

Les communications intercellulaires dans le syndrome de Cushing d'origine surrénalienne : de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'hypercortisolisme

Hervé Lefebvre

Intercellular communications in primary adrenal Cushing's syndrome : novel therapeutic targets for the management of hypercortisolism

Recent studies have demonstrated that most genetically-determined adrenal lesions responsible for Cushing's syndrome display abnormal cell differentiation resulting in the development of paracrine regulation loops that favor cortisol hypersecretion. In bilateral adrenal macronodular hyperplasia tissues, the causative gene mutations appear to lead to pseudo-gonadal differentiation of a subpopulation of adrenocortical cells, resulting in aberrant ACTH synthesis. In primary pigmented adrenocortical disease (PPNAD) and in some cortisol-secreting adenomas, activation of the protein kinase A (PKA) pathway is directly responsible for upregulation of the serotonergic signaling pathway. These original observations provide new insights into the pathophysiology of primary adrenal Cushing's syndrome. They also suggest that illicit intraadrenal paracrine regulatory mechanisms may be regarded as valuable targets for new pharmacological treatments of hypercortisolism. These original therapeutic approaches could represent valuable alternatives to adrenal surgery and the currently used anticortisol drugs which are responsible for various side-effects.

KEY WORDS

Cushing's syndrome, hypercortisolism, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), adrenal hyperplasia, serotonin

Le syndrome de Cushing d'origine primitivement surrénalienne est lié à des hyperplasies nodulaires bilatérales ou des tumeurs corticosurrénales unilatérales cortisolo-sécrétantes qui s'inscrivent dans le vaste champ des maladies rares endocriniennes. Dans tous les cas, l'élévation de la cortisolémie exerce un rétrocontrôle négatif sur les cellules corticotropes hypophysaires aboutissant à un effondrement du taux plasmatique d'ACTH. Pour cette raison, il a longtemps été considéré que ces lésions étaient autonomes sur le plan fonctionnel. Depuis quelques années, les progrès de la génétique et le développement récent des approches de génomique tumorale ont permis des avancées importantes dans la compréhension de la physiopathologie de ces affections en montrant la présence fréquente de mutations germinales ou somatiques chez les patients atteints de néoplasies surrénales cortisolo-sécrétantes (1). En particulier, des mutations affectant des protéines de la voie de l'AMP cyclique et conduisant à une hyperactivité de la protéine kinase A, ont été clairement identifiées au niveau germinal dans la dysplasie micronodulaire pigmentée des surrénales (DMPS) et au niveau somatique dans les adénomes cortisolo-sécréteurs. Ces mutations, en activant la PKA, miment les effets stimulants de l'ACTH sur la sécrétion de cortisol et il est donc considéré qu'elles jouent un rôle majeur dans la genèse du syndrome de Cushing (2). Malgré tout, dans les formes familiales de DMPS, le suivi des sujets apparentés aux cas index et porteurs de la mutation causale de la maladie, montre que ces derniers peuvent présenter une sécrétion normale de cortisol alors même que le tissu surrénalien apparaît déjà dystrophique à l'imagerie abdominale. Il semble donc que des mécanismes additionnels soient souvent nécessaires pour le déclenchement de l'hypersecretion de glucocorticoïdes.

Dans les hyperplasies macronodulaires bilatérales des surrénales (HMBS), les études génétiques, menées initialement par l'équipe du Professeur Jérôme BERTHERAT à l'hôpital Cochin, ont montré qu'un tiers à la moitié des patients atteints, y compris dans les formes apparemment sporadiques, étaient porteurs d'une mutation hétérozygote du gène *ARMC5* dont le rôle physiologique est encore inconnu (3). *ARMC5* semble malgré tout se comporter comme un gène suppresseur de tumeur dans la mesure où les nodules surrénaux des sujets atteints sont le siège d'un second évènement génétique purement somatique affectant l'allèle non muté au niveau germinal et aboutissant donc à une inactivation complète du gène.

Cette double atteinte génétique paraît expliquer la croissance des

nodules d'hyperplasie. En revanche, son rôle dans le développement de l'hypercortisolisme paraît beaucoup moins évident dans la mesure où la répression du gène *ARMC5* dans des lignées corticosurréaliennes entraîne au contraire une inhibition de l'activité de la voie AMPc/PKA ainsi qu'une répression de la synthèse des enzymes de la stéroïdogénèse (4). Là encore, il semble hautement probable qu'un autre mécanisme, vraisemblablement favorisé par les anomalies génétiques, soit à l'origine de l'hypercortisolisme.

Nous savons, depuis les années 1990, que la sécrétion de cortisol par les HMBS ou les tumeurs surréaliennes responsables d'un syndrome de Cushing peut être stimulée de façon anormale par des récepteurs membranaires illicites, exprimés par les cellules corticosurréaliennes et pouvant être activés par des ligands circulants ou produits localement au sein des tissus surréaliens. Dans ce second cas, les anomalies observées aboutissent à la formation de véritables boucles de régulation paracrines intra-lésionnelles qui suppléent la baisse du taux de l'ACTH circulante (5). Au cours des dernières années, notre équipe s'est plus particulièrement intéressée à la production anormale d'ACTH dans les HMBS et à la voie de signalisation sérotoninergique dans la DMPS.

Dans les HMBS, nous avons pu observer l'expression anormale du précurseur de l'ACTH, la proopiomélanocortine ou POMC ainsi que l'ACTH elle-même dans une sous-population de cellules corticosurréaliennes présentes au sein des tissus (6). Les cellules ACTH-positives montrent les caractéristiques morphologiques habituelles des cellules stéroïdogènes et expriment plusieurs marqueurs de différenciation stéroïdogénique incluant le facteur SF1, le récepteur du HDL-cholestérol et la 17-hydroxylase. *A contrario*, ces cellules n'expriment pas le marqueur de différenciation corticotrope hypophysaire T-pit. Elles représentent par conséquent une sous-catégorie de cellules corticosurréaliennes stéroïdogènes exprimant anormalement l'ACTH. De façon intéressante, nous avons pu montrer que les cellules ACTH-positives étaient également marquées par des anticorps dirigés contre le marqueur gonadique insulin-like 3 (*INSL3*) indiquant ainsi que la synthèse d'ACTH pourrait résulter d'une différenciation illicite pseudo-gonadique de certaines cellules corticosurréaliennes (6). Cette observation est cohérente avec des données plus anciennes indiquant que les cellules stéroïdogènes gonadiques (cellules de Leydig et cellules ovariennes de la granulosa) sont capables d'exprimer la POMC et de synthétiser de l'ACTH. Comme les glandes surrénales et les gonades dérivent d'une même structure embryonnaire, le primordium adrénogonadique, il paraît vraisemblable que la présence de cellules pseudo-gonadiques dans les tissus surréaliens résulte d'une différenciation anormale du primordium adrénogonadique pendant l'embryogenèse précoce expliquant ainsi la bilatéralité des lésions.

Nos études *in vitro* ont également montré que l'ACTH

produite par les cellules pseudo-gonadiques stimule la sécrétion de cortisol de façon paracrine, l'incubation des tissus avec un antagoniste du récepteur de l'ACTH aboutissant à une chute de la sécrétion de cortisol. Contrairement à l'ACTH hypophysaire, l'ACTH intra-surréaliennne n'est pas influencée par les glucocorticoïdes. En revanche, la sécrétion d'ACTH des HMBS est stimulée par les ligands des récepteurs membranaires illicites tels que la sérotonine, la LH ou le GIP (6). Il semble donc que l'ACTH intra-surréaliennne constitue un intermédiaire et un amplificateur de l'action de plusieurs récepteurs illicites dans les HMBS.

La DMPS résulte le plus souvent de mutations d'une sous-unité régulatrice de la PKA, la sous-unité R1A (2). Ces mutations « perte de fonction » aboutissent à une hyperactivité constitutionnelle de la PKA dans les cellules corticosurréaliennes. Il a été par ailleurs montré que les tissus surréaliens de DMPS expriment anormalement des marqueurs de différenciation neuroendocrine tels que la synaptophysine et les enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines (7, 8). Il nous semblait donc possible que cette différenciation anormale puisse aboutir à l'émergence de régulations anormales de la sécrétion de cortisol impliquant des neurotransmetteurs, au sein même de ces tissus. Dans la glande surrénale normale, la sérotonine est produite par des mastocytes situés dans la région sous-capsulaire et, une fois libérée, vient stimuler la sécrétion d'aldostérone par un mécanisme paracrine. En revanche, la sérotonine n'influence que très peu la sécrétion de cortisol (9). Dans les DMPS, nous avons récemment montré que les cellules corticosurréaliennes expriment anormalement l'enzyme clé de la synthèse de sérotonine, la tryptophane hydroxylase, aboutissant à une production locale anormale de l'amine (10).

En outre, les tissus de DMPS expriment également de façon pathologique plusieurs types de récepteurs sérotoninergiques et sécrètent des quantités excessives de cortisol en réponse à la sérotonine. L'ensemble de ces anomalies moléculaires aboutit donc à la constitution d'une boucle de stimulation sérotoninergique paracrine intra-surréaliennne. Ce mécanisme strictement intralésionnel paraît impliqué dans la genèse de l'hypercortisolisme dans la mesure où les inhibiteurs de la tryptophane hydroxylase entraînent *in vitro* une baisse significative de la production de cortisol. Cette observation posait bien sûr la question du lien éventuel entre la mutation génétique initiale et l'apparition de ce système de régulation pathologique. Pour répondre à cette interrogation, nous avons pu inactiver l'expression de *PRKAR1A* dans une lignée de cellules corticosurréaliennes humaines, reproduisant donc l'anomalie génétique et ses conséquences observées chez les patients atteints de DMPS.

De façon intéressante, nous avons pu ainsi montrer que

l'activation de la PKA liée à la mutation de PRKAR1A déclenche la surexpression de la tryptophane hydroxylase et de récepteurs sérotoninergiques dans la lignée cellulaire permettant donc d'affirmer que l'activation de la voie de signalisation sérotoninergique dans les tissus est bien la conséquence de l'atteinte génétique (10).

L'ensemble de ces résultats montre que les lésions surrénaliennes génétiquement déterminées et responsables d'un hypercortisolisme présentent des anomalies de différenciation cellulaire aboutissant à l'apparition de boucles de régulation paracrine qui favorisent le développement de l'hypercortisolisme. Au cours de l'HMBS, les mutations causales semblent entraîner une différenciation pseudo-gonadique de certaines cellules corticosurréaliennes conduisant à l'apparition d'une synthèse locale aberrante d'ACTH. Dans la DMPS, c'est l'activation de la voie de la PKA qui paraît directement responsable de l'émergence d'une boucle de régulation sérotoninergique très active.

Au-delà de l'intérêt cognitif de ces notions qui

enrichissent notre vision de la physiopathologie des lésions corticosurréaliennes sécrétantes, de telles observations fournissent des cibles thérapeutiques prometteuses pour un traitement pharmacologique ciblé de l'hypercortisolisme. Ainsi, chez les patients atteints d'HMBS avec hypercortisolisme, il serait logique de tester les antagonistes du récepteur de l'ACTH en cours de développement. Le syndrome de Cushing satellite de la DMPS pourrait quant à lui être maîtrisé grâce à l'utilisation d'inhibiteurs périphériques de la synthèse de sérotonine (inhibiteurs de la tryptophane hydroxylase) dont certains d'entre eux font déjà l'objet d'études cliniques de phase III dans le cadre de la prise en charge du syndrome carcinoïde (11). Ces approches thérapeutiques originales pourraient constituer des alternatives précieuses à la chirurgie surrénalienne et aux anticortisoliques déjà disponibles mais qui posent malheureusement des problèmes de tolérance au long cours.

RÉFÉRENCES

1. Espiard S, Bertherat J. The genetics of adrenocortical tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2015; 44: 311-34.
2. Stergiopoulos SG, Stratakis CA. Human tumors associated with Carney complex and germline PRKAR1A mutations: a protein kinase A disease! *FEBS Lett* 2003; 546: 59-64.
3. Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, et al. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med* 2013; 369: 2105-2114.
4. Drougat L, Espiard S, Doly S, Rodriguez S, Rizk-Rabin M, Libé R, et al. Functional study of ARMC5 (armadillo repeat containing 5), a new tumour suppressor gene involved in primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *17th European Congress of Endocrinology, Ireland, Dublin, May, 16-20th, 2015*.
5. Lefebvre H, Prévost G, Louiset E. Autocrine/paracrine regulatory mechanisms in adrenocortical neoplasms responsible for primary adrenal hypercorticism. *Eur J Endocrinol* 2013; 169: R115-R138.
6. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomi-gni M, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2013; 369: 2115-2125.
7. Stratakis CA, Carney JA, Kirschner LS, Willenberg HS, Brauer S, Ehrhart-Bornstein M et al. Synaptophysin immunoreactivity in primary pigmented nodular adrenocortical disease: neuroendocrine properties of tumors associated with Carney complex. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1122-1128.
8. Horvath A, Mathyakina L, Vong Q, Baxendale V, Pang AL, et al. Serial analysis of gene expression in adrenocortical hyperplasia caused by a germline PRKAR1A mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 584-596.
9. Lefebvre H, Duparc C, Prévost G, Zennaro MC, Bertherat J, Louiset E. Paracrine control of steroidogenesis by serotonin in adrenocortical neoplasms. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 408: 198-204.
10. Bram Z, Louiset E, Ragazzon B, Renouf S, Wils J, Duparc C, et al. PKA regulatory subunit 1A inactivating mutation induces serotonin signaling in primary pigmented nodular adrenal disease. *JCI Insight* 2016; 1: e87958.
11. Kulke MH, Hörsch D, Caplin ME, Anthony LB, Bergsland E, Öberg K, et al. Telotristat ethyl, a tryptophan hydroxylase inhibitor for the treatment of carcinoid syndrome. *J Clin Oncol* 2017; 35: 14-23.

CORRESPONDANCE

Pr. HERVÉ LEFEBVRE

INSERM U1239

Service d'Endocrinologie

Diabète et Maladies Métaboliques

Centre Hospitalier Universitaire de Rouen - France

herve.lefebvre@chu-rouen.fr