tenter de savoir comment la dérégulation de menin et de la voie AKT/mTOR pourrait affecter ces facteurs et comment. Les travaux réalisés pourraient permettre de renforcer et d'améliorer la recherche clinique ciblant la voie mTORC1.

Bourses SFE « Poitiers 2017 »

Bourse de Fin de thèse mutualisée (6 mois) H.A.C. Pharma & SFE 2017 (22 K€)

Dr Mickaël MATHIEU
Direction **Dr Pierre VAL**
CNRS UMR 6293, INSERM U 1103, Génétique Reproduction & Développement, Université Clermont Auvergne, CLERMONT-FERRAND

Etude des mécanismes de régulation et des fonctions du récepteur ALK7 dans la progression tumorale et l'agressivité des Prolactinomes.

Résumé

Le cortex surrénalien est en renouvellement cellulaire constant. Des cellules progénitrices situées dans la partie externe de la glande se différencient en cellules de la zone glomérulée, puis en cellules de la zone fasciculée après une conversion de lignage au cours de leur migration. Cette conversion est orchestrée via un équilibre entre l'activation des voies Wnt/β-caténine, imposant une identité glomérulée, et PKA, permettant une différenciation fasciculée. Nous avons pu démontrer le rôle original et inattendu du facteur épigénétique Ezh2 dans le contrôle de la voie de signalisation PKA, via la répression de l'expression d'inhibiteurs de cette voie comme les phosphodiestérases (PDE) et la sous-unité régulatrice Prkar1b. Nous avons également mis en évidence un phénomène naturel de dédifférenciation des cellules corticales qui retrouvent, suite à la perte progressive au cours du vieillissement de Ezh2, une identité progénitrice en exprimant des marqueurs adréno-gonadique tels que Gata4 et Wt1.

Abstract

The adrenal cortex is in constant cell renewal. Progenitor cells located in the outer layer of the gland differentiate into cells of the glomerulosa and then, after a lineage conversion during their migration, into cells of the zona fasciculata. This conversion is orchestrated via a balance between the activation of the Wnt/β-catenin pathways, imposing a glomerulosa identity, and PKA, allowing a fasciculata differentiation. We have been able to demonstrate the original and unexpected role of epigenetic factor Ezh2 in the control of the PKA signaling pathway, by repressing the expression of inhibitors of this pathway such as phosphodiesterases (PDE) and regulatory subunit Prkar1b. We have also demonstrated a natural phenomenon of dedifferentiation of cortical cells which, following the progressive loss of Ezh2 during aging, exhibit a progenitor-like identity by expressing adreno-gonadal markers such as Gata4 and Wt1.

Publication

Mathieu M et al. Steroidogenic differentiation and PKA signaling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 26; 115(52): E12265-E12274. doi: 10.1073/pnas.1809185115.

RESULTATS OBTENUS

Les surrénales sont des glandes endocrines permettant la réponse au stress de l'organisme. Alors que la medulla produit des catécholamines, la corticosurrénale sécrète des minéralocorticoïdes au niveau de la zone glomérulée, et des glucocorticoïdes grâce aux cellules de la zone fasciculée. Ces hormones sont notamment impliquées dans l'homéostasie hydrominérale, la réponse immunitaire et la maturation pulmonaire au cours de la vie foetale. Les insuffisances surrénaliennes peuvent donc être très délétère en absence de traitement. Pour maintenir l'intégrité tissulaire au cours de la vie et pour mieux répondre aux variations des besoins de l'organisme, le cortex surrénalien est en renouvellement cellulaire constant. Des expériences de lignage ont mis en évidence que ce renouvellement repose sur le recrutement de cellules progénitrices capsulaires et situées dans la partie externe du cortex. Lorsqu'ils sont mobilisés, ces progéniteurs se différencient en cellules de la zone glomérulée, qui vont alors migrer de façon centripète le long du cortex et se différencier en cellules de la zone fasciculée après une conversion de lignage, au cours de leur migration. Cette conversion de lignage est orchestrée via un équilibre entre l'activation des voies Wnt/β-caténine, imposant une identité glomérulée, et PKA, permettant une différenciation fasciculée. Les facteurs épigénétiques jouent de nombreux rôles essentiels, du développement embryonnaire jusqu'à la tumorigenèse, en passant par l'homéostasie des tissus. Nous avons montré que la méthyltransférase EZH2 était le facteur épigénétique le plus surexprimé dans les carcinomes corticosurrénaliens et que cette surexpression était associée à l'agressivité de ces cancers. EZH2 est la sous-unité catalytique du complexe multi-protéique PRC2 qui permet, entre autres, la répression de la transcription de ses gènes cibles en posant la marque H3K27me3. L'objectif de ma thèse a été d'identifier les potentiels rôles physiologiques de EZH2 dans la surrénale, qui n'avaient jusque là, jamais été recherchés.

En développant un modèle murin d'invalidation génétique de *Ezh2* dans le cortex surrénalien, dès l'émergence de l'ébauche surrénalienne au cours du développement embryonnaire, nous avons pu mettre en évidence une hypoplasie corticosurrénalienne, résultant d'une forte atrophie de la zone fasciculée, et associé à une insuffisance primaire en glucocorticoïdes. Nos analyses nous ont permis de démontrer le rôle original et inattendu de Ezh2 dans le contrôle de la voie de signalisation PKA, en réprimant l'expression d'inhibiteurs de cette voie comme les phosphodiestérases (PDE) et la sous-unité régulatrice Prkar1b. EZH2 régule ainsi la zonation fonctionnelle du cortex surrénalien via son activité histone méthyltransférase. A l'inverse, on n'observe pas d'altération marquée de la voie Wnt/β- caténine, suggérant que Ezh2 n'est pas essentiel au contrôle de cette voie dans la surrénale. Nous avons également pu mettre en évidence une dédifférenciation de cellules corticales qui retrouvent, suite à la perte de Ezh2, une identité progénitrice en exprimant des marqueurs adréno-gonadique tels que Gata4 et Wt1. Cette dédifférenciation est un phénomène naturel que l'on retrouve avec le vieillissement et qui pourrait être associée avec la diminution progressive de l'expression de Ezh2 dans les cellules stéroïdogènes. L'ensemble de ces résultats, met en évidence une nouvelle fonction de Ezh2 dans le contrôle de la voie de signalisation PKA et de l'homéostasie de la glande surrénale. En analysant des données disponibles en ligne de ChIP-sequencing, nous avons pu retrouver EZH2 et/ou H3K27me3 au niveau des régions régulatrices de nombreux gènes de phosphodiestérases et de sous-unités régulatrices de la PKA, dans 14 différents types cellulaires, comprenant des lignées de cellules cancéreuses, des cellules embryonnaires souches et des cultures primaires de cellules épithéliales et fibroblastiques. Ces résultats suggèrent fortement que EZH2/PRC2 pourrait réguler la signalisation AMPc/PKA dans d'autres tissus que la surrénale.

Bourse de « Master » mutualisée – Surrénales (1 an) HRA Pharma & SFE 2017 (32 K€)

Dr Loïc FOUSSIER
Codirection **Dr Marc LOMBES & Dr Séverine TRABADO**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Caractérisation fonctionnelle de six nouvelles mutations originales du récepteur des glucocorticoïdes.

Résumé

Six mutants génétiques nouveaux originaux du gène (NR3C1) codant du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) ont été fortuitement identifiés par séquençage haut débit réalisé sur 200 patients explorés pour des anomalies endocriniennes autres que la résistance aux glucocorticoïdes. Tous ces variants faux sens hétérozygotes sont localisés au niveau du domaine N-terminal du GR. En raison de son désordre intrinsèque de ce domaine, il est impossible de prédire avec exactitude le caractère pathogène de ces variants ni même d'évaluer l'impact sur l'expression protéique. Ainsi, ces variants ont été caractérisés fonctionnellement afin d'établir l'incidence potentielle sur la signalisation glucocorticoïde. Les 6 variants (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S et R386Q) ont été étudiés par transfections transitoires dans des cellules HEK293T et COS7. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative par rapport au GR sauvage en termes de capacité transactivatrice (courbe doses-réponses aprés 1h de stimulation par dexaméthasone), ni de l'expression protéique cellulaire globale (Western Blot), ni enfin pour la navette cytonucléaire (Immunofluorescence et microscopie optique à haut débit). Aucun effet dominant négatif n'a été mis en évidence sur le GR sauvage. La seule différence retrouvée avec le GR sauvage était pour le variant N374S dont la capacité transactivatrice mesurée après cotransfection NR3C1 et SRC2, n'était pas augmentée en présence de SRC2, coactivateur du GR, suggérant un rôle important de ce résidu 374 dans l'interaction avec certains corégulateurs transcriptionnels. En conclusion, seule une différence mineure sur la voie de signalisation GR a été retrouvée pour un seul variant, contredisant ainsi la majorité des prédictions réalisées. L'avènement du séquençage haut débit doit interroger les cliniciens et généticiens sur l'interprétation prudente des incidentalomes génétiques.

Abstract

Recent advances in genetic analysis technologies such as Next Generation Sequencing (NGS), has considerably increased the incidental discovery of genetic abnormalities. Six heterozygous missense mutations of the human glucocorticoid receptor, hGR (encoded by the NR3C1 gene), have been identified in the context of genetic screening of endocrine pathologies. GR, a nuclear receptor, hormone-induced transcription factor, is involved in many physiological processes. Nevertheless, the pathogenic significance of incidentally discovered mutations remains obscure. The aim of this work was to characterize these new variants evaluating their functional impact on GR signaling. Six original GR variants, located in exon 2, lead to amino acid substitutions of the N-terminal domain of GR (F65V, M86V, A229T, A304E, N374S, R386Q), mainly excluding the activation function $\tau 1$ domain, potential site of functional interaction with transcriptional coregulators. Transient co-transfection in HEK293T cells of mutated GR expressing vectors and a luciferase reporter establishes dose-response curves for dexamethasone. This excluded any major transactivation abnormality of the mutated GRs (EC50 ≈ 0.2nM, identical maximal transactivation capacity than that of the wild-type (WT GR), without modification of the potentiation of transcriptional coactivator SRC2, except N374S. Moreover, protein expression of mutated GRs and their cytonuclear translocation studied by immunocytochemistry were almost unchanged as compared to WT GR. These results underline the silent nature of these missense GR variants and call for a cautious interpretation of the discovery of genetic incidentalomas by NGS in the absence of detailed characterization to appropriately assess their functional impact on a particular signaling pathway.

Publication

Foussier L* & Vitellius G* et al. “Functional Characterization of Glucocorticoid Receptor Variants Is Required to Avoid Misinterpretation of NGS Data”

J Endocr Soc. 2019, Mar 6;3(5): 865-881, PMID: 31008420.

Communication

SFE 2018, 35ème congrès de la Société Française d’Endocrinologie, Nancy, France, septembre 12-15. Loïc Foussier. Communication orale thématique « Résistance Endocrinienne » récompensée du Prix de la meilleure communication

« Méfions-nous du NGS : attention au faux-sens des incidentalomes génétiques des mutations NR3C1 ».

Rapport

Les 6 variants du Récepteur Glucocorticoïde (GR), identifiés par séquençage nouvelle génération (NGS) ont tous une capacité transactivatrice similaire au GR sauvage (WT), résultats établis par transfection transitoire de gène rapporteur dans des cellules HEK293T à partir de courbes dose-réponse obtenues après stimulation par des doses croissantes d’agoniste glucocorticoïde, la dexaméthasone (DXM). Leur expression protéique évaluée par western blot après transfection de cellules HEK293T n’était pas différente à celle du WT. L’étude de la navette cyto-nucléaire DXM-dépendante de ces variants, analysée par immunofluorescence et microscopie haut débit dans des cellules COS7 transfectées a établi une réduction statistiquement significative du transfert cyto-nucléaire pour tous les mutants sauf R386Q à 1h de stimulation par DXM, mais sans retentissement biologique dans la mesure où les capacités transactivatrices des variants ne sont pas différentes de celle du WT. L’interaction avec un coactivateur transcriptionnel SRC2, évaluée par cotransfection transitoire de gènes rapporteurs après stimulation par DXM 24h n’a pas mis en évidence de différence avec le WT sauf pour le mutant N374S pour lequel SRC2 n’exerçait aucun effet coopératif particulier. Pour finir, aucun effet dominant négatif n’a été mis en évidence d’après les résultats de courbes dose-réponses après transfection transitoire hétérozygote des variants et du WT dans des cellules HEK293T.

En conclusion, l’analyse fonctionnelle des 6 variants génétiques n’a pas permis pas de démonter d’anomalie majeure de la voie de signalisation glucocorticoïde, ce qui conduit à classer ces mutations hétérozygotes comme non-pathogènes. Le seul résultat surprenant de cette étude est l’absence d’effet coactivateur de SRC2 avec le variant N374S. Cette information nous permet de postuler du rôle clé de l’asparagine en position 374 dans l’interaction de SRC2 aves le GR, ce qui nécessitera des études ultérieures.

L’ensemble de ce travail a été publié en début d’année dans the Journal of the Endocrine Society et m’a permis de soutenir mon Master 2 recherche.

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2017 (32 K€)

Dr Fabien KRIEF
Direction **Dr Nadine BINART**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Evaluation de la sensibilité individuelle à la gonadotoxicité de la chimiothérapie chez la femme jeune atteinte de cancer du sein.

Résumé

Le protocole de chimiothérapie utilisé dans le cancer du sein altère la fonction ovarienne de manière variable chez la femme jeune. Il semblerait donc exister certains facteurs génétiques responsables de la gonadotoxicité individuelle de la chimiothérapie. Nous avons sélectionné des polymorphismes nucléotidiques (SNPs) connus pour être associés à l'âge de la ménopause et recherché une corrélation entre la présence d'un de ces 12 SNPs et l'intensité de la gonadotoxicité de la chimiothérapie. Cette étude a été réalisée sur 80 patientes, qui ont eu une évaluation de la réserve ovarienne (RO) avant et après la chimiothérapie. Le génotypage a été réalisé par PCR sur plaques. Nous avons recherché une association entre ces variants et la profondeur de l'atteinte de la réserve ovarienne après chimiothérapie. Seulement 38 patientes ont pu être analysées, du fait de nombreuses perdues de vue. La RO 1 à 2 ans après la consultation initiale, était très altérée par la chimiothérapie avec 65% des patientes ayant un taux d'AMH inférieur à 0.1 ng/mL. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre la présence d'un de ces SNPs et la variation de la réserve ovarienne. Le délai de suivi dont nous disposons actuellement pourrait expliquer cette absence de résultats, certaines publications montrant une récupération de la RO après 2 ans.

Abstract

The chemotherapy used in breast cancer has differing impacts on the ovaries of young women. Some genetic factors could be responsible for the individual gonadotoxicity after chemotherapy. We selected 12 single nucleotide polymorphisms (SNPs) known to be correlated to the menopause age and searched if they were linked to the chemotherapy gonadotoxicity. This study included 80 patients who had an ovarian reserve (OR) assessment before and after chemotherapy. The genotyping was made with PCR plates. We looked for an association between those SNPs and the degree of ovarian damage. Only 38 patients were assessed due to patients lost to follow-up. The OR 1 or 2 years after the initial evaluation was very low for 65% of the patients with an AMH level of 0.1 ng/mL. We did not find a correlation between those 12 SNPs and the OR variation. The length of follow-up we actually have could explain this lack of results, as many publications show an OR recovery after 2 years.

Communication

SFE 2018, 35ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, France, septembre 12-15. Fabien Krief, Charlotte Sonigo, Michael Grynberg, Isabelle Beau, Nadine Binart.

Impact des facteurs génétiques influençant la toxicité ovarienne de la chimiothérapie chez les patientes atteintes de cancer du sein.

Le protocole standard de chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante utilisé dans le cancer du sein (contenant : 5-Fluorouracile - épirubicine - cyclophosphamide et docetaxel), altère la fonction ovarienne de manière variable chez la femme jeune. Il semblerait donc exister certains facteurs génétiques responsables de la gonadotoxicité individuelle de la chimiothérapie.

Nous avons sélectionné des polymorphismes nucléotidiques (SNPs) connus pour être associés à l'âge de la ménopause (AMHR2 (rs2002555), ARHGEF7 (rs7333181), BRSK1 (rs1172822), EXO1 (rs1635501), MCM8 (rs236114), NBN (rs7011299), NBN (rs2735387), POLG (rs2351002), PRIM1 (2277339), SYCP2L (rs2153157), TMEM224 (rs4806660)) ainsi que ABCB1 (rs1045642) impliqué dans la pharmacocinétique du docetaxel.

L'objectif de cette étude visait à rechercher une corrélation entre la présence d'un de ces 12 SNPs et l'intensité de la gonadotoxicité de la chimiothérapie. L'ensemble des polymorphismes a été recherché par SNP genotyping dans une cohorte constituée de 80 patientes de 20 à 35 ans, atteintes de cancer du sein. Une évaluation de la réserve ovarienne (RO) par un dosage sérique de l'hormone antimüllérienne (AMH) et un compte folliculaire antral (CFA), ainsi qu'un prélèvement sanguin pour l'étude génétique ont été réalisés avant l'initiation des traitements. Une évaluation clinique, hormonale et échographique a été réalisée 12 et 24 mois après la fin du traitement. Enfin, une association entre les polymorphismes génétiques et la profondeur de l'atteinte ovarienne après guérison a été recherchée. Le génotypage a été réalisé par PCR sur plaques par des amorces qui ont été définies à l'aide d'UCSC Genome Browser ® et préalablement testées. Après analyse des résultats de séquençage, nous avons recherché une association entre ces variants et la profondeur de l'atteinte de la réserve ovarienne après chimiothérapie. Seulement 38 patientes ont pu être analysées, du fait de l'absence des patientes à la consultation de suivi malgré plusieurs relances. Initialement la médiane du dosage sérique de l'AMH était de 2.85 ng/mL, et celle du CFA de 20.5 follicules. La RO 1 à 2 ans après la consultation initiale, était très altérée par la chimiothérapie avec 65% des patientes ayant un taux d'AMH inférieur à 0.1 ng/mL. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre la présence d'un de ces SNPs et la variation de l'AMH et du CFA.

Actuellement, la gonadotoxicité de la chimiothérapie est extrêmement difficile à évaluer. Néanmoins, une information sur les risques d'infertilité post-traitement et les possibilités de préservation de la fertilité améliorent le vécu des traitements des femmes jeunes atteintes de cancer. Une meilleure connaissance du pronostic individuel de la fertilité permettrait donc le choix d'une technique de préservation adaptée. Dans notre étude, nous n'avons pas montré de corrélation entre les SNPs sélectionnés et la profondeur de l'atteinte de la RO à 1 ou 2 ans. Ce délai de suivi dont nous disposons actuellement pourrait expliquer cette absence de résultats, certaines publications montrant une récupération de la RO après 2 ans.

Cette étude est préliminaire à un protocole hospitalier de recherche clinique (PHRC). Elle a permis la mise au point technique de l'étude de ces SNPs.

Bourse de « Master » (1 an) LILLY 2017 (32 K€)

M. Paul SIBILIA
Direction **Pr Patrice RODIEN**
CNRS UMR 6015 - INSERM U 1083 - Laboratoire de Physiopathologie Mitochondriale et Cardiovasculaire (MitoVasc), Faculté de Médecine, 2 Rue Haute de Reculée, ANGERS

Action des dérivés chlorés du bisphénol A sur les récepteurs couplés aux protéines G impliqués dans les régulations métaboliques.

Résumé

Objectif : Les perturbateurs endocriniens dont le bisphénol A (BPA) peuvent contribuer au développement des maladies métaboliques. Les dérivés chlorés du Bisphénol A (Cl_XBPA) sont présents dans l'eau de ville. Leur exposition est associée à une plus grande prévalence d'obésité et de diabète type 2. Nous avons cherché à savoir si leur action sur la survenue des maladies métaboliques pouvait s'exercer via deux RCPG métaboliques : MC4R et TGR5.

Matériel et Méthodes : Nous avons étudié l'effet des Cl_XBPA sur l'activité des récepteurs humains MC4R et TGR5 en utilisant des cellules HEK293T transfectées de façon transitoire avec MC4R ou TGR5. La production d'AMPc a été mesurée afin d'évaluer la conséquence de leur exposition à diverses concentrations de l'ensemble des Cl_XBPA.

Résultats : Les Cl_XBPA n'entraînaient pas d'altération de la viabilité cellulaire. L'activité constitutive de MC4R est inhibée par la plupart des Cl_XBPA, alors que leur molécule mère la potentialise. Les Cl_XBPA jouent un rôle de modulateur allostérique positif de MC4R en présence de son agoniste l'αMSH, et inhibent l'effet agoniste inverse de l'AgRP. En ce qui concerne TGR5, nous avons mis en évidence une activité constitutive du récepteur en l'absence de ligand. Cette activité est inhibée par l'ensemble des Cl_XBPA, qui exercent par ailleurs des effets non monotoniques sur l'activité de TGR5 en présence de son agoniste le Composé 18, avec une potentialisation à faible concentration et une inhibition à fortes concentrations.

Conclusion : Les Cl_XBPA sont des perturbateurs endocriniens qui jouent un rôle de modulateur allostérique positif de MC4R en présence de ligand, mais inhibent son activité constitutive. Ils ont par ailleurs des effets non monotoniques sur l'activité TGR5.

Abstract

Action of chlorinated derivatives of Bisphenol A on G protein coupled receptors linked to metabolic regulations.

Objectives : Endocrine disruptors such as Bisphenol A (BPA) may take part in the development of metabolic disease. Chlorinated derivatives of Bisphenol A (Cl_XBPA) are found in water. Exposition to Cl_XBPA is linked to a greater prevalence of obesity and type 2 diabetes. We aimed to characterize the effects of Cl_XBPA on two metabolic G protein coupled receptors (GPCRs) : MC4R and TGR5.

Methods : We used a HEK293T cell line, transiently transfected with MC4R or TGR5. We studied the action of Cl_XBPA on these receptors by measuring the cAMP production in the presence of Cl_XBPA and ligands.

Results : Cl_XBPA did not cause cell toxicity. Constitutive activity of MC4R is inhibited by most Cl_XBPAs, while BPA potentializes it. Cl_XBPAs act as a positive allosteric modulator of MC4R in the presence of its agonist αMSH, and inhibits the inverse agonist effect of AgRP. We showed a constitutive spontaneous activity of TGR5 without a ligand. This activity is inhibited by Cl_XBPAs, that exert non monotonic effects on TGR5 activity in the presence of its agonist, compound 18, with a potentiation at lower doses and an inhibition at higher concentrations.

Conclusion : Cl_XBPAs are endocrine disruptors, which can act as positive allosteric modulators on MC4R in the presence of ligands, but inhibit its constitutive activity. They exert non monotonic effects on TGR5 activity.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

La prévalence des problèmes de surpoids, d'obésité et de diabète type 2 a doublé depuis les années 80. Les facteurs impliqués dans cette augmentation sont multiples : ils comprennent la sédentarisation progressive de notre mode de vie, l'accès facilité à une alimentation hypercalorique ainsi que certains facteurs génétiques. Cependant, ces facteurs n'expliquent pas tout, et le rôle joué par les perturbateurs endocriniens est de plus en plus évoqué. Parmi ces derniers, le Bisphénol A (BPA) est l'un des plus étudiés, avec notamment des effets métabotoxiques prouvés depuis plusieurs années. Les dérivés chlorés du BPA (Cl_XBPA) sont formés pendant les processus de désinfection des eaux de ville et de blanchissement du papier. Ils sont présents à des concentrations de l'ordre du nmol/L dans les eaux de ville. L'association épidémiologique entre l'exposition au Bisphénol A ou à ses dérivés chlorés et le développement d'une obésité ou d'un diabète de type 2 a été démontrée. Si certains effets dus à leur action sur des récepteurs nucléaires ont déjà été prouvés, les données concernant l'éventuel rôle du BPA et de ses dérivés chlorés sur les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) impliqués dans les régulations métaboliques sont encore pauvres. Nous avons donc choisi d'étudier les effets du BPA et de ses dérivés sur deux RCPG fortement impliqués dans le développement des maladies métaboliques : le récepteur aux mélanocortines de type 4 (MC4R) et le récepteur membranaire aux acides biliaires (TGR5). MC4R est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Son activation entraîne une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel, ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique basale. TGR5, quant à lui, potentialise la production des incrétines comme le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1), exerce un rôle anorexigène sur les centres hypothalamiques de contrôle de la satiété, et ralentit la vidange gastrique. L'ensemble de ces actions aboutit à une meilleure insulinosensibilité et à un moindre appétit. Ces deux récepteurs exercent leurs actions par la voie de l'Adénosine Mono Phosphate cyclique (AMPc).

Afin de caractériser les effets *in vitro* du BPA et de ses dérivés chlorés, nous avons utilisé un modèle cellulaire HEK293T, transfecté de manière transitoire avec MC4R ou TGR5. Nous avons étudié l'effet du BPA et des Cl_XBPA sur ces récepteurs, en mesurant la production d'AMPc en présence de leurs ligands (l'αMSH, agoniste endogène de MC4R, l'AgRP, son agoniste inverse endogène, et le composé 18, agoniste de synthèse spécifique de TGR5) et de diverses concentrations de BPA et Cl_XBPA. Pour ce faire, la transfection initiale était double : elle était à la fois effectuée avec le récepteur d'intérêt mais aussi avec un plasmide de luciférase de luciole comportant un domaine de liaison à l'AMPc. Ainsi, en cas de production d'AMPc par la cellule, la luciférase produit une luminescence proportionnelle à la quantité d'AMPc. La mesure de cette luminescence permet de quantifier la production d'AMPc et donc l'activité du récepteur.

Tout d'abord, nous avons vérifié que le BPA et ses dérivés halogénés n'entraînaient pas d'altération de la viabilité cellulaire des cellules HEK293T, par un test au 3-(4,5-diméthylthiazolyl-2)-2, 5-diphényltétrazolium (MTT).

Ensuite, nous avons mis en évidence une inhibition de l'activité constitutive de MC4R par la plupart des Cl_XBPA, alors que leur molécule mère la potentialisait. En effet, le BPA a un effet stimulateur de la production d'AMPc en l'absence de ligand, avec une moyenne d'augmentation de 22%. Les Cl_3BPA et Cl_4BPA ont un effet inhibiteur de la production d'AMPc, à 10^{-6}M pour le Cl_3BPA et 10^{-7} M pour le Cl_4BPA, entraînant une baisse de 16% et 17% respectivement. Le 2,6-C_{l2}BPA entraîne un effet significativement inhibiteur de l'activité constitutive de MC4R, avec une baisse de production d'AMPc de 23% en moyenne.

Nous avons ensuite caractérisé l'effet du BPA et de ses dérivés en présence des ligands de MC4R : l'agoniste endogène alpha-MSH et l'agoniste inverse AgRP. Le Cl_1BPA, le Cl_2BPA et le Cl_4BPA ont une action potentialisatrice sur la réponse de MC4R à l'αMSH 10^{-6}M (concentration d'activation maximale du récepteur), avec des augmentations de production d'AMPc en moyenne de 22%, 21% et 9%. Le Cl_1BPA, Cl_2BPA, 2,6-Cl_2BPA, et Cl_3BPA exercent également des effets potentialisateurs en présence d'αMSH 10^{-9} M (EC50 de l'activation du récepteur) : +11%, +13%, +14% et +10% respectivement. En présence cette fois d'AgRP à la concentration de 10^{-6}M (effet inhibiteur maximal), le BPA à la concentration de 10^{-5}M augmente l'effet agoniste inverse exercé par l'AgRP de 17%. Le Cl_4BPA, en revanche, diminue l'effet agoniste inverse, avec une variation allant jusqu'à 20% par rapport à l'AgRP. Quand l'AgRP est présent

à la concentration de 10^{-8}M (correspondant à l'IC50), le BPA potentialise l'effet agoniste inverse de l'AgRP quand il est présent à 10^{-5} M, avec un effet d'une ampleur de 19%. A partir de 10^{-10} M, le Cl_1BPA, quant à lui, empêche l'effet agoniste inverse de l'AgRP, en moyenne de 15.5%. Cette altération de l'effet agoniste inverse est encore plus marquée pour le Cl_2BPA, de façon assez homogène pour toute la gamme de concentrations testées, avec un effet d'une ampleur moyenne de 24%. Les Cl_XBPA jouent donc un rôle de modulateur allostérique positif de MC4R en présence de son agoniste l'αMSH, et inhibent l'effet agoniste inverse de l'AgRP.

Dans nos résultats, nous avons également noté une activité constitutive de TGR5, avec une production d'AMPc 13.5 fois plus important que celle des cellules transfectées par le vecteur vide. Cette activité était inhibée par le BPA et l'ensemble des Cl_XBPA, en moyenne de 21%.

Nous avons alors caractérisé les effets du BPA et de ses dérivés sur l'activité de TGR5 en présence de son agoniste spécifique, le composé 18, à la concentration entraînant l'activation maximale du récepteur, soit 10^{-5}M. Le BPA à 10^{-5} M un effet inhibiteur de 18% sur la production d'AMPc par TGR5. Le Cl_1BPA, le 2,6-Cl_2BPA et le Cl_3BPA ont un effet stimulateur de la production d'AMPc à 10^{-9} M (également à 10^{-8} M pour le 2,6-Cl_2BPA), d'une ampleur de 21%, 24% et 14% respectivement. En revanche, à la concentration de 10^{-5} M, ils ont un effet plutôt inhibiteur (-24% pour le monochloré, -27% pour le trichloré, et une tendance non significative pour le 2,6-Cl_2BPA). Le BPA et ses dérivés chlorés exercent donc des effets non monotoniques sur l'activité de TGR5 en présence de son agoniste : potentialisation à faibles concentrations et inhibition à concentrations plus fortes.

Conclusion : les Cl_XBPA sont des perturbateurs endocriniens qui jouent un rôle de modulateur allostérique positif de MC4R en présence de ses ligands, mais inhibent son activité constitutive. Ils exercent des effets non monotoniques sur l'activité de TGR5.

Bourse de « Master » Recherche en Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2017 (32 K€)

Mlle Fanny CHASSELOUP
Codirection **Dr Constantine STRATAKIS & Pr Jérôme BERTHERAT**
Section on Genetics & Endocrinology, NICHD, NIH – Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development – BETHESDA, Maryland (MD-20892 – USA)

Etude de l'exome dans une large population de patients atteints de Maladie de Cushing.

Résumé

La néoplasie endocrienne multiple de type 4 (NEM4) est liée à des mutations germinales inactivatrices du gène *CDKN1B*. Un seul cas de maladie de Cushing a été décrit dans ce contexte. Cependant, l'expression de CDKN1B est souvent diminuée dans les adénomes corticotropes sporadiques.

Notre objectif était de déterminer la fréquence des mutations germinales de *CDKN1B* dans une cohorte pédiatrique de patients atteints de la maladie de Cushing.

Nous avons étudié 212 patients atte ints de la maladie de Cushing. L'âge moyen au diagnostic était de 12.5 ± 3.5 ans. L'ADN germinal de 97 patients et l'ADN somatique de 27 patients a été analysé par séquençage complet de l'exome et 115 par séquençage Sanger. Les variations du nombre de copie germinale de *CDKN1B* (CNV) ont été étudiées dans 204 cas. L'expression de CDKN1B a été analysée par immunohistochimie.

Trois variants, a priori, pathogènes de *CDKN1B* ont été identifiés chez trois patients présentant des adénomes sporadiques : p.I119T, p.D136G, et p.Q107Rfs*12. Le dernier variant a été retrouvé chez trois membres de la famille, dont un décédé des suites d'un adénocarcinome colique présentant une perte d'hétérozygotie pour CDKN1B. Aucun CNV ni variant somatique n'ont été identifiés.

Trois cas de maladie de Cushing lié à *CDKN1B* ont été identifiés représentant 1.4% de la cohorte. L'adénocarcinome colique pourrait ainsi être une nouvelle néoplasie de la NEM4. La NEM4 est donc une cause rare de maladie de Cushing, même sporadique, devant être reconnue afin de proposer un conseil génétique adapté.

Abstract

Germline loss-of-function mutations in the *CDKN1B* gene cause the autosomal dominant syndrome of multiple endocrine neoplasia type 4 (MEN4). Only one case of Cushing's disease (CD) has been described in this setting but, reduced expression of the CDKN1B protein is a frequent finding in sporadic corticotropinomas. We aimed to determine the frequency of germline *CDKN1B* mutations in a cohort of pediatric patients with CD.

We studied 212 pediatric CD patients. Mean age at diagnosis was 13.5 (interquartile range: 10.3-15.4); 97 underwent WES of germline DNA only or germline and tumor DNA (n=27); 115 patients were screened by Sanger sequencing. Germline copy number variations (CNVs) were investigated in 204 cases. Loss of heterozygosity (LOH) and *CDKN1B* immunohistochemistry were analyzed in tumor tissues.

Three apparently pathogenic germline *CDKN1B* variants were identified in one patient each: p.D136G in Patient 1, p.I119T in Patient 2 and p.Q107Rfs*12 in patient 3. Patients had sporadic presentation and no positive family history for MEN4. Three variant carriers were identified within the kindred of Patient 3; one of them died of colon adenocarcinoma and the tumor displayed LOH for *CDKN1B*. Variant inheritance was not confirmed in Patient 1 and 2, and the corticotropinoma had no LOH. No CNVs or somatic variants were identified in the cohort.

Three cases of MEN4-related CD were identified, accounting for 1.4% of the cohort studied. Colon adenocarcinoma may be a new MEN4-associated neoplasia. MEN4 is a rare cause of CD in children that should be recognized due to its implications for clinical screening and genetic counselling.

Communications

- **SFE 2018, 35ème congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Nancy, France, septembre 12-15.** Chasseloup F. et al.

« Les mutations germinales du gène *CDKN1B* sont une cause de maladie de Cushing chez l'enfant. ».

- **ENDO 2019, 101th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans (LA), March 23-26. Outstanding Abstract Award.** Hernández-Ramírez L., Chasseloup F., Faucz F., Lodish M., Pankratz N., Chittiboina P., Lane J., Kay D., Bertherat J., Mills J., Stratakis C.

"Non-syndromic Cushing's Disease Due To *CDKN1B* Mutations: Novel Mutations and Phenotypic Features in a large Pediatric Cohort".

Rapport

Introduction

La maladie de Cushing est une maladie rare secondaire à un adénome hypophysaire sécrétant de l'ACTH entrainant un excès de glucocorticoïdes. L'excès de glucocorticoïdes entraine une augmentation de la mortalité et de la morbidité (Castinetti et Al. 2012). En 2000, un nouveau syndrome de néoplasies endocriniennes multiples a été décrit, d'abord chez la souris puis chez l'humain (Pellegata et Al. 2006) : la néoplasie endocrinienne multiple de type 4 (NEM4). La NEM4 est secondaire à une mutation germinale du gène CDKN1B, un gène suppresseur de tumeurs régulant le cycle cellulaire. La NEM4 associe une hyperparathyroïdie primaire, des tumeurs neuro-endocrines et des adénomes hypophysaires. Un seul cas de maladie de Cushing dans un contexte de NEM4 a été décrit. Cependant, l'implication du gène CDKN1B dans la maladie de Cushing a déjà été étudiée dans la mesure où l'expression de CDKN1B dans les tumeurs corticotropes est souvent diminuée par rapport au tissu hypophysaire sain (Sekiya et Al. 2014).

Objectifs

Notre objectif était de déterminer la fréquence des mutations du gène CDKN1B au sein d'une population pédiatrique de patients atteints de maladie de Cushing.

Matériels et méthodes

Nous avons étudiés 212 enfants atteints de la maladie de Cushing. Les patients avaient été évalués au « National Institute of Health (NIH) Clinical Center » entre 1997 et 2018. Les données cliniques ont été obtenues par étude du dossier clinique. L'ADN germinal de 97 patients et l'ADN tumoral de 27 patients ont été analysés par séquençage complet de l'exome (Whole Exome Sequencing). De plus, le gène CDKN1B a été séquencé par un séquençage de Sanger chez 115 patients. Une analyse du nombre de copies du gène CDKN1B a pu être réalisée chez 204 patients. Les tumeurs corticotropes des patients ayant un variant germinal du gène CDKN1B ont été étudiées en immunohistochimie. Un marquage de CDKN1B a été réalisé. Par la suite, la séquence codante de CDKN1B a été clonée dans un plasmide pSF-CMV-NH2-HA-EKT-NcoI dans le but d'étudier l'expression cellulaire de CDKN1B.

Résultats

Trois variants d'intérêt ont été identifiés et retenus parmi les 212 patients étudiés : deux mutations faux sens dans l'exon 1 (c.407A>G, p.D136G et c.356T>C, p.I119T ; NM_004064.4) et un variant décalant le cadre de lecture (c.320_320delA, Q107Rfs*12 ; NM_004064.4). Les caractéristiques cliniques des patients porteurs de ces trois variants sont détaillées dans le Tableau 1. L'enquête familiale n'a pas identifié de pathologies du spectre de la NEM4 chez les apparentés de ces trois patients. Ces trois variants avaient une très faible fréquence au sein des bases de données publiques. Ces variants se trouvaient au sein de domaines d'interaction de la protéine CDKN1B avec d'autres protéines : le « c-Jun binding protein domain » et le « scatter domain ». Ces variants survenant au sein de ces domaines pourraient

donc contribuer à une dérégulation du cycle cellulaire et ainsi favoriser la tumorigenèse. Le rôle pathogène de ces variants n'a pu être étudié que par des analyses *in silico*. Pour les deux premiers variants, l'ADN tumoral ne présentait pas de perte d'hétérozygotie. Pour le dernier variant, le tissu tumoral n'était pas disponible. Le gène *CDKN1B* au sein de la famille du patient porteur du troisième variant a pu être étudié : trois porteurs du même variant ont été identifiés au sein des apparentés, dont sa mère, décédée d'un adénocarcinome colique métastatique. Un échantillon de cette tumeur a permis d'identifier une perte de l'hétérozygotie au sein du tissu tumoral.

Un seul échantillon tumoral a pu être étudié en immunohistochimie (tissu tumoral du patient porteur du variant p.I119T) : le marquage nucléaire de CDKN1B était diminué par rapport à celui d'un adénome hypophysaire issu d'un patient non porteur d'un variant de *CDKN1B.*

Nous n'avons pas retrouvé de variation du nombre de copie du gène *CDKN1B*.

Enfin, le plasmide pSF-CMV-NH2-HA-EKT-NcoI-WT_CDKN1B a pu être obtenu. Une mutagenèse dirigée a permis d'obtenir des plasmides présentant les variants d'intérêt afin d'étudier leur rôle pathogène.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques des patients porteurs des variants de CDKN1B

Patient	Variant	Sexe	Présentation clinique	Age au premier symptôme	Age au diagnostic	Taille de la tumeur (mm)	Traitement	Statut
#1	p.D136G	M	Obésité fascio-tronculaire	13	13	5*5*2	Chirurgie Trans sphénoïdale	Rémission
#2	p.I119T	F	Diabète et prise de poids	10	13	7*5*4	Chirurgie Trans sphénoïdale (x2)	Rémission
#3	Q107Rfs*12	M	Obésité fascio-tronculaire	12	15	4	Chirurgie Trans sphénoïdale	Rémission

Conclusion

Les mutations germinales du gène *CDKN1B* pourraient être responsables d'un faible nombre de cas de maladie de Cushing de l'enfant, soit au sein d'un syndrome de NEM4, soit de manière sporadique. Nous avons identifié trois variants potentiellement pathogènes du gène *CDKN1B* au sein de la cohorte étudiée représentant 1,4% des cas. Les mutations du gène *CDKN1B* sont une cause rare de maladie de Cushing de l'enfant mais elles doivent être évoquées. L'étude familiale du patient 3 et la présence d'une perte d'hétérozygotie au sein de l'adénocarcinome colique d'un apparenté peut suggérer que l'adénocarcinome colique soit une nouvelle néoplasie de la NEM4.

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2017 (30 K€)

Pr Lionel GROUSSIN-ROUILLER

INSERM U 1016 - CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Université Paris Descartes, Département Endocrinologie, Métabolisme, Diabètes, PARIS

BRAF dans les cancers de la thyroïde : rôle de ses partenaires dans son oncogénicité et la résistance thérapeutique.

Résumé

Les cancers thyroïdiens de souche folliculaire métastatiques, porteurs de la mutation activatrice $BRAF^{V600E}$ sont partiellement sensibles aux inhibiteurs de BRAF de première génération. Cette résistance primaire peut être liée à une hétérodimérisation des kinases de la famille RAF. Des molécules de seconde génération inhibant l'ensemble de ces kinases sont en cours d'étude dans différents cancers. Nous avons débuté un travail préclinique à partir de lignées dérivant de cancers thyroïdiens humains porteuses de la mutation $BRAF^{V600E}$ pour tester leur efficacité sur la prolifération et l'inhibition de la voie MAPK. Nous avons déterminé leurs concentrations inhibitrices médianes, en les comparant à celles des inhibiteurs de première génération et de deux inhibiteurs de la kinase MEK, utilisés en clinique. Des études du cycle cellulaire, de l'apoptose sont en cours. Nous envisageons de réaliser des expériences en combinant les différentes classes d'inhibiteurs.

Abstract

Metastatic thyroid cancers bearing the $BRAF^{V600E}$ activating mutation are partially sensitive to first-generation BRAF inhibitors. This primary resistance may be related to heterodimerization of RAF family kinases. Second generation molecules inhibiting all these kinases are being investigated in different types of cancers. We conduct a pre-clinical work with human thyroid cancer-derived cell lines carrying the $BRAF^{V600E}$ mutation to test the efficacy of different MAPK inhibitors, including three second generation drugs, against proliferation and inhibition of the MAPK pathway. We determined their median inhibitory concentrations (IC 50) by comparing them with first-generation inhibitors and two MEK kinase inhibitors used in clinics. Studies of the cell cycle and apoptosis are in progress. We plan to carry out experiments by combining the different classes of inhibitors.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Les cancers thyroïdiens de souche folliculaire ont parfois une évolution péjorative avec des métastases résistant au traitement conventionnel, et notamment à l'IRAthérapie. L'étude de la biologie moléculaire a permis de mettre en évidence une activation fréquente de la voie des MAPK, avec notamment la présence d'une mutation « hot spot » activatrice de la kinase BRAF. Cette mutation $BRAF^{V600E}$, également fréquente dans les mélanomes malins, a conduit au développement d'inhibiteurs de BRAF de première génération. Ces inhibiteurs sont efficaces en cas de cancer dermatologique, mais uniquement partiellement dans les cancers thyroïdiens. Un des mécanismes mis en évidence à cette résistance primaire repose sur l'activation de la voie MAPK par un phénomène d'hétérodimérisation des kinases de la famille RAF (A-RAF, BRAF et C-RAF). Des molécules de seconde génération ont été développées pour inhiber simultanément les trois membres de cette famille à l'état d'hétérodimère. La variabilité d'efficacité d'un type de cancer à l'autre, observée avec les inhibiteurs de première génération, justifie des études précliniques et cliniques pour toute nouvelle molécule dans chaque type de cancer.

Nous avons entrepris au sein du laboratoire, à l'aide du financement obtenu de la Société Française d'Endocrinologie (SFE-Pfizer), un travail préclinique visant à définir l'intérêt éventuel des inhibiteurs de seconde génération des kinases de la famille RAF dans les cancers de souche folliculaire porteurs de la mutation $BRAF^{V600E}$. Nous étudions 5 lignées dérivant de cancers humains papillaires ou anaplasiques, porteuses de cette mutation à l'état homozygote ou hémizygote. Pour les positionner par rapport aux traitements ayant l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), nous testons en parallèle deux inhibiteurs de première génération ayant l'AMM, trois inhibiteurs de seconde génération et deux inhibiteurs de MEK ayant également l'AMM. Nous avons déterminé en parallèle leur effet sur la prolifération (viabilité cellulaire, IC50) et leur capacité d'inhibition de la voie des MAPK (inhibition de la phosphorylation de ERK). Nous avons pu constater la possibilité d'un phénomène d'échappement rapide (résistance primaire) avec différents de ces inhibiteurs, mais de manière variable en fonction des lignées. Les inhibiteurs de MEK, agissant en aval de la mutation $BRAF^{V600E}$, sont efficaces pour inhiber la voie de manière prolongée.

Notre travail se poursuit en réalisant des études complémentaires sur le cycle cellulaire, l'apoptose pour comprendre les mécanismes de leur efficacité. Nous allons également, comme réalisé en clinique, tester différents combinaisons de ces différentes classes d'inhibiteurs.

Bourse de Recherche en Endocrinologie (1 an) SFE 2017 (50 K€)

Dr Florence ROUCHER-BOULEZ
Direction **Dr Pierre VAL**
CNRS UMR 6293, INSERM U 1103, Physiopathologie Moléculaire de la Surrénale et des Tissus Endocrines, CLERMONT-FERRAND

Rôle de EZH2 et du complexe PRC2 dans l'Homéostasie et l'Insuffisance Surrénale.

RAPPORT

La corticosurrénale (CSR) est constituée de trois zones : glomérulée (ZG), fasciculée (ZF) et réticulée (ZR), permettant la biosynthèse des hormones stéroïdiennes essentielles à la vie. Elle subit un renouvellement cellulaire et une différenciation zonale constants, essentiels au maintien de son homéostasie et à son activité endocrine. Les mécanismes sont mal connus mais la différenciation s'effectue de manière centripète, sous le contrôle de la voie de signalisation WNT dans la ZG et de la voie PKA dans la ZF. La transition de la ZG à la ZF est sous la dépendance de la répression de la voie WNT par la voie PKA activée en réponse à l'ACTH (Drelon, et al., 2016). L'équipe d'accueil a montré que l'invalidation de la protéine EZH2 dans des CSR de souris conduit à une ISP isolée (Mathieu, et al., 2018) en glucocorticoïde avec une perturbation de la zonation et une hypoplasie de la zone fasciculée, en faisant un très bon candidat dans l'ISP humaine. EZH2 est la sous unité catalytique du complexe PRC2 (Polycomb repressive 2) permettant la méthylation d'histone et la répression de gènes cibles. Les premiers résultats suggèrent une forte diminution de la voie PKA malgré une stimulation maintenue de celle-ci par l'ACTH. EZH2 semble donc directement contrôler la voie de signalisation PKA. Les objectifs étaient doubles : 1) comprendre le rôle de EZH2 sur la voie de signalisation PKA et identifier les mécanismes moléculaires de cette interaction 2) évaluer la présence de mutations dans le gène codant pour EZH2/PRC2 chez des patients ayant une ISP congénitale.

1) Evaluer le rôle de EZH2 sur la voie de signalisation PKA

Afin d'évaluer le rôle de la signalisation EZH2 sur la signalisation PKA, l'équipe souhaitait inactiver Ezh2 dans différents types cellulaires (cellules cortico-surrénaliennes humaines H295R, murines ATC7xi (Ragazzon, et al., 2006) et de fibroblastes embryonnaires murin (MEF) provenant de souris Sf1:Cre,mTmG,Ezh2 Fl/Fl). Il s'agissait ensuite d'évaluer l'activité PKA et voir leur capacité à répondre à l'ACTH pour induire la synthèse de corticostéroïdes.

A partir d'ARN de cellules ATC7xi traitées durant différent temps par un inhibiteur de EZH2 (GSK) et stimulé par ACTH pendant 10h ou 24h, les études par RTqPCR de différentes cibles de la voie PKA et d'enzymes de la steroïdogenèse n'ont pas permis de mettre en évidence de résultats cohérents malgré une inhibition, incomplète , de EZH2 objectivée par western blot.

L'invalidation de EZH2 dans les MEFs par différentes techniques a toujours conduit à un arrêt de la croissance cellulaire dès l'activation de la recombinase Cre, même lorsque l'expression de celle-ci était conditionnelle (sous contrôle de ERT2 activé par tamoxifène). Cela suggère que les cellules ne peuvent pas se diviser en l'absence d'EZH2.

Afin d'identifier les cibles directes de Ezh2. J'ai tenté de combiner des données du transcriptome des souris Ezh2KO avec des données de ChIP sequencing (EZH2, H3k27me3 et H3K4me3). Malheureusement les analyses se sont révélées ininterprétables. La précipitation de Ezh2 semble ne pas avoir fonctionné. Les données de transcriptome suggèrent que Pde3a, Pde7b et Pde1b, régulateurs négatifs de PKA, sont des cibles pertinentes. Leur expression est augmentée chez les souris invalidées. Il aurait été nécessaire sur un modèle cellulaire invalidé pour EZH2 de diminuer leur expression par ARN interférence et de mesurer l'activité de la PKA et la stéroïdogenèse en réponse à l'ACTH.

Par ailleurs, les souris invalidées pour EZH2 révèlent une accumulation de cellules 'progéniteurs like' avec une accumulation de cellules positives pour WT1 ou GATA4 provenant

d'une dédifférenciation de cellules stéroïdiogènes SF-1+. De manière intéressante le même type de cellules semble apparaitre chez des souris sauvages vieillissantes. Un travail tout d'abord par immunoshistochimie a débuté, permettant d'étudier le vieillissement des surrénales sauvages (étude à 2, 6, 12 et 18 mois). Les mêmes paramètres seront ensuite étudiés chez des souris invalidées pour Gata4.

2) Identifier des mutations chez des patients avec une ISP congénitale

200 individus ont été séquencés par séquençage haut débit sur un séquenceur Illumina® NextSeq500, avec un panel de 91 gènes incluant les gènes codant les membres du complexe PRC2 et les déméthylases KDM6A/6B. Parmi ces 200 échantillons, 100 ont une ISP et 100 sont des témoins contrôles. Parmi les 100 patients avec une ISP, pour 50 d'entre eux le diagnostic moléculaire est établi et pour les 50 autres, l'espoir était de trouver une mutation pathogène dans l'un de ces gènes candidats, ce qui n'a pas été le cas. Pour les cinquante patients avec une étiologie moléculaire déjà connue, l'objectif était d'évaluer si des variants/mutations dans ces gènes candidats peuvent avoir des effets modulateurs sur le phénotype. Les analyses n'ont pas permis pour l'instant de prouver cela. L'analyse a cependant ses limites puisque EZH2 et SUZ12 ont des gènes homologues rendant difficiles l'alignement des séquences et la bonne identification de variants.

Cependant, deux familles ont pu bénéficier d'une analyse d'exome. Selon notre interprétation des données, nous avons identifié des mutations dans un gène candidat pour chacune d'elle qu'il est nécessaire de valider. **Le nom de ces gènes reste donc extrêmement confidentiel.**

Dans la première famille, une mutation dans le gène LGR4 semble responsable du déficit isolé en minéralocorticoïde, retrouvé chez une patiente. La patiente a présenté une perte de sel associée à une surdité, un nanisme et des problèmes au niveau des phanères. Ces derniers symptômes sont retrouvés chez la souris invalidée pour ce gène dans l'organisme entier, mais l'impact sur la surrénale n'est pas déterminé. LGR4 est un acteur majeur de la voie canonique Wnt/βcaténine permettant le bon développement de la ZG et donc la biosynthèse de l'aldostérone. Un modèle murin avec le gène floxé nous a été fourni par H. Clevers ((Hubrecht Institute, Utrecht, NL). Après invalidation conditionnelle du gène dans la surrénale, le profil hormonal et l'étude de la différenciation et du maintien de la surrénale seront réalisés par des dosages (rénine, aldostérone, ACTH, corticostérone), des méthodes d'immunohistochimie et études de l'impact sur l'expression de gènes clés de la voie WNT, PKA et codant pour les enzymes de la stéroïdogenèse (RT-qPCR) (10 souris pour chaque sexe à trois âges différents = 120). Ces études seront complétées par une validation in vitro. La mutation sera introduite par technique CRIPR/Cas9 dans des cellules surrénaliennes humaines (H295R).

Dans la seconde famille, la mutation dans le gène ADX semble responsable du déficit combiné en minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes, associé à un rachitisme résistant à la vitamine D. L'adrénodoxine est le partenaire d'oxydo-réduction des cytochromes mitochondriaux impliqués dans la biosynthèse des stéroïdes et le métabolisme de la vitamine D.

La validation est réalisée in vitro par transfection, dans des cellules COS1, de plasmides codant pour l'ADX, l'adrénodoxine réductase et une des enzymes de la stéroïdogenèse. L'impact sera évalué par mesure de l'activité enzymatique de l'enzyme (dosage en LC MS/MS : pregnénolone, cortisol, corticostérone) avec la réalisation d'une cinétique enzymatique (6 points) pour CYP11A1, CYP11B1 et CYP11B2, en triplet dans trois expériences indépendantes.

Bibliographie

1. Drelon, C., et al. PKA inhibits WNT signalling in adrenal cortex zonation and prevents malignant tumour development. Nature communications 2016; 7: 12751.
2. Mathieu, M., et al. Steroidogenic differentiation and PKA signaling are programmed by histone methyltransferase EZH2 in the adrenal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2018; 115(52): E12265-e12274.
3. Ragazzon, B., et al. Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. Endocrinology 2006; 147(4): 1805-1818.

Bourse de « Master » SFE 2017 (32 K€)

Mlle Annabelle NAMAN
Codirection **Dr Eric BAUDIN, Dr Marc LOMBES & Dr Larbi AMAZIT**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Mécanismes moléculaires d'action du Mitotane dans le corticosurrénalome : Synergie fonctionnelle TSPO/StAR.

Résumé

Le mitotane est le traitement de référence du corticosurrénalome. Cette drogue cible le complexe MAM et plus spécifiquement le transducéosome, qui permet le transfert du cholestérol libre du compartiment cytoplasmique vers la mitochondrie. Nous avons identifié les deux protéines principales impliquées dans ce mécanisme, TSPO (Translocator Protein) et StAR (Stéroidogénic Acute Regulatory Protein).

Pour cela, nous avons analysé l'impact du mitotane et du PK11195 (ligand synthétique de TSPO) sur l'expression génique et protéique de StAR et TSPO ainsi que sur leur interaction dans les cellules corticosurrénaliennes humaines (H295R). Nous avons comparé ces résultats avec d'autres lignées cancéreuses humaines (SW13, MCF7). Les cellules ont été traitées à des concentrations variables de mitotane (0-100 µM) et de PK11195 (50 µM) pendant des durées d'exposition variables (1-24 h). Nous avons également quantifié l'apoptose induite par le mitotane en mesurant les niveaux d'expression de la PARP clivée, et quantifié l'interaction StAR-TSPO par la technique sophistiquée de ligature de proximité (PLA). Enfin, nous avons également mesuré l'expression de la protéine TSPO en immunohistochimie sur des lames de Tissu MicroArrays issues de patients atteint de corticosurrénalome métastasiques et étudié le polymorphisme de TSPO (A149T) par une approche de PCR spécifiques d'allèles. Nous montrons que le mitotane, seul, diminue l'expression des protéines StAR et TSPO et induit l'apoptose, avec un effet synergique obtenu en présence de PK11195. Nous démontrons surtout pour la première fois, une interaction physique entre ces deux protéines et une augmentation de cette interaction en présence de mitotane. L'analyse des TMA indiquent qu'il existe une corrélation entre l'intensité du marquage TSPO et la survie à 24 mois. En conclusion, TSPO et StAR jouent un rôle fondamental dans l'action du mitotane et pourraient expliquer en partie la spécificité surrénalienne. L'analogie structurale entre le cholestérol et le mitotane pourrait expliquer un mécanisme commun d'entrée intra-mitochondriale des deux molécules. Afin de valider nos hypothèses, des lignées stables dépourvues en StAR et TSPO sont en cours de développement. Nous poursuivons également l'étude du polymorphisme de TSPO et celle des TMA (Anticorps anti-StAR) afin de mieux préciser le rôle de ces deux protéines.

Abstract

Mitotane, the treatment of reference for advanced adrenocortical carcinoma (ACC), exerts anti-tumor and antisecretory actions, however its molecular mechanism of action remains unknown. We previously demonstrated that mitotane selectively inhibits some mitochondrial respiratory chain complexes (Hescot, ERC 2013). Ninety percent of the mitotane was shown to accumulate into the mitochondrial fraction, leading subsequently to cell proliferation inhibition and apoptosis (Hescot, JCEM 2015). Recently, we have also shown that mitotane disrupts Mitochondria-Associated-Membranes (MAMs), a molecular bridge between endoplasmic reticulum and mitochondria involved in many critical cellular functions (Hescot, Oncotarget 2017). We focused our attention on two key proteins, TSPO (Translocator protein) and STAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein), both belonging to the transduceosome, a macromolecular complex of the MAMs of steroidogenic cells (Issop, MCE, 2013). To further evaluate the adrenal specificity of mitotane action, coexpression of both proteins was analyzed in different human adrenocortical steroid-secreting H295R, non-secreting SW13 and breast adenocarcinoma MCF-7 cells. Western Blot analyses demonstrated that mitotane downregulated the expression of TSPO, exclusively in H295R adrenocortical cells, as well as that of STAR, selectively expressed

in steroidogenic cells. Interestingly, this mitotane-induced downregulation was potentiated by PK11195, a pharmacological TSPO ligand. Proximity ligation assays demonstrated of a physical interaction between TSPO and STAR that was significantly enhanced approximately 2 times with mitotane, as quantified by confocal and automated high throughput microscopy. In vitro competition binding studies revealed that mitotane displaces radiolabeled PK11195 with an IC50 in the nanomolar range, compatible with its therapeutic concentrations. These findings indicate that TSPO may constitute a direct target of mitotane in human adrenocortical tumor cells. Overall, our results reveal that TSPO/STAR tandem may favor the intramitochondrial transport of mitotane. Coexpression of these two key factors may therefore represent a potential predictive factor of therapeutic responses, leading to a better management of ACC patients.

Publications

Boulate G et al. “Potentiation of mitotane action by rosuvastatin: New insightsfor adrenocortical carcinoma management”.
Int J Oncology (2019) 54: 2149-2156.

“Physical Interaction between TSPO/StAR accounts for Adrenocortical Selectivity of Mitotane Action”
En préparation 2019

Communications

- **SFE 2018, 35ème congrès de la Société Française d’Endocrinologie, Nancy, France, septembre 12-15**. Communication orale thématique « Corticosurrénalome » récompensée du Prix de la meilleure communication
« TSPO (translocator protein), une cible potentielle de l’action du mitotane dans le corticosurrénalome ? »
- **Journées Maladies Rares de Paris-Sud 2018, Paris, France, 19 novembre** : Poster
- **Session Master 2019, 24 juin** : 3ème Prix du Conseil départemental du Val de Marne.
- **ACC 2019, « 7th International Adrenal Cancer Symposium 2019 », Clermont Ferrand, France, septembre 27-29** : Communication orale.

Rapport

Ces travaux de recherche, apportent des données originales et ouvrent sur des implications importantes en carcinologie. Ces travaux se poursuivent actuellement sous la direction du Dr Larbi Amazit au sein du laboratoire INSERM U 1185. Une collaboration est en cours avec le Pr V. Papadopoulos de l’université Southern California (USC) pour préciser le rôle de TSPO dans les mécanismes d’entrée mitochondriale du mitotane.

Bourse de Fin de Thèse (6 mois) SFE 2017 (22 K€)

Dr Emilie COURTY
Codirection **Pr Jean Pierre RIVELINE & Dr Bertrand BLONDEAU**
INSERM U 1138, Centre de recherche des cordeliers, PARIS

Hypercorticisme chronique et adaptation du pancréas endocrine : identification des signaux inducteurs de la plasticité pancréatique.

Résumé

Les diabètes de type 1 et de type 2 sont caractérisés par une sécrétion insuffisante d'insuline et une diminution de la masse des cellules bêta. Dans un modèle murin d'insulino-résistance induit par administration chronique de glucocorticoïdes, nous avons mis en évidence une augmentation de la masse des cellules bêta par prolifération mais surtout par néogenèse de cellules bêta associée à une hypersécrétion d'insuline. Nos expériences de lignage endocrine ont révélé que les cellules bêta néoformées ne dérivent pas des cellules canalaires Sox9+ ou Ngn3+. L'invalidation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) dans le pancréas n'altère pas l'adaptation pancréatique par néogenèse dans notre modèle d'hypercorticisme, suggérant un effet indirect des GC sur la néogenèse de cellules bêta. Cette hypothèse a pu être confirmée par la mise en évidence de la présence dans le sérum des souris CORT d'un facteur capable de stimuler la néogenèse des cellules bêta in vitro. Nos résultats apportent la preuve d'une néogenèse induite de cellules bêta dans le pancréas adulte de souris insulino-résistantes résultant d'une communication inter organe.

Abstract

Type 1 and type 2 diabetes are characterized by an insufficient insulin secretion and a decreased beta-cell mass. In a mouse model of insulin resistance caused by chronic administration of corticosterone (CORT), we observed a massive increase of beta-cell mass through beta-cell proliferation but also beta-cell neogenesis associated with a massively increased insulin secretion. Our results using lineage tracing mouse models revealed that neoformed beta cells do not derive from ductal Sox9 or Ngn3 cells. Inactivation of the glucocorticoid (GR) receptor in the pancreas does not alter pancreatic adaptation by neogenesis in our model of hypercorticism, suggesting an indirect effect of GCs on beta cell neogenesis. This hypothesis could be confirmed by demonstrating the presence in the serum of CORT mice of a factor able to stimulate neogenesis of beta cells in vitro. Our results provide evidence of an active and indirect beta-cell neogenesis in the adult pancreas of insulin-resistant mice resulting from an inter organ communication.

Publication

Emilie Courty, Adrien Besseiche, Thi Thu Huong Do, Alexandrine Liboz, Fatima Mohamed Aguid, Evans Quilichini, Melissa Buscato, Pierre Gourdy, Jean-François Gautier, Jean-Pierre Riveline, Cécile Haumaitre, Marion Buyse, Bruno Fève, Ghislaine Guillemain, and Bertrand Blondeau. Adaptive β-Cell Neogenesis in the Adult Mouse in Response to Glucocorticoid-Induced Insulin Resistance.
Diabetes 2019; 68: 95–108.

L'hypercorticisme est associé à des perturbations métaboliques (résistance à l'insuline et altération de la sécrétion d'insuline) pouvant conduire à un diabète. Notre but est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces altérations fonctionnelles. Pour cela nous avons développé un modèle d'hypercorticisme chronique chez la souris par administration de corticostérone à forte dose (30 mg/kg/j) pendant 4 semaines (souris CORT). Ces souris développent une insulino-résistance sévère associée à une adaptation du pancréas endocrine : sécrétion accrue d'insuline, augmentation massive (x4) de la masse des cellules bêta résultant d'une prolifération accrue des cellules bêta mais aussi d'une néogenèse de cellules bêta.

Nous nous sommes alors intéressés à l'origine des nouvelles cellules bêta et avons notamment voulu définir si la néogenèse des cellules bêta récapitule le programme de différenciation fœtale. En effet il a été décrit dans d'autres modèles que de nouvelles cellules bêta peuvent se former à partir de cellules canalaires (marquées par l'expression de Sox9) et ré expriment le facteur de transcription fetal pro-endocrine Ngn3 mais cette hypothèse reste controversée. C'est pour cela que nous avons développé 2 modèles de lignage cellulaire endocrine permettant d'étudier 1) si la néogenèse se faisait par réexpression du facteur de transcription Ngn3 (souris Ngn3-Cre-ERTM) et 2) si elle se faisait par différenciation de cellules canalaire (souris Sox9-Cre-ERTM). Ce modèle permet de marquer de façon inductible et irréversible les cellules. En parallèle le traitement CORT a été administré à ces mêmes souris pendant 4 à 6 semaines. Après le traitement les ilots ont été isolés et analysés par FACS. De manière surprenante nous avons pu exclure ces hypothèses tant au niveau de la réexpression de Ngn3 que de l'origine canalaire. D'autre part nous nous sommes intéressés à la transdifférenciation de cellules alpha en cellules bêta grâce à des co-marquages insuline/glucagon et nous n'avons pas pu mettre en évidence ce processus.

Par ailleurs, nous avons pu montrer que l'adaptation pancréatique n'était pas une conséquence directe du traitement CORT sur le pancréas puisque les souris invalidées pour le récepteur aux glucocorticoïdes spécifiquement au niveau pancréatique (GRlox/lox*Pdx-Cre) présentent une adaptation pancréatique par néogenèse en réponse à la CORT. Notre avons donc émis l'hypothèse que l'adaptation pancréatique résulte d'une stimulation par un facteur circulant produit un/ou des tissus périphériques insulino résistants tel que le foie, les tissus adipeux ou les muscles.

Pour étudier cette hypothèse, nous avons cultivé des pancréas embryonnaires avec le sérum de nos souris traitées à la CORT. Comme décrit dans la littérature la culture de pancréas embryonnaire en présence de GC diminue la fraction de cellules bêta alors que l'insuline n'a pas d'effet. Néanmoins le sérum de souris CORT entraine une augmentation par 2 de la fraction de cellules bêta, confirmant l'existence dans le sérum d'un facteur capable de stimuler la néogenèse des cellules bêta.

Nos résultats apportent la preuve d'une néogenèse de cellules bêta pancréatiques dans un contexte d'hypercorticisme chez la souris et montre l'importance du rôle de la communication inter organe dans le contrôle de la masse et de la fonction bêta.

Identifier le ou les facteurs circulants capable de stimuler cette néogenèse de cellules bêta constitue une piste thérapeutique potentielle dans le maintien ou la régénération de la masse pancréatique endocrine. Bien qu'il soit évident que l'administration de GC ne soit pas un traitement pour les diabétiques compte tenu de leurs effets diabétogènes, identifier les mécanismes et signaux inducteurs de cette néogenèse est primordiale dans la mise en place de nouveaux traitements des diabètes.

Bourses SFE « NANCY 2018 »

Bourse de « Master » mutualisée – Surrénales (1 an) HRA Pharma & SFE 2018 (32 K€)

M. Nicolas TONG YETTE
Codirection **Pr Olivier CHABRE & Dr Ali BOUAMRANI**
INSERM U 1036, Climatec, CEA/LETI, Minatec Campus, GRENOBLE

Analyse protéomique per opératoire des adénomes hypophysaires : pour un diagnostic topographique extemporané des microadénomes corticotropes non visualisables en radiologie.

Résumé

Les adénomes corticotropes sont souvent difficiles à diagnostiquer du fait de leur petite taille. Leur exérèse nécessite alors une exploration chirurgicale parfois extensive et délétère pour la fonction hypophysaire. Notre objectif est la mise au point d'un outil diagnostic peu invasif et dont la rapidité d'analyse le rendrait utilisable au cours d'une chirurgie. Nous avons inclus 19 prélèvements d'adénomes corticotropes et 4 d'hypophyses saines. Après étude de leurs profils protéomiques et lipidomiques en imagerie par spectrométrie de masse (MSI) nous avons confronté leurs segmentations non-supervisées et à leurs lectures histopathologiques. Cela a permis d'envisager l'ACTH comme biomarqueur d'adénomes corticotropes en imagerie spectrométrique, d e même que d'autres peptides également issus de la dégradation de proopiomélanocortine, tel que la β-endorphine.

Abstract

Corticotroph adenomas are often difficult to diagnose due to their small size. In that event their excisions have to start with surgical explorations, which sometimes are extensive and deleterious for the physiological function of the pituitary gland. Our objective is to develop a diagnostic tool minimally invasive and whose quick analysis makes it possible to be used during a surgery time. We included 19 corticotroph adenomas samples and 4 healthy pituitary samples. After analysis of their proteomic and lipidomic profiles in mass spectrometry imaging (MSI) we compared their unsupervised segmentations versus their histopathological readings.

This enabled us to consider ACTH as a biomarker of corticotroph adenomas in MSI, as well as other peptides also resulting from the degradation of proopiomelanocortin, such as β-endorphin.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Dix-neuf prélèvements adénomateux corticotropes et 4 prélèvements de tissus hypophysaires sains ont été étudiés en 2019. Ces prélèvements sont issus du centre de ressources biologiques (CRB) ou du bloc opératoire de Clinatec.

Etude en MSI par ionisation laser assistée par matrice (MALDI MSI), du prélèvement adénomateux C 19, correspondant à un fragment d'adénome corticotrope: Segmentation supervisée

De par sa petite taille, le prélèvement C 19 est représentatif d'un fragment opératoire de micro adénome corticotrope. Il mesure en effet moins de 2 mm de longueur pour 1 mm de largeur. Ce type de fragment est difficile à analyser à la fois en imagerie par spectrométrie de masse, mais également en anatomopathologie. Après acquisition MALDI l'analyse des données obtenues par segmentation non supervisée permet d'identifier les segments tissulaires dont les spectres ont un profil semblable. Ainsi dès la première segmentation deux régions tissulaires se distinguent (Figure 6). L'étude des spectres moyens de ces contingents montre une intensité relative plus importante du pic en m/z 4550 représentatif de l'ACTH dans la région B (Figure 7). La région B semble donc correspondre à la partie adénomateuse du prélèvement. Cela a été confirmé au cours de la segmentation supervisée par la lecture anatomopathologique (Figure 8B). Néanmoins cette région est plus étendue que l'adénome identifié par l'anatomopathologiste. Pour un résultat plus conforme il faut aller plus en aval dans la classification hiérarchique. On constate alors une région D (Figure 8C) qui semble mieux correspondre morphologiquement à la région identifiée comme adénomateuse en segmentation supervisée. La correspondance est également meilleure d'un point de vu spectrométrique, avec des spectres quasiment superposables (Figure 9) et un indice de corrélation des pics de 0,99. Ces spectres semblent ainsi définir le sous type histologique corticotrope de l'adénome du prélèvement C19. Néanmoins identifier une zone pituitaire surexprimant de l'ACTH permet avec une bonne spécificité d'identifier un adénome corticotrope : AUC 0.918 (ACTH intensité 0.77, sensibilité 83% et spécificité 89%).

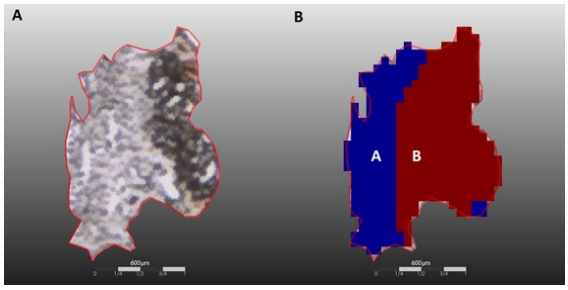


Figure 6 : segmentation non supervisée du prélèvement C 19 *:*

A - *coupe du prélèvement C 19.*

B - *recherche spectrométrique de l'adénome par segmentation non supervisée.*

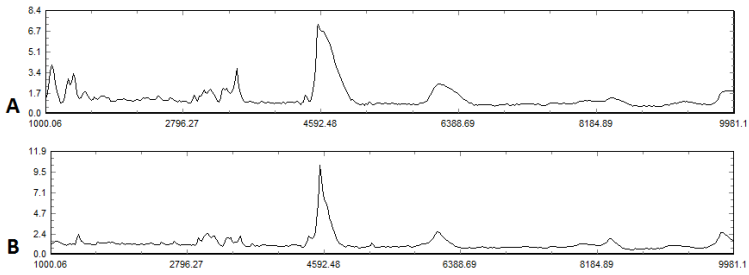


Figure 7 : spectres moyens du prélèvement C 19 :

A - *spectre de la région A.*

B - *spectre de la région B, dont l'intensité relative du pic représentatif de l'ACTH est plus importante (échelles variables).*

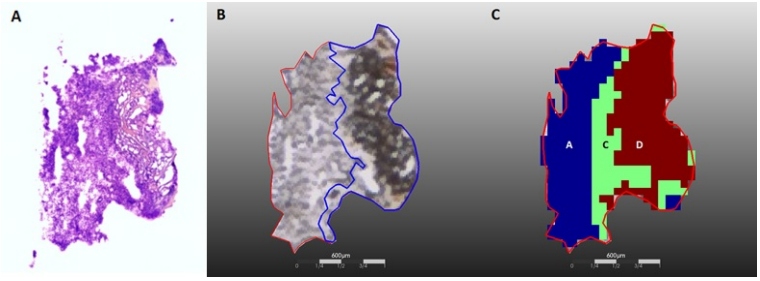


Figure 8 : Segmentation supervisée du prélèvement C 19 *:*

A - *coupe du prélèvement C 19 après retrait de matrice et coloration HE.*

B - *Segmentation supervisée.*

C - *nouvelle recherche segmentation non supervisée, s'avérant plus conforme à la segmentation anatomopathologique.*

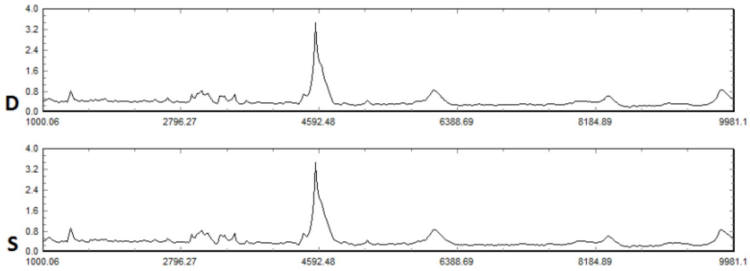


Figure 9 : spectres moyens du prélèvement C 19 :

D - *spectre de la région D.*

S - *spectre de la région identifiée comme adénomateuse en segmentation supervisée.*

Etude en MALDI MSI du prélèvement adénomateux C 04, correspondant à un fragment d'adénome corticotrope : Etude de l'ACTH.

L'étude d'un prélèvement adénomateux après segmentation supervisée permet de concentrer l'analyse spectrométrique sur sa région adénomateuse. Ainsi l'analyse en composante principale des spectres moyens des zones adénomateuses et saines du prélèvement C 04 identifie l'ACTH comme élément le plus discriminant des deux contingents (première composante principale, PC1) (Figure 10). Le second peptide identifié est la β-endorphine (PC2), qui est à l'instar de l'ACTH un produit de dégradation de la préhormone POMC. Ce pouvoir discriminant de l'ACTH est étudié plus en détail dans au travers d'une courbe ROC (Figure 11). Cette dernière affiche une AUC de 0.956 (sensibilité 0.90, spécificité 0.95) laissant envisager l'ACTH comme un bon biomarqueur de l'adénome corticotrope.

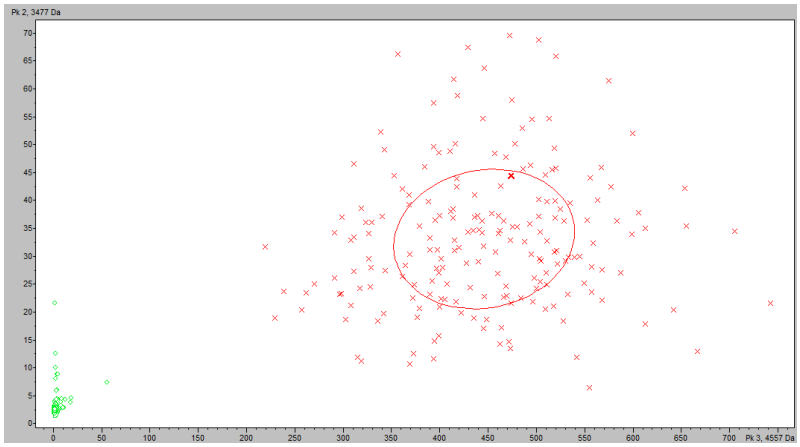


Figure 10 : Analyse en composante principale des spectres moyens des zones adénomateuse et saines du prélèvement C 04.

Zone adénomateuse en rouge.

Zone saine en vert. Composante principale 1 (PC1) : ACTH à m/z 4557 Da, et PC2 : β-endorphine à m/z 3477 Da.

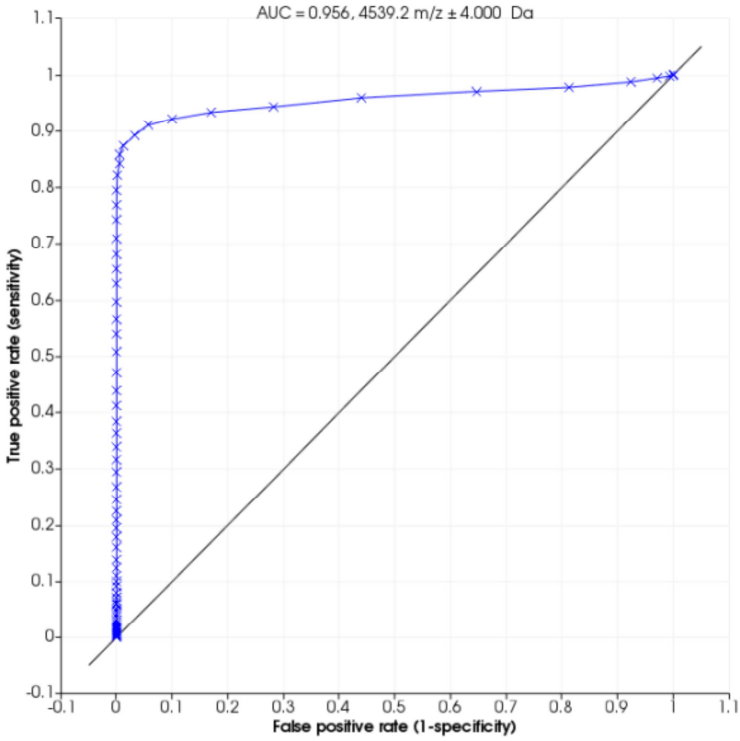


Figure 11 : ROC du prélèvement C 04 mesurant la performance de l'ACTH pour la distinction entre adénome corticotrope et tissu sain.

Bourse de « Master » (1 an) IPSEN 2018 (32 K€)

Mlle Patricia VADUVA
Direction **Pr Jérôme BERTHERAT**
INSERM U 1016 - CNRS UMR 8104 - Institut Cochin, PARIS

Génétique du syndrome de Cushing : Etude de l'hyperplasie macronodulaire de la surrénale.

Résumé

Les altérations du gène *ARMC5* expliquent 80% des formes familiales et 25% des formes sporadiques d'hyperplasie macronodulaire bilatérale primitive des surrénales (HMBS) et sont responsables d'un phénotype clinique très variable, mais globalement plus sévère que celui des patients sans altération. Ceci évoque l'existence d'autres facteurs génétiques causals de la maladie et de facteurs modificateurs phénotypiques. L'objectif de ce travail est donc de rechercher de nouveaux gènes causals de l'HMBS et des gènes modificateurs du phénotype clinique.

Pour ce faire, 393 patients porteurs d'HMBS ont bénéficié d'un séquençage ciblé NGS (Next Generation Sequencing) pour 27 gènes, les variants pathogènes d'intérêt étant ensuite séquencés par la méthode Sanger. L'étude phénotypique était basée sur des paramètres anthropométriques, biologiques, morphologiques surrénaliens et thérapeutiques.

Après analyse de 354 échantillons, nous retrouvons plusieurs nouveaux gènes pouvant être impliqués dans la survenue de l'HMBS chez les patients sans mutation de *ARMC5*. Des variants pathogènes de ces gènes pourraient expliquer une partie des cas d'HMBS, non expliqués par ARMC5. Les patients ayant des variants pathogènes pour ces gènes causals candidats présentaient un phénotype clinique relativement homogène et peu sévère, contrairement aux patients mutés *ARMC5* qui avaient un hypercortisolisme intense. Parallèlement l'étude du phénotype clinique des patients a permis de mettre en évidence, à partir de l'analyse de divers gènes impliqués dans la pathologie surrénalienne, des gènes modulateurs phénotypiques.

Cette étude suggère l'existence de nouveaux gènes causals de l'HMBS et de laisser supposer que le phénotype clinique des patients atteints est dépendant d'altérations de gènes modulateurs.

Abstract

Alterations in the *ARMC5* gene explain 80% of familial forms and 25% of sporadic forms of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia (PBMAH) and are responsible for a highly variable, generally more severe, clinical phenotype than the one of patients without any alteration. This evokes the existence of other causal genetic factors of the disease and phenotypic modifying factors. The objective of this work is therefore to search for new causal genes for HMBS and genes that modify the clinical phenotype.

To do this, next generation sequencing was practiced on DNA samples of 393 patients with PBMAH for 27 genes, the pathogenic variants of interest being then sequenced by the Sanger technique. The phenotypic study was based on anthropometric, biological, morphological and therapeutic parameters.

After analyzing 354 samples, we find several new genes that may be involved in the occurrence of PBMAH in patients without *ARMC5* mutation. Pathogenic variants of these genes could explain some of the cases of PBMAH, unexplained by *ARMC5*. Patients with pathogenic variants for these candidate causal genes had a relatively homogeneous and mild clinical phenotype, as opposed to *ARMC5* mutated patients having an intense hypercortisolism. In parallel, the study of the clinical phenotype made it possible to highlight, from the analysis of various genes involved in the adrenal pathology, phenotypic modulator genes.

This study suggests the existence of new causal genes for HMBS and suggests that the clinical phenotype of affected patients depends on alterations in modulator genes.

Communication

ECE 2019, 21th European Congress of Endocrinology, Lyon, France, may 18-21. Anna Vaczlavik, Patricia Vaduva, Lucas Bouys, Mario Néou, Amandine Septier, Victor Heurtier, Rossella Libé, Matthias Kroiss, Françoise Borson-Chazot, Philippe Chanson, Marie-Christine Vanthygem, Antoine Tabarin, Guillaume Assié, Constantine Stratakis, Maria Fragoso, Bruno Ragazzon, Jérôme Bertherat.

Genetic predisposition to Primary Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia (PBMAH): next generation sequencing ARMC5, NR3C1 (Glucocorticoid Receptor) and PDE11A4 (Phosphodiesterase 11) in 389 patients.

Rapport

Le séquençage ciblé par NGS (Next Generation Sequencing) de 27 gènes chez 354 patients présentant une hyperplasie macronodulaire bilatérale primitive des surrénales a permis d'identifier un petit nombre de gènes candidats causals de la maladie. Pour le design du panel de gènes à séquencer ont été choisis 13 gènes impliqués dans la tumorigenèse corticosurrénalienne (acteurs des voies AMPc/PKA : GNAS, PRKACA, PRKAR1A, PDE8B, PDE11A ; acteurs de la voie Wnt/bétacaténine : CTNNB1, ZNRF3, RNF43 ; ainsi que NR3C1, StAR, CYP11B1, LHCGR et ARMC5) et 14 gènes dont l'implication était suggérée par l'étude de l'exome de l'ADN leucocytaire et tumoral de patients avec HMBS, sans mutation *ARMC5*.

Sur les 5 100 variants initialement identifiés, 524 ont été retenus après application de plusieurs filtres : maintien uniquement des variants rares (fréquence < 0.5% en population générale) non synonymes, exoniques et touchant les sites d'épissage, suivie d'un contrôle visuel de la qualité du séquençage, afin d'éliminer les artefacts.

Un petit nombre de gènes causals candidats a été retenu, présentant des variants classés pathogènes, sur la base du type de mutation ponctuelle, de prédictions in silico, par les logiciels SIFT® et PolyPhen2® et la fréquence de ces variants en population générale. Ces gènes, aux fonctions diverses, pourraient expliquer une partie des cas d'hyperplasie macronodulaire bilatérale primitive des surrénales, non causés par des altérations du gène ARMC5. Quatre-vingt-six pourcent des variants pathogènes retrouvés par NGS pour ces gènes causals candidats ont été confirmés par la méthode Sanger, cette corrélation montrant la grande qualité de la technique NGS utilisée.

L'analyse du phénotype clinique s'est basée sur des paramètres anthropométriques et morphologiques surrénaliens, des tests recherchant la présence de récepteurs illégitimes et leur type, l'évaluation des complications de l'hypercorticisme et le type de prise en charge thérapeutique.

Les patients ayant des variants pathogènes pour ces gènes causals candidats présentaient un phénotype clinique relativement homogène et peu sévère, contrairement aux patients mutés ARMC5 qui avaient un hypercorticisme intense avec élévation du cortisol libre urinaire des 24 heures et suppression de l'ACTH plus marquée, surrénales plus grandes et avec plus de nodules que le groupe ARMC5 sauvage. Les patients mutés pour ARMC5 présentaient plus de complications de l'hypercorticisme tel le diabète et l'hypertension artérielle se traduisant par une moindre abstention thérapeutique.

Parallèlement cette étude du phénotype clinique a permis de mettre en évidence, à partir de l'analyse de divers gènes impliqués dans la pathologie surrénalienne, des gènes modulateurs phénotypiques de l'HMBS. Ainsi la survenue concomitante de mutations ARMC5 et de variants pathogènes des gènes modulateurs pouvaient engendrer un phénotype clinique moins sévère que celui des patients uniquement mutés pour ARMC5.

Afin de valider la pathogénicité des variants de nos gènes d'intérêt et déterminer leur fonction, des études fonctionnelles in vitro devront être réalisées.

Bourse de « Master » Recherche en Endocrinologie (1 an) NOVARTIS Pharma 2018 (32 K€)

Mlle Malanie ROY
Direction **Dr Michael THOMAS**
INSERM U 1239, MONT-SAINT-AIGNAN

Mise en forme et amélioration de l'efficacité anti-tumorale du mitotane par vectorisation.

Résumé

Le mitotane, traitement médical de première intention du corticosurrénalome, présente plusieurs contraintes liées à sa faible biodisponibilité et à son caractère lipophile. L'objectif de notre projet a été de tester *in vitro* un processus de vectorisation du mitotane à usage parentéral, dans le but de mieux cibler les cellules corticosurrénaliennes et ainsi d'améliorer l'efficacité, la rapidité d'action thérapeutique et de limiter les effets secondaires du mitotane. Nous avons démontré la capacité de cette nouvelle formulation vectorisée du mitotane à pénétrer dans les cellules H295R issues d'une lignée de corticosurrénalome humain. Le mitotane vectorisé exerce des effets cytotoxiques et anti-sécrétoires sur les cellules H295R, liés à des modifications de paramètres mitochondriaux. Ainsi, la preuve de concept de son efficacité *in vitro* a été démontrée et va permettre l'exploration de son pouvoir anti-tumoral dans un modèle de xénogreffe.

Les résultats de ce projet sont soumis à une clause de confidentialité.

Abstract

Mitotane is the first-line medical treatment for adrenocortical carcinoma, despite its poor bioavailability and highly lipophilic nature. The aim of this project is to study in vitro an intravenous vectorised formulation of mitotane, in order to increase its efficiency, to accelerate its onset of action and to minimize its adverse effects. We demonstrated the effectiveness of this new vectorised formulation to penetrate in H295R cells, which have been generated from a human adrenocortical carcinoma. The vectorised mitotane shows cytotoxic and anti-secretory effects on H295R cells, in response to changes in mitochondrial parameters. Thus, the proof-of-concept of its efficiency has been demonstrated and will allow us to further explore its anti-tumour activity in an animal xenograft model.

The results of this project are subject to a confidentiality clause.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Prix de Recherche en Endocrinologie (1 à 3 ans) PFIZER 2018 (30 K€)

Dr Charlotte LUSSEY
Direction **Pr Anne-Paule GIMENEZ-ROQUEPLO**
INSERM U 970, Service de Médecine Nucléaire, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Département de Biophysique, Faculté de médecine Sorbonne Université, PARIS

RADIOSUCCES : évaluation de la détection in vivo du succinate par imagerie de résonance magnétique spectroscopique (1H-SRM) comme Biomarqueur de la réponse au traitement chez des patients atteints de paragangliomes cervicaux avec mutations SDHX traités par radiothérapie externe.

Résumé

Contexte : les paragangliomes (PGL) sont des tumeurs rares héréditaires dans 40% des cas, dont les gènes les plus fréquemment impliqués sont les gènes SDHx (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD) codant les 4 sous-unités de l'enzyme mitochondriale succinate déshydrogénase (SDH). L'accumulation de succinate, le substrat de la SDH, est un biomarqueur très spécifique de ces mutations. Récemment, nous avons démontré la possibilité de détecter et de quantifier le succinate dans les tumeurs in vivo, par spectroscopie par résonance magnétique (1H-SRM). Les patients porteurs de ces mutations développent fréquemment des PGL cervicaux dont le traitement de choix est la radiothérapie externe (RTE). L'objectif de ce projet est de déterminer la faisabilité de l'utilisation de la 1H-SRM pour l'évaluation de la réponse précoce à la radiothérapie externe chez des patients présentant des PGL cervicaux SDHx.

Protocole : Tous les patients atteints de PGL cervicaux avec une indication de RTE seront inclus dans cette étude prospective française multicentrique. A l'inclusion une séquence centrée sur la lésion sera systématiquement réalisée avant la RTE. Puis au cours du suivi, une nouvelle séquence de 1H-SRM sera réalisée à 3 mois et 12 mois de la fin de la RTE pour les patients présentant un pic de succinate en pré-traitement. Le critère de référence sera l'évolution clinique et radiologique du PGL à 3 et 12 mois post-RTE et l'analyse génétique constitutionnelle.

Résultats attendus : le très bon contrôle tumoral obtenu par la RTE (>90%) implique probablement une mort de la totalité des cellules tumorales même en l'absence de régression de la tumeur. Dans ce contexte le pic de succinate devrait complètement disparaître après traitement.

Abstract

Context: Paragangliomas (PGL) are rare neuroendocrine tumors. Nearly 40 % of patients with PPGL carry a germline mutation in one of the 13 PPGL predisposing genes identified so far, and the most frequently involved are the SDHx genes (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2) encoding the four subunits and the assembly factor of succinate dehydrogenase (SDH), a mitochondrial enzyme of the tricarboxylic acid (TCA) cycle that oxidizes succinate into fumarate. In PPGL patients carrying a germline heterozygous mutation on an SDHx gene, somatic loss of the remaining allele induces a complete SDH loss-of-function, which results in the accumulation of succinate in the tumor. Recently, we demonstrated the faisability of detecting and quantifying succinate in tumors in vivo by magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS). Patients carrying SDHx mutations frequentely develop head and neck PGL whose treatment of choice is external beam radiotherapy (EBR). The objective of this project is to determine the feasibility of using 1H-MRS for evaluation of early response to EBR in patients with SDHx-mutated head and neck PGL.

Patients and Methods: All patients with head and neck PGL with an indication of EBR will be included in this prospective French multicentric study. 1H-MRS will be systematically added to routine angioMRI of the PGL before treatment, 3 months and 12 months after the end of EBR. The gold standard will be the clinical and radiological evolution of PGL at 3 and 12 months post-EBR and germline genetic analysis.

Expected results: very good tumor control obtained with EBR (> 90%) probably implies tumor cell death even in the absence of morphological regression of the tumor. In this context, the succinate peak should completely disappear after treatment.

Publication

Ce travail n’a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Rapport

Le projet est encore dans la phase des démarches technico-réglementaires.

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 an) SFE 2018 (28 K€)

Dr Isabelle BEAU

INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Hyperandrogénie et anovulation chez la femme associées à une mutation activatrice du récepteur de la LH : étude d'un modèle de souris comme preuve de concept.

Résumé

Le récepteur de l'hormone lutéinisante (LHCGR) joue un rôle essentiel dans la reproduction. Il appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et exerce son action par la voie Gαs / AMPc / protéine kinase A. Chez les garçons, des mutations activatrices (gain de fonction) du LHCGR sont associées à une forme familiale de puberté précoce indépendante des gonadotrophines, également appelée testotoxicose. A ce jour, aucun phénotype apparent n'a été décrit chez les quelques filles porteuses de mutations activatrices du LHCGR. Pour la première fois, dans le service d'Endocrinologie et maladies de la reproduction de l'hôpital Bicêtre (Pr J. Young), nous avons découvert une mutation de ce récepteur chez une patiente présentant une hyperandrogénie sévère et une anovulation post-pubertaire. Nous avons caractérisé cette mutation sur le plan moléculaire et montré qu'elle était activatrice. L'objectif de ce projet est de valider cette notion nouvelle en générant un modèle knock-in de souris avec la mutation activatrice du récepteur de la LH portée par la patiente, et de caractériser le phénotype résultant. Dans ce but, nous avons obtenu un financement par Phenomin « Mouse models and rare diseases », qui a permis de générer par la technique crispr-cas9 le modèle murin. Actuellement, nous amplifions la lignée pour analyser de manière exhaustive le phénotype de ce modèle murin. Par ailleurs, nous tenterons de comprendre pourquoi cette mutation activatrice de LHCGR est responsable de l'apparition du phénotype chez cette femme. Nous procéderons à une étude comparative de toutes les mutations activatrices naturelles du LHCGR répertoriées dans la littérature et identifiées chez des garçons atteints de puberté précoces.

Abstract

The luteinizing hormone receptor (LHCGR) plays an essential role in reproduction. It belongs to the family of G-protein-coupled receptors and acts *via* the Gαs/cAMP/protein kinase A pathway. In boys, LHCGR activating mutations are associated with a familial male-limited gonadotropin independent precocious puberty also termed testotoxicosis. To date, no apparent phenotype has been described in the few girls carrying LHCGR activating mutations. For the first time, in the Department of Endocrinology and Reproductive Diseases at Bicêtre Hospital (Pr J. Young), we discovered a mutation of this receptor in a woman with severe hyperandrogenesis and post-pubertal anovulation. Thanks to functional studies we demonstrated in vitro that the mutated receptor was constitutively active. The objective of this project is to validate this new concept by generating a knock-in mouse model with the patient's LH receptor activating mutation, and to characterize the resulting phenotype. To this end, we obtained funding from Phenomin "Mouse models and rare diseases", which made it possible to generate the mouse model using the crispr-cas9 technology. Currently, we are amplifying the strain to fully analyze the phenotype of this mouse model. In addition, we will try to understand why this LHCGR activating mutation is responsible for the appearance of the phenotype in this woman. We will conduct a comparative study of all natural LHCGR activating mutations reported in the literature and identified in boys with early puberty.

Publication

Ce travail n'a donné lieu à aucune publication ou communication à ce jour.

Les gonadotrophines sont des hormones peptidiques essentielle au développement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. L'hormone lutéinisante (LH) est essentielle à la folliculogenèse ovarienne, elle exerce ses effets par un récepteur (LHCGR) couplé aux protéines G. Celui-ci est fortement exprimé dans les cellules de la thèque du follicule ovarien antral, dans les cellules de la granulosa matures, les cellules lutéinisées et les cellules du stroma. L'activation de ce récepteur par la LH stimule dans les cellules de la thèque, la production d'androgènes convertis ensuite en œstradiol par l'aromatase. La voie de signalisation canonique empruntée par la LH est la voie Gαs/AMPc/protéine kinase A. Des progrès récents ont été accomplis dans l'identification de nouveaux syndromes correspondant à des altérations génétiques de cette famille de récepteurs intervenant dans la reproduction. Deux types de mutations germinales ont été décrits pour les récepteurs des gonadotrophines: des mutations dites constitutives ou activatrices (gain de fonction) entraînant une activation du récepteur même en absence d'hormone ou des mutations inactivatrices (perte de fonction).

Chez les hommes, les mutations activatrice du LHCGR ont été associées à une forme familiale de puberté précoce indépendante des gonadotrophines, également appelée testotoxicose. Ces mutations activatrices sont hétérozygotes et héritées sur le modèle autosomique. Les garçons atteints ont une virilisation précoce, une croissance de la verge, une accélération de la vitesse de croissance et de la maturation osseuse, conséquence de niveaux élevés de testostérone malgré des concentrations de LH prépubertaires faibles. Cette production excessive de testostérone est liée à une hyperplasie des cellules de Leydig testiculaires.

A ce jour, aucun phénotype apparent n'a été décrit chez les quelques filles porteuses de mutations activatrices du LHCGR. La raison de ce paradoxe n'est pas encore connue, mais deux explications possibles ont été avancées. Tout d'abord, l'expression ovarienne du LHCGR est faible ou absente avant la puberté. Par conséquent, en absence d'expression du récepteur muté, aucune activation prématurée de LHCGR ne se produit dans les cellules de la thèque. Deuxièmement, une hypothèse non-exclusive est que l'action de la LH nécessite au préalable une action de la FSH. En fait, la FSH pourrait être nécessaire pour stimuler la formation d'un facteur paracrine dans les cellules de la granulosa préparant les cellules de la thèque à devenir sensibles à la LH et à commencer leur synthèse d'androgènes.

Une patiente caucasienne présentant un hirsutisme post-pubertaire sévère et une oligoménorrhée a été évaluée dans le service d'Endocrinologie et maladies de la reproduction de l'hôpital Bicêtre (Pr J.Young). Elle présentait une hyperandrogénie sévère et une anovulation d'apparition post-pubertaire. Nous avons découvert chez elle une mutation originale du récepteur de la LH présente à l'état hétérozygote. J'ai pu démontrer, in vitro, que cette mutation, était responsable d'une activité constitutive très importante avec une exacerbation de la transduction du signal intéressant la voie de l'AMPc. Cette découverte remet en cause la notion admise jusqu'à ce jour, de l'absence de conséquence phénotypique des mutations gain de fonction du récepteur de la LH dans le sexe féminin.

Objectifs du projet

Ce projet vise à démontrer pour la première fois l'implication d'une mutation activatrice naturelle du LHCGR dans une maladie affectant la femme associant hyperandrogénie, anovulation et infertilité. Pour valider cette nouvelle notion, nous avons obtenu un financement par Phenomin « Mouse models and rare diseases » nous permettant de générer un modèle knock-in de souris (KI) portant la même mutation activatrice du récepteur de la LH.

Résultats

Nous avons reçu les souris KI en mai 2019. Depuis nous avons lancé un élevage pour produire les souris hétérozygotes pour la mutation activatrice du LHCGR. Cette procédure est relativement longue pour obtenir le nombre de souris nécessaire à la réalisation du projet.

Nous analyserons les phénotypes reproductif, endocrinien, métabolique et pathologique de ce modèle. Les principales étapes sont les suivantes :

1. Analyse de la puberté et de la cyclicité des femelles
2. Evaluation du statut hormonal
3. Analyse histo- et immunohisto-logique des ovaires
4. Analyse de la capacité des femelles à se reproduire
5. Etude du statut métabolique

La deuxième partie du projet vise à comprendre l'apparition du phénotype chez la patiente. Pour cela nous allons réaliser une étude comparative de toutes les mutations activatrices naturelles du LHCGR identifiées chez des garçons atteints de puberté précoces et répertoriées dans la littérature.

Nous comparerons leur activité constitutive sur la voie de l'AMPc et nous évaluerons aussi d'autres voies de signalisation telles que les voies de Gαq/inositol/protéine kinase C, de la protéine kinase B, et d'ERK1/2.

Par ailleurs un nouveau concept de l'activation par dimérisation du récepteur de la LH a émergé ces dernières années. Le récepteur muté étant présent à l'état hétérozygote, nous analyserons s'il existe des interactions fonctionnelles entre les récepteurs sauvage et muté.

Cette partie sera réalisée au cours de l'année 2020 dans le cadre du Master 2 d'Océana Vieira Pinto.

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 an) SFE 2018 (28 K€)

Dr David L'HÔTE
Direction **Pr Joëlle COHEN-TANNOUDJI**
INSERM U 1133, Equipe Physiologie de l'Axe Gonadotrope, Université Paris Diderot (Paris 7), PARIS

Implication de la signalisation œstrogénique dans la régulation épigénétique du gène *Sf-1* au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire.

Résumé

L'expression précoce du facteur de transcription SF-1 est nécessaire à la différenciation du lignage gonadotrope durant le développement embryonnaire de l'hypophyse. Actuellement, les mécanismes épigénétiques régulant l'expression de ce gène sont peu connus. Afin de mieux les caractériser, nous avons conduit, à l'échelle génomique, une analyse de l'ouverture de la chromatine sur un ensemble de trois lignées cellulaires qui récapitulent trois stades de la différenciation du lignage gonadotrope. Cette analyse nous a permis d'identifier une nouvelle séquence régulatrice distale, dite enhancer, du gène *Sf-1*, dont l'activation transitoire est essentielle à l'initiation de l'expression de ce gène. Nous avons démontré que l'activation de cet enhancer est médiée par la fixation du récepteur des œstrogènes ERα. La fixation de ce facteur de transcription provoque un remodelage chromatinien à la fois au niveau de l'enhancer et du promoteur du gène *Sf-1*, conduisant à la transcription du gène. Notre étude a donc permis d'identifier le plus précoce des éléments régulateurs impliqué dans la différenciation du lignage gonadotrope et souligne l'importance d'ERα dans la régulation épigénétique de ce processus.

Abstract

Gonadotrope lineage differentiation is a stepwise process taking place during pituitary development. The early step of gonadotrope specification is characterized by the expression of the SF-1 transcription factor, a crucial factor for gonadotrope cell fate determination. However, the epigenetic mechanisms regulating *Sf-1* expression during early gonadotrope lineage specification are still poorly understood. Using whole genome chromatin accessibility analyses on three cell lines recapitulating gradual stages of gonadotrope differentiation, we demonstrated that a yet undescribed *Sf-1* enhancer is transiently recruited during gonadotrope specification. Using CRISPR/Cas9, we showed that this enhancer is mandatory for the emergence of *Sf-1* during gonadotrope specification. Furthermore, we demonstrated that binding of estrogen receptor α (ERα) is crucial for chromatin remodeling of *Sf-1* enhancer and promoter, leading to RNA polymerase recruitment and transcription of the gene. This study has thus identified the earliest regulatory sequence involved in gonadotrope lineage specification and highlights the key epigenetic role played by ERα in this differentiation process.

Publication

Journal Epigenetic and Chromatin. https://doi.org/10.1186/s13072-019-0291-8.

Rapport

Contexte

La différenciation du lignage gonadotrope est un processus graduel qui se déroule au cours du développement embryonnaire de l'hypophyse. Elle fait intervenir, dès les étapes les plus précoces, le facteur de transcription SF-1 (encore appelé NR5A1). Ce facteur de transcription est un acteur crucial pour la fonction gonadotrope puisque son inactivation hypophysaire chez la souris ou ses mutations chez l'humain entraînent un hypogonadisme hypogonadotrope et une stérilité de l'individu. L'expression du gène *Sf-1* au cours

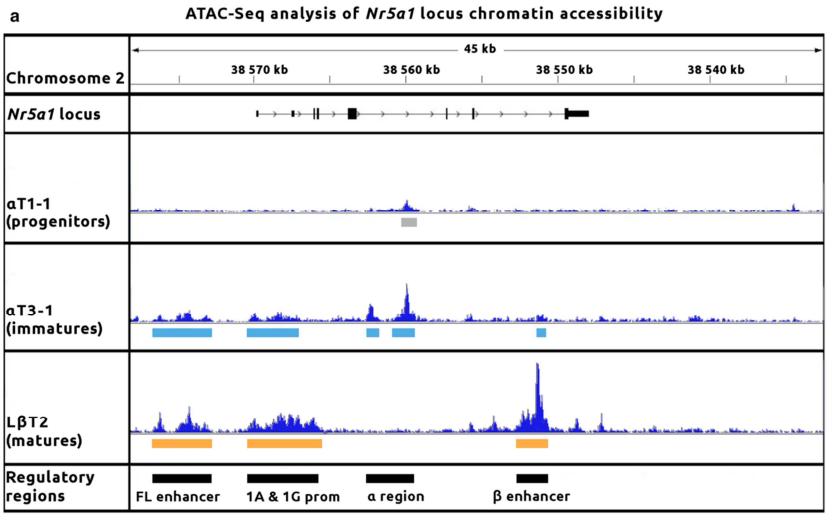
de l'embryogenèse constitue, à ce jour, le marqueur le plus précoce de l'identité du lignage gonadotrope hypophysaire. Malgré le rôle central de ce gène dans la fonction de reproduction, les mécanismes permettant l'initiation de son expression, et notamment les mécanismes épigénétiques, restent mal connus. Afin de mieux caractériser ces mécanismes, nous avons conduit une étude épigénétique sur un ensemble de trois lignées récapitulant trois stades de différenciation du lignage gonadotrope : précurseur (lignée αT1-1), immature (lignée αT3-1) et mature (lignée LβT2). Alors que l'expression de *Sf-1* est détectable dès le stade immature, les cellules précurseurs αT1-1 n'expriment pas encore ce facteur.

Principaux résultats

Les résultats décrits ici ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Epigenetic and Chromatin* (https://doi.org/10.1186/s13072-019-0291-8).

1) Mise en évidence d'une ouverture différentielle de la chromatine au cours de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire et découverte d'un nouvel enhancer potentiel.

Afin d'identifier de nouvelles séquences régulatrices potentiellement impliquées dans la différenciation du lignage gonadotrope, nous avons conduit, à l'échelle génomique, une étude de l'ouverture de la chromatine sur les trois lignées cellulaires modèles de la différenciation de ce lignage. Cette analyse nous a permis d'identifier dans le locus de *Sf-1* différentes régions qui montrent une ouverture différentielle de la chromatine selon le stade de différentiation : le promoteur, ouvert uniquement dans les cellules immatures et matures qui expriment *Sf-1 ;* un enhancer *(i.e.* une séquence cis régulatrice distale du site d'initiation de la transcription) déjà décrit dans les cellules de Leydig, ouvert lui aussi dans les cellules immatures et matures ; un autre enhancer que nous avons nommé enhancer β, déjà caractérisé par le groupe du Dr Morohashi et connu pour être actif dans les cellules gonadotropes, ouvert uniquement au stade mature ; et enfin une nouvelle région, ouverte principalement durant le stade immature, que nous avons nommée région α (figure ci-contre).



Afin de consolider ces résultats *in vivo*, nous avons mis au point un test de l'ouverture de la chromatine sur des hypophyses embryonnaires à différents stades de développement chez la souris. Nous avons pu montrer que l'évolution de l'ouverture des régions détectées *in vitro* s'observait de la même façon au cours du développement hypophysaire *in vivo*.

Cette étude apporte donc des données nouvelles sur les mécanismes responsables de l'émergence de *Sf-1* au cours de la différenciation gonadotrope. Jusqu'à présent, l'enhancer β était considéré, en effet, comme responsable de l'initiation de l'expression de *Sf-1* ; ceci est *a priori* improbable du fait de la dynamique de son ouverture chromatinienne. Nous avons donc choisi d'étudier plus finement le rôle joué par la région α dans l'émergence de *Sf-1* au cours de la différenciation gonadotrope.

2) La région α est un enhancer transitoirement activé au cours de la différenciation gonadotrope et indispensable à l'expression de *Sf-1* dans les cellules gonadotropes immatures.

Afin de déterminer si la région α est un enhancer, nous avons caractérisé les marques épigénétiques la décorant dans les trois lignées. Nous avons ainsi pu montrer que cette région est enrichie en marque H3K4me1 (monomethylation de l'histone 3 sur la lysine 4), une modification d'histone caractérisant les enhancers. Concernant la lignée précurseur et la lignée mature, dans lesquelles la région α est fermée, nous avons montré une hypermethylation des CpG de l'ADN, une marque répressive. Au contraire, dans la lignée immature, dans laquelle la région α

est ouverte, nous avons mis en évidence un enrichissement en histone acetylée (H3K27ac), une marque d'activation. Ainsi, la région α est bien un enhancer, actif uniquement dans les cellules αT3-1, au stade gonadotrope immature.

Nous avons ensuite démontré, par capture de la conformation chromatinienne, que la formation d'une boucle d'ADN rapproche physiquement l'enhancer α du promoteur du gène, suggérant que cet enhancer participe effectivement à la régulation de l'expression du gène *Sf-1*.

Ces conclusions ne permettent cependant pas de préjuger de l'importance de l'enhancer α dans la régulation du gène *Sf-1*. Afin d'élucider cette question, nous avons éliminé cet enhancer du génome des cellules αT3-1 par la méthode CRISPR-Cas9. Ceci conduit à une très forte réduction de l'expression de *Sf-1* démontrant que **l'enhancer α est une région cis-régulatrice cruciale pour l'expression du gène.**

3) Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de l'enhancer α au cours des étapes précoces de la différenciation gonadotrope.

Afin d'identifier des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'activité de l'enhancer α, nous avons conduit une analyse bio-informatique de sa séquence. Nous avons identifié un site potentiel de fixation des récepteurs des œstrogènes (ERE), correspondant parfaitement à la séquence consensus et montrant un degré de conservation très élevé chez les mammifères. Afin de tester l'importance de cet ERE, nous avons réalisé un test d'activité cis-régulatrice de l'enhancer α en système luciferase, en utilisant la séquence sauvage ou la séquence mutée pour l'ERE. La mutation de l'ERE abolit totalement l'activité cis-régulatrice de l'enhancer.

Nous avons ensuite montré que seul le récepteur ERα était exprimé dans les cellules gonadotropes immatures (et les précurseurs) et que son inhibition, aussi bien par des ARN interférents que par des ligands antagonistes, conduisait à une forte réduction de l'activité cis-régulatrice de l'enhancer α. Enfin, nous avons confirmé la fixation du facteur ERα sur l'enhancer α par immuno-précipitation de la chromatine.

Pour déterminer si la fixation d'ERα sur l'enhancer α est importante pour l'activation de l'enhancer et ainsi pour l'expression du gène *Sf-1*, nous avons créé un modèle de cellule αT3-1 dont l'enhancer α dans le génome n'a plus d'ERE. Dans ces cellules, l'expression du gène *Sf-1* est quasiment abolie, démontrant l'importance de cet ERE et de la fixation d'ERα pour l'activité de l'enhancer α. De plus, nous avons observé dans ces cellules mutantes une inhibition globale de l'enhancer, avec une diminution du recrutement des marques d'activation de la chromatine (notamment de la marque H3K27ac et de l'enzyme responsable de son dépôt, P300) et une forte méthylation des CpG de l'ADN. En parallèle, nous avons observé une diminution de l'enrichissement en histone acétylée sur le promoteur. **Ces résultats démontrent que la fixation d'ERα sur l'enhancer est responsable d'un remodelage chromatinien permettant le maintien de son activation, et que ces événements participent, à distance, à l'activation du promoteur du gène.**

Conclusions

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que le gène *Sf-1* est régulé par un enhancer dont l'activation est transitoire et néanmoins cruciale pendant les premières étapes de la différenciation du lignage gonadotrope hypophysaire. Nous avons mis en lumière l'importance de la signalisation œstrogénique dans la régulation de l'activité de ce nouvel enhancer et donc dans la régulation de l'expression du gène *Sf-1*.

Cet enhancer est actuellement la séquence cis régulatrice la plus précocement activée au cours de la différenciation du lignage gonadotrope. Nous continuons actuellement l'étude de mécanismes permettant son activation dans l'espoir de découvrir de nouveaux acteurs impliqués dans la spécification gonadotrope, essentielle à la reproduction chez les mammifères.

Allocation de Recherche en Endocrinologie (2 an) SFE 2018 (28 K€)

Dr David ROMANO
Direction **Pr Nicolas LEVY**
INSERM U 1251, MMG - Marseille Medical Genetics, Université Aix-Marseille, MARSEILLE

Pertinence des modèles de tumeurs neuroendocrines évalués sur le profil des kinases. (Relevance of neuroendocrine tumours models assessed by kinomic profiling.)

Résumé

Les thérapies actuelles utilisées pour traiter les tumeurs neuroendocrines digestives ont montré rapidement leur limite, principalement en raison d'une méconnaissance de la biologie de ces tumeurs. Dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, nous avons utilisé des approches dites "à haut débit" (protéomique, génomique et transcriptomique), permettant d'accumuler des données expérimentales visant à caractériser les tumeurs neuroendocrines et leur réponse à la pharmacologie. En particulier, nous avons identifié des familles de kinases hyperactivées dans les tumeurs résistantes aux traitements et ainsi candidates à un ciblage pharmacologique spécifique. Ces approches combinées nous ont donc permis de mettre en évidence des acteurs potentiels responsables de la résistance aux traitements et offrent la possibilité de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Abstract

Current therapeutic strategies used to treat digestive neuroendocrine tumors have quickly shown their limit, mainly due to a lack of knowledge of the biology of these tumors. In order to identify new therapeutic targets, we used so-called "high-throughput" approaches (proteomics, genomics and transcriptomics) to accumulate experimental data and characterize neuroendocrine tumors and their response to pharmacology. In particular, we identified hyperactivated kinases families in treatment-resistant tumors. These kinases thus represent potential candidates for specific pharmacological targeting. Altogether, these combined approaches have allowed us to highlight potential molecular markers responsible for resistance to treatment and offer the possibility of new therapeutic strategies.

Publication

Romano D. Relevance of neuroendocrine tumours models assessed by kinomic profiling.
Ann Endocrinol (Paris). 2019 Jun;80(3): 144-148. doi: 10.1016/j.ando.2019.04.008. Epub 2019 Apr 11. PubMed PMID: 31054767.

Gérard et al. Identification of markers of therapeutic resistance using kinomic profiling of neuroendocrine tumors.
Endocrine-related Cancer: in revision.

Despite the variety of therapeutics options for treating NETs (e.g. surgery, chemotherapies, somatostatin analogs molecularly targeted therapies), most of these treatments result in tumour growth stabilization, eventually followed by tumour progression. Despite their specificities, NETs exhibit similar resistance features to therapeutic strategies than other more common tumours. The proposed project aims at studying intracellular signalling networks responsible for resistance to therapeutic treatments classically used for this type of tumours.

Results:

We used BON-1 and QGP-1 NET cell lines, validated as good models to study NETs. We chronically exposed NET cell lines to physiologically relevant doses of Oxaliplatin (up to 2µM) and Everolimus (10nM), two different first-line therapeutic strategies, and thus generated *in vitro* cellular tools to study signalling mechanisms involved in acquired resistance to anticancer therapeutic strategies.

Using microarray-based kinomics, we identified hyperactivated “hit” kinases in newly generated drug resistant cell lines (e.g., FGFR, PKC). We then determined by standard biochemical methods (Western Blots) both expression and activation levels of these kinases. We observed a hyperphosphorylation of these “hit” kinases, validating kinomics data. However, we could not detect any overexpression of these kinases, suggesting that the increase in kinase activity resulted from a differential regulation of their catalytic activity. In addition, genomics and transcriptomics analysis of drug resistant cell lines failed to identify any potential constitutively active mutations or any increase in respective mRNA levels. Altogether, our data confirmed that enzymatic hyperactivation observed in drug resistance conditions is triggered by functional regulation of specific kinases.

We then used specific pharmacological inhibitors of “hit” kinases and assessed cell sensitivity by cell viability assay. We found that inhibition of hyperactivated kinases cells decreased specifically cell viability in drug resistant cells. These data suggest that targeted inhibition of abnormally active kinases restore cell sensitivity to therapeutic strategies in drug resistance conditions.

These data have been submitted for publication in Endocrine-Related Cancer (Gerard et al., in revision).

In addition, we produced an original pan-kinomic profile from NETs tumor samples. A first set of experiment has been performed on 20 frozen tumour samples (10 pancreatic, 6 intestinal, 4 metastasis) available from Institut Paoli-Calmettes (Marseille) tumour bank. Our analysis showed a correlation between Tyrosine kinase activities and WHO grade, suggesting that hyperactivity of specific Tyrosine kinases may lead to tumor aggressiveness. Kinomics profiles from NETs samples consider key criteria such as primary site, metastatic status and/or grade to cluster and characterize NETs. Multi-group comparison highlighted key kinases to be assessed as markers of tumor progression. For instance, we identified EGFR family kinase HER2/ErbB2, IGFR and FGFR as hyperactivated kinases in a G3 NET sample compared to G1/G2 NETs. Additional tumor samples will be required in order to obtain statistically robust kinase activity signature from NET samples. Kinomics may then be used as a theranostic tool based on functional data from specific enzymatic activities in tissue samples.

Conclusion and perspectives:

Because of the relative rarity of NETs and thus shortage of available material, our knowledge of this family of tumors is largely insufficient, leading to inappropriate and poorly efficient treatments. For this project, we used an innovative functional proteomics approach to assess at a large-scale molecular mechanisms involved in tumour relapse. Ultimately, this will lead to development of more efficient therapeutic strategies to (i) prevent resistance to treatment occurrence, (ii) circumvent acquired resistance, (iii) stratify NETs patients according their kinomics profiles. This will eventually enable a better care for this constantly growing in incidence family of tumours.

A review on NET models and their assessment using kinomics approach was published in 2019 (Romano et al., Ann Endoc, 2019).

Bourse de « Master » SFE 2018 (32 K€)

Mlle Mathilda KRETZ
Direction **Dr Valérie SIMONNEAUX**
CNRS UPR 3212, STRASBOURG

Effets des décalages horaires sur le contrôle journalier du pic préovulatoire de LH par les neurones à Kisspeptine.

Résumé

De nos jours, le système circadien est soumis à des perturbations (jet-lag, surexposition à la lumière bleue, diminution du sommeil, travail en horaires décalés…) induisant un effet négatif sur la santé. Chez la femme, des études indiquent que ces perturbations circadiennes peuvent conduire à une baisse de la fertilité. L'objectif du projet est d'analyser les mécanismes impliqués dans l'altération circadienne des rythmes reproducteurs chez les mammifères femelles. L'application d'un jetlag chronique pendant 3 semaines abolit totalement l'occurrence du pic préovulatoire de LH chez des souris femelles. Par ailleurs, l'injection centrale de vasopressine, un neurotransmetteur de l'horloge circadienne, avance le pic de LH d'environ une heure. Cette étude montre que le pic préovulatoire de LH peut être modifié par un jetlag chronique et par un signal nerveux journalier.

Abstract

Today, the circadian system is subject to disturbances (jetlag, overexposure to blue light, reduced sleep, shift work...) inducing a negative effect on health. In women, studies indicate that these circadian disturbances can lead to a decline in fertility. The objective of the project is to analyze the mechanisms involved in the circadian alteration of reproductive rhythms in female mammals. The application of a chronic jetlag for 3 weeks completely abolished the occurrence of the preovulatory LH surge in female mice. In addition, the central injection of vasopressin, a neurotransmitter of the circadian clock, advances the LH peak by about one hour. This study shows that the preovulatory LH surge can be modified by a chronic jetlag and a daily nervous signal.

Publication

Thibaut Bahougne, Mathilda Kretz, Nathalie Jeandidier, Valérie Simonneaux. Impact of circadian disruption on C57BL/6J female mice reproductive function.
Article en préparation.

Communications

- **Congrès des Gynécologues et Obstétriciens d'Alsace (CGOA) 2019, juin 13-14** : communication affichée.
- **European Center for Reproductive Endocrinology (EUCRE) 2019, Prato, septembre 2-4** : communication orale.
- **Soutenance du Master 2 de Recherche en Biomédecine, le 5 septembre 2019 : validé.**

De nos jours, le système circadien est soumis à des perturbations induisant des effets délétères sur la santé. Chez la femme, des études indiquent que ces perturbations circadiennes peuvent conduire à une baisse de la fertilité par dysovulation. L'objectif du projet est d'analyser les mécanismes impliqués dans l'altération circadienne des rythmes reproducteurs chez les souris femelles.

I. Effet du jetlag chronique sur l'axe reproducteur de souris femelles

1) Effet sur le pic préovulatoire de LH :

Les souris gardées en cycle 12L/12D (12 heures luminosité/12 heures obscurité) constant présentent un pic préovulatoire de LH le jour du proestrus à la transition repos/éveil (ZT12 ; Figure 1A). Par contre, chez les souris soumises à 3 semaines de jetlag chronique (alternance d'une avance de phase de 10 heures pendant 3 jours puis d'un retard de phase de 10 heures pendant 3 jours), le rythme de sécrétion de LH en proestrus est fortement perturbé. En effet chez toutes les souris examinées, le taux de LH à ZT12 est inférieur à 4 ng/ml (Figure 1B), alors que chez quelques souris échantillonnées à ZT4 et ZT8, le taux moyen de LH est supérieur à 4 ng/µl, mais avec des valeurs inférieures à celles généralement observées lors d'un pic préovulatoire de LH.

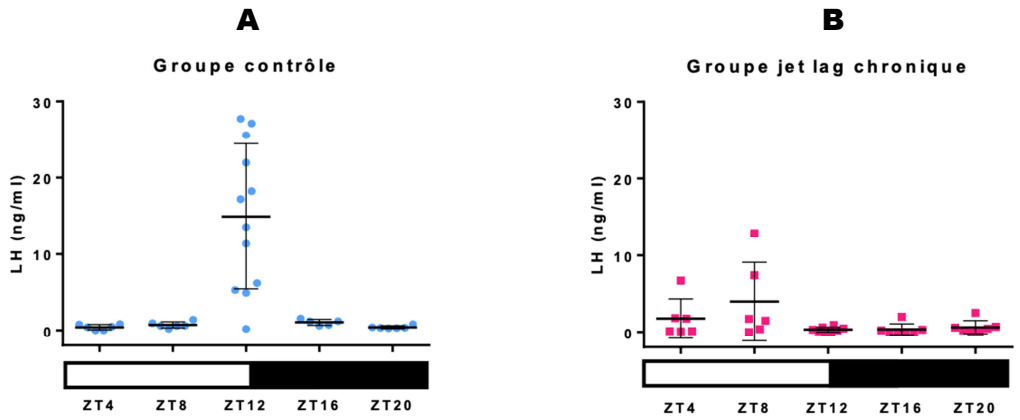


Figure 1 : Sécrétion journalière de LH le jour du proestrus chez des souris en rythme lumière/obscurité stable (A, contrôle) ou après 3 semaines de décalage horaire chronique (B, jetlag chronique). Les données montrées sont des valeurs individuelles et leur moyenne ± SEM de 6 à 7 souris. ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit ; la barre sous l'axe représente le jour (blanc) et la nuit (noir).

2) Effet sur la fertilité spontanée :

La fertilité des deux groupes de souris (12L/12D et décalage horaire chronique pendant 3 semaines) a été examinée après mise au mâle pendant une semaine. Les données préliminaires indiquent une diminution du taux de gestation dans le groupe décalage horaire. En effet, sur 14 souris dans chaque groupe, 12 (86%) souris sont gestantes dans le groupe contrôle contre 8 (57%) dans le groupe décalage horaire. Pour le moment, 57% des souris du groupe contrôle et 14% des souris du groupe décalage horaire ont mis bas (données préliminaires). Ces premiers résultats indiquent que le décalage horaire de 3 semaines retarderait la survenue d'une ovulation « optimale ».

II. Effet d'injections intracérébroventriculaires (icv) de peptides vasopressinergiques sur la sécrétion de LH

Des femelles C57BL/6J ont reçu une injection icv de Ringer, de vasopressine (VP) et d'antagoniste de la VP (aVP) à ZT6 le jour du proestrus. L'analyse statistique (Two-way ANOVA) met en évidence un effet significatif du temps (ZT) ($p<0,0001$) sur la sécrétion de LH.

La VP injectée à une dose de 3 ng/2µl avance le pic préovulatoire de LH d'environ 1 heure (Figure 2). L'injection de VP durant la phase de diestrus n'a aucun effet sur la sécrétion de LH. Suite à l'injection icv d'antagoniste de la VP à ZT 6, le pic de LH est retardé.

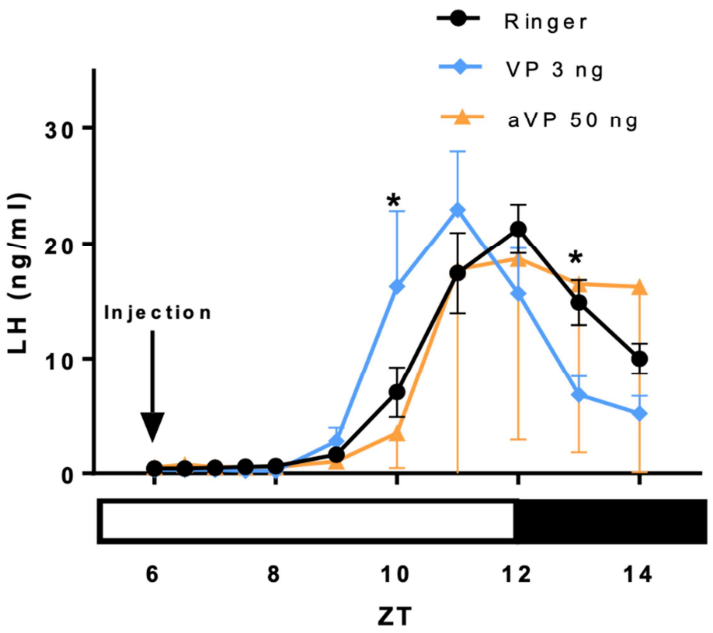


Figure 2 : Profil de sécrétion de LH chez des souris femelles après injection intracérébroventriculaire (flèche) de 2 µl de Ringer (noir) ou d'antagoniste vasopressinergique (aVP) aux doses de 50 ng/2µl (orange) ou 300 ng/2µl (rouge) à ZT6 le jour du proestrus. Les valeurs présentées sont la moyenne ± SEM de 5 souris (aVP50 ng), 3 souris (aVP300 ng) et de 16 souris (Ringer).
ZT : zeitgeber avec ZT12 correspondant au début de la nuit ; la barre sous l'axe représente le jour (blanc) et la nuit (noir).

En utilisant différentes approches sur un modèle de souris femelles, ce travail montre que la synchronisation du pic préovulatoire de LH dépend d'un message journalier stable. En effet le jetlag chronique perturbe fortement l'occurrence du pic de LH et l'application in vivo de VP, neurotransmetteur principal produit par l'horloge des noyaux suprachiasmatiques, décale le pic préovulatoire de LH. Bien que des études complémentaires soient encore nécessaires, ces travaux indiquent que le message journalier porté par la VP des NSC, est un acteur essentiel dans la cascade de signalisation qui conduit à la décharge hormonale de LH en fin de phase de repos provoquant l'ovulation. A terme, l'objectif serait de proposer des traitements aux femmes en dysovulation due à des perturbations circadiennes.

Bourse de Fin de Thèse (6 mois) SFE 2018 (22 K€)

Mlle Laurence DUMEIGE
Codirection **Dr Laetitia MARTINERIE & Dr Marc LOMBES**
INSERM U 1185, Faculté de Médecine Paris Sud, 63 Rue Gabriel Péri, LE KREMLIN-BICÊTRE

Impact de la prématurité et de la restriction de croissance fœtale sur les voies de signalisation corticostéroïdes rénales : adaptation néonatale et programmation fœtale de l'hypertension artérielle.

Résumé

La prématurité et la restriction de croissance fœtale (RCF) sont deux pathologies néonatales fréquentes, qui ont en commun des difficultés d'adaptation à la naissance, avec le développement d'une tubulopathie chez le prématuré, et le développement d'une hypertension artérielle (HTA) à l'âge adulte. L'objectif de ce travail était d'évaluer l'implication des voies de signalisation corticostéroïdes rénales dans la survenue de ces complications dans un modèle murin de prématurité induite par des lipopolysaccharides, et un modèle de RCF par exposition périnatale à la dexaméthasone. Dans ce travail nous avons montré que ces deux pathologies programment la survenue d'une HTA à l'âge adulte chez les mâles, associée à des altérations franches de la signalisation corticostéroïde rénale en période périnatale et une augmentation de la sensibilité rénale aux glucocorticoïdes à l'âge adulte. Dans le modèle de prématurité, nous avons identifié la transmission transgénérationelle d'anomalies de régulation de la pression artérielle chez les mâles jusqu'à la 3ème génération de souris, associée à une hypométhylation du promoteur de *Gilz* et une augmentation d'expression de *Gilz*.

Notre étude a permis l'identification de potentiels mécanismes moléculaires impliqués dans la programmation fœtale de l'HTA, sur plusieurs générations, ce qui pourrait aboutir à une meilleure prise en charge des patients nés prématurés ou avec une RCF, et de leurs descendants.

Abstract

Preterm birth and fetal growth restriction (IUGR) are prevalent neonatal diseases, which both induce poor perinatal adaptation, including the development of tubulopathy in premature infants, and the development of high blood pressure in adults. The objective of this work was to evaluate the involvement of renal corticosteroid signaling pathways in the development of these complications in a lipopolysaccharide-induced mouse model of preterm birth, and a dexamethasone-induced model of IUGR. In this work, we have shown that these two pathologies program the development of hypertension in former preterm and IUGR male mice, associated with strong alterations of renal corticosteroid signaling in the perinatal period, and an increase in renal sensitivity to glucocorticoids in adulthood. Moreover, we have identified a transgenerational inheritance of altered blood pressure regulation induced by preterm birth, in males, up to the 3rd generation of mice, associated with *Gilz* promoter hypomethylation and increased *Gilz* expression.

Our study has identified potential molecular mechanisms involved in the fetal programming of hypertension, over several generations. These findings could facilitate better management of patients born prematurely or with IUGR, and their offspring.

Publications

Dumeige L, Nehlich M, Viengchareun S, Pussard E, Lombès M, Martinerie L. Preterm birth is associated with epigenetic programming of transgenerational hypertension in mice.
Soumis.

Dumeige L, Storey C, Nehlich M, Viengchareun S, Pussard E, Lombès M, Martinerie L. Perinatal glucocorticoids exposure programs long-term hypertension.
Manuscrit en cours de préparation.

RESULTATS OBTENUS

La prématurité et la restriction de croissance fœtale (RCF) sont deux situations physiopathologiques néonatales fréquentes, qui ont en commun des difficultés d'adaptation à la vie extra-utérine au cours des premiers jours de vie, avec un retentissement fonctionnel important, notamment le développement d'une tubulopathie chez le nouveau-né grand prématuré ; et le développement d'une hypertension artérielle à l'âge adulte. Les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent le développement de ces complications ne sont que partiellement compris. L'objectif principal de ma thèse était d'évaluer l'impact de ces deux pathologies sur l'ontogenèse et la mise en place des voies de signalisation corticostéroïdes rénales, voies de signalisation impliquées dans la réabsorption de sodium dans le néphron distal sensible à l'aldostérone, afin d'évaluer leur rôle respectif dans le développement des complications rénales et cardio-vasculaires de la prématurité et de la RCF à court et long termes.

Pour étudier ces situations physiopathologiques, nous avons mis au point un modèle de prématurité modérée chez la souris, par une injection de lipopolysaccharides induisant la mise-bas à 18,5 jours de gestation. Le groupe contrôle était composé de mères gestantes ayant reçu le LPS mais n'ayant pas mis-bas prématurément, pour s'affranchir du rôle propre de l'inflammation sur les anomalies observées. Nous avons également mis au point un modèle de restriction de croissance fœtale par exposition de souris gestantes à de la dexaméthasone, entre 15,5 jours de gestation et 7 jours post-natal. Dans les deux expérimentations, nous avons ensuite étudié la descendance issue de ces mères traitées à divers stades développementaux, jusqu'à l'âge adulte.

Grâce à ces modèles, nous avons pu mettre en évidence que la mise-bas prématurée et l'exposition périnatale à la dexaméthasone étaient associées à des difficultés d'adaptation néonatale et une mortalité importante. En parallèle, nous avons observé des anomalies d'expression des voies corticostéroïdes rénales communes aux deux modèles, dont une expression plus faible de l'ARNm et de la protéine MR et de la 11βHSD2, qui s'associent à l'activation transcriptionelle paradoxale des gènes codant αENaC, Sgk1 et Gilz, probablement *via* l'activation du GR, dont l'expression n'est pas modifiée.

Dans nos modèles animaux, la prématurité et la restriction de croissance fœtale programmaient le développement d'une hypertension artérielle chez les mâles à l'âge adulte. L'exposition périnatale à la dexaméthasone induisait également une augmentation de l'expression de l'ARNm du GR chez les mâles, associée à une diminution de d'expression de la protéine 11βHSD2, suggérant une augmentation de la sensibilité rénale aux glucocorticoïdes. Ce profil d'expression pourrait participer à la physiopathologie de la programmation fœtale l'hypertension artérielle.

Dans la suite de ce travail, nous avons généré une deuxième puis une troisième génération de souris, après accouplement des souris femelles, traitées et contrôles, de la F1 puis de la F2, avec un mâle sauvage. Nous avons ainsi pu identifier que ces situations néonatales pathologiques étaient associées à la transmission multi- ou transgénérationelle d'anomalies de régulation de l'hypertension artérielle chez les mâles, jusqu'à la deuxième génération en cas d'exposition périnatale à la dexaméthasone, et jusqu'à la troisième génération dans notre modèle de prématurité. Dans cette dernière expérimentation, ces anomalies phénotypiques étaient associées à une augmentation de l'expression de GILZ et une diminution de méthylation du promoteur régulant l'expression du gène *Tsc22d3* codant GILZ, gène cible des voies corticostéroïdes impliqué dans la réabsorption hydro-sodée. Le caractère non spécifique d'organe et la transmission jusqu'à la F3 suggère un mode de transmission complexe, qui pourrait se faire *via* des modifications épigénétiques transmises par les cellules germinales.

Grâce à ce travail, nous avons mis en évidence que des situations physiopathologiques néonatales très fréquentes, la prématurité modérée et la restriction de croissance fœtale, étaient associées au développement d'une hypertension artérielle à l'âge adulte. Cela était associé à des altérations communes de l'expression des voies de signalisation corticostéroïdes rénales en période néonatale, pouvant participer à la physiopathologie complexe du développement de l'HTA. Des anomalies de régulation de la pression artérielle associées à des modifications de l'expression de ces voies de signalisation sont transmises aux mâles des générations ultérieures, suggérant que la programmation développementale épigénétique induite par la restriction de croissance fœtale et la prématurité pourrait contribuer au développement d'une hypertension artérielle essentielle dans les générations suivantes.

Société Française d'Endocrinologie

Siège social :
88, rue de la Roquette
F-75011 Paris

Sylvia Delplanque
Secrétaire de la SFE

☎ : +33 (0)1 40 24 02 72

: sfesecret@gmail.com

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