



UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1992

THESE N° 167 / -1

ETUDE DE L'HORMONE CORTICOTROPE ET DES PEPTIDES
DERIVES DANS LE PLASMA HUMAIN - APPLICATION AU
DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE
DES SYNDROMES DE CUSHING

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 135497 3

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 1992

PAR

Patrick MIOSSEC
né le 17 janvier 1961 à Courbevoie (75)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur LAUBIE	- Président
Madame le Professeur ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX	- Juge
Monsieur le Professeur ATTALI	- Juge
Monsieur le Professeur GIRARD	- Juge
Monsieur le Professeur VANDROUX	- Juge

These med Limoges 1992 n 167



Ex 1

Sib 2

M24079

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1992

THESE N° 167

ETUDE DE L'HORMONE CORTICOTROPE ET DES PEPTIDES
DERIVES DANS LE PLASMA HUMAIN - APPLICATION AU
DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE
DES SYNDROMES DE CUSHING

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 1992

PAR

Patrick MIOSSEC
né le 17 janvier 1961 à Courbevoie (75)

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur LAUBIE	- Président
Madame le Professeur ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX	- Juge
Monsieur le Professeur ATTALI	- Juge
Monsieur le Professeur GIRARD	- Juge
Monsieur le Professeur VANDROUX	- Juge

1
UNIVERSITÉ DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur BONNAUD
- ASSESEURS : Monsieur le Professeur PIVA
Monsieur le Professeur COLOMBEAU

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ADENIS Jean-Paul	Ophtalmologie
ALAIN Luc	Chirurgie infantile
ARCHAMBEAUD Françoise	Médecine interne
ARNAUD Jean-Paul	Chirurgie orthopédique et Traumatologique
BARTHE Dominique	Histologie, Embryologie
BAUDET Jean	Clinique obstétricale et Gynécologie
BENSAID Julien	Clinique médicale cardiologique
BONNAUD François	Pneumo-Phtisiologie
BONNETBLANC Jean-Marie	Dermatologie
BORDESSOULE Dominique	Hématologie et Transfusion
BOULESTEIX Jean	Pédiatrie
BOUQUIER Jean-José	Clinique de Pédiatrie
BRETON Jean-Christian	Biochimie
CAIX Michel	Anatomie
CATANZANO Gilbert	Anatomie pathologique
CHASSAIN Albert	Physiologie
CHRISTIDES Constantin	Chirurgie thoracique et cardiaque
COLOMBEAU Pierre	Urologie
CUBERTAFOND Pierre	Clinique de chirurgie digestive
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel	Pédiatrie
DENIS François	Bactériologie-Virologie
DESCOTTES Bernard	Anatomie
DESROGES-GOTTERON Robert	Clinique thérapeutique et rhumatologique
DUDOGNON Pierre	Rééducation fonctionnelle
DUMAS Michel	Neurologie
DUMAS Jean-Philippe	Urologie
DUMONT Daniel	Médecine du Travail
DUPUY Jean-Paul	Radiologie
FEISS Pierre	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale
GAINANT Alain	Chirurgie digestive
GAROUX Roger	Pédopsychiatrie
GASTINNE Hervé	Réanimation médicale
GAY Roger	Réanimation médicale
GERMOUTY Jean	Pathologie médicale et respiratoire
GUERET Pascal	Cardiologie et Maladies vasculaires
HUGON Jacques	Histologie-Embryologie-Cytogénétique
LABADIE Michel	Biochimie
LABROUSSE Claude	Rééducation fonctionnelle
LASKAR Marc	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
LAUBIE Bernard	Endocrinologie et Maladies métaboliques
LEGER Jean-Marie	Psychiatrie d'adultes

LEROUX-ROBERT Claude	Néphrologie
LIOZON Frédéric	Clinique Médicale A
LOUBET René	Anatomie pathologique
MALINVAUD Gilbert	Hématologie
MENIER Robert	Physiologie
MERLE Louis	Pharmacologie
MOREAU Jean-Jacques	Neurochirurgie
MOULIES Dominique	Chirurgie infantile
OLIVIER Jean-Pierre	Radiothérapie et Cancérologie
OUTREQUIN Gérard	Anatomie
PECOU Claude	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PESTRE-ALEXANDRE Madeleine	Parasitologie
PILLEGAND Bernard	Hépatologie-Gastrologie-Entérologie
PIVA Claude	Médecine légale
RAVON Robert	Neurochirurgie
RIGAUD Michel	Biochimie
ROUSSEAU Jacques	Radiologie
SAUTEREAU Denis	Hépatogastro-Entérologie
SAUVAGE Jean-Pierre	Oto-Rhino-Laryngologie
TABASTE Jean-Louis	Gynécologie-Obstétrique
TREVES Richard	Thérapeutique
VALLAT Jean-Michel	Neurologie
VANDROUX Jean-Claude	Biophysique
WEINBRECK Pierre	Maladies infectieuses

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

En souvenir de mon père

A Monsieur le Professeur Laubie

qui m'a accueilli dans son service et m'a accordé sa
confiance durant mon internat

et me fait l'honneur de présider ce jury de thèse

A Madame le Professeur Archambeaud-Mouveroux

qui m'a transmis une partie de ses grandes
connaissances médicales avec patience

et a bien voulu faire partie de ce jury de thèse

A Monsieur le Professeur Girard

qui m'a accueilli dans son laboratoire pendant une année
très riche sur le plan scientifique et relationnel

qui m'a conseillé et guidé tout au long de ce travail

et me fait l'honneur de diriger cette thèse

A Monsieur le Professeur Attali

qui m'accueille dans son service depuis six mois et
m'accorde sa confiance

et a accepté de faire partie du jury de cette thèse

A Monsieur le Professeur Vandroux
qui a accepté de juger cette thèse

A Corinne

avec toute ma tendresse

A ma mère

en témoignage de mon affection

A ma famille

A mes amis

A Marie-Françoise Proeschel

qui m'a initié patiemment au travail de laboratoire et
accompagné tout au long de ce travail

A Jean-Francis Massias

son aide a été déterminante pour la partie HPLC

A Monsieur le Professeur Bertagna

pour ses conseils toujours précieux

A Madame le Docteur Raux

qui a accepté de diriger ce travail

A tous ceux qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre

Ce travail est aussi le leur

PLAN

INTRODUCTION

LE SYNDROME DE CUSHING

I DEFINITION

II HISTORIQUE

III DIAGNOSTIC POSITIF

A CLINIQUE ET BIOLOGIE COURANTE

- 1°) Excès d'hormones glucocorticoïdes
- 2°) Excès d'hormones corticolipotropes
- 3°) Excès d'hormones minéralocorticoïdes
- 4°) Excès d'androgènes surrénaliens

B DOSAGES HORMONAUX

- 1°) Dosages plasmatiques de base
- 2°) Dosages urinaires de base
- 3°) Tests dynamiques

IV DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE

A DIAGNOSTIC DE NIVEAU

B DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE PRECIS

- 1°) Formes basses
- 2°) Formes hautes
 - a) Clinique et biologie simple
 - b) Dosages hormonaux de base
 - c) Tests hormonaux dynamiques
 - d) Techniques d'imagerie
 - e) Cathéterisme du sinus pétreux

PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE
DE LA SECRETION D'ACTH

I HISTORIQUE

II LE GENE DE LA POMC

A STRUCTURE

B EXPRESSION

C REGULATION

III LA PROOPIOMELANOCORTINE

A STRUCTURE DE LA POMC

B MATURATION PROTEOLYTIQUE DE LA POMC

C ACTH ET CLIP

D AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

1°) Glycosylations

2°) Phosphorylations

3°) Amidations

4°) Acétylations

5°) Oxydations

6°) Sulfatations

IV LES TUMEURS ACTH-SECRETANTES

A LES TUMEURS "TYPE ANTEHYPOPHYSE"

B LES TUMEURS "TYPE HYPOPHYSE INTERMEDIAIRE"

ETUDE DES DERIVES DE L'ACTH
DANS LE PLASMA

I MATERIEL ET METHODES

A CHOIX DES PATIENTS - RECUEIL DES PLASMAS

B PURIFICATION DES PLASMAS

1°) Chauffage et centrifugation

2°) Extraction des peptides

C CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

EN PHASE INVERSE

1°) Principe

2°) Description des deux phases

a) Phase stationnaire

b) Phase liquide

3°) Appareillage

4°) Réalisation pratique

a) Composition des solvants employés

b) Préparation et injection de l'échantillon

c) Gradient d'élution

d) Détection et étalonnage

e) Lyophilisation

D DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

1°) Principe

2°) Réactifs utilisés

a) Traceur

b) Anticorps

c) Standards et étalons

d) Echantillons à doser

3°) Protocole de dosage

a) Adaptation du RIA au milieu d'HPLC

b) Incubation

c) Séparation

4°) Mode d'expression des résultats

II RESULTATS

A RENDEMENTS

1°) Extraction sur SEP-PAK

2°) Lyophilisation

3°) RP-HPLC

4°) Rendement global et seuil de détection

B PROFIL DES PLASMAS ETUDIES

1°) Tumeurs hypophysaires

2°) Tumeurs ectopiques

C EFFETS DU CHAUFFAGE

D EFFETS DES STIMULATIONS

E DETECTION ET CALIBRATION

F COMPARAISON "PERIPHERIE - VEINE EFFERENTE"

III DISCUSSION

A JUSTIFICATION DE LA METHODE EMPLOYEE

1°) Méthode de séparation

2°) Méthode de reconnaissance

a) Etalonnage de l'HPLC et repérage des fractions

b) Dosage radio-immunologique

B PROFIL DES PLASMAS ETUDIES

1°) Caractéristiques générales des plasmas

2°) Signification des pics

3°) Nature des peptides isolés

4°) Comparaison entre tumeurs hypophysaires et
tumeurs non hypophysaires

C APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES DE
CUSHING

1°) Intérêt

2°) Inconvénients

3°) Autres applications

CONCLUSION

INTRODUCTION

Le syndrome de Cushing est une maladie rare, touchant essentiellement la femme d'âge moyen, et pouvant correspondre à diverses étiologies selon le niveau de l'atteinte primitive sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Il s'agit d'une maladie potentiellement grave, responsable d'une morbidité importante et d'une mortalité non négligeable.

Si le diagnostic positif, quoique parfois trompeur, est désormais souvent fait grâce à un examen clinique soigneux, quelques dosages biologiques simples et un bilan hormonal minimum, le diagnostic étiologique est parfois difficile à affirmer même en multipliant les examens hormonaux et morphologiques. La mise en évidence de la cause est cependant capitale pour déterminer une thérapeutique efficace, le traitement idéal de ces malades étant le plus souvent chirurgical.

L'objet de notre travail est d'étudier le plasma de patients présentant un syndrome de Cushing avec hypersécrétion d'hormone corticotrope (ACTH), forme la plus fréquente et où le diagnostic étiologique risque le plus d'être mis en défaut. Notre but est d'apporter des informations supplémentaires sur la physiopathologie de ces affections et de fournir un moyen utile dans leur diagnostic étiologique, en mettant en évidence dans le plasma des différences entre les deux principales étiologies en ce qui concerne l'ACTH et les peptides dérivés, comme le CLIP (Corticotropin-like intermediary lobe peptide).

**LE SYNDROME DE
CUSHING**

I DEFINITION

Le syndrome de Cushing se définit comme un hypercorticisme endogène avec hypercortisolisme prédominant (1).

Cet hypercorticisme peut être la conséquence de deux grands types de causes:

- une tumeur primitivement surrénalienne, bénigne ou maligne.
- une stimulation excessive des corticosurrénales soit par une hypersécrétion antehypophysaire d'ACTH soit par la production extra-hypophysaire d'ACTH et de peptides apparentés.

II HISTORIQUE

Les premières descriptions cliniques de la maladie ont été faites dès 1910 par Apert (2) et Gallais (3). En 1913 Sicart et Reilly envisagent une origine diencéphalo-hypophysaire à ces symptômes et proposent de les traiter par irradiation hypophysaire (4).

C'est cependant à Cushing que l'on doit la première description réellement complète de la maladie en 1932 (5), dans un mémoire rassemblant 12 observations du syndrome qui porte aujourd'hui son nom où il en décrit précisément les symptômes et l'évolution. De plus il rattache ces troubles à l'existence dans la moitié des cas d'un adénome hypophysaire.

Cette théorie sera remise en cause par Crooke qui considère que les anomalies histologiques hypophysaires constatées sont la conséquence de l'hypercorticisme et non sa cause (6). Peu à peu la distinction va se faire entre l'adénome hypophysaire basophile et la réaction des cellules hypophysaires à l'hypercorticisme. De plus la mise en évidence de syndromes de Cushing associés à des tumeurs de la corticosurrénale va faire porter davantage l'attention sur l'état des surrénales.

La découverte de l'ACTH et la possibilité de son dosage plasmatique vont faire notablement évoluer les connaissances sur la physiopathologie du syndrome de Cushing, amenant la distinction entre les hypercorticisismes à ACTH normale ou élevée et les hypercorticisismes à ACTH effondrée.

L'origine primitivement hypophysaire de cette hypersécrétion d'ACTH reste encore aujourd'hui débattue, une autre hypothèse consistant à penser que cette hyperactivité hypophysaire est secondaire à des influences extra-hypophysaires, hypothalamiques par exemple. Les arguments privilégiant la première hypothèse paraissent prédominer. En effet, dans la plupart des cas l'ablation d'un micro-adénome hypophysaire permet d'enrayer l'évolution de la maladie. De plus, Nelson en 1960 a rapporté des observations de tumeurs hypophysaires se développant après surrénalectomie bilatérale pour syndrome de Cushing (7).

III DIAGNOSTIC POSITIF

A CLINIQUE ET BIOLOGIE COURANTE

Les manifestations cliniques et biologiques du syndrome de Cushing sont nombreuses, et ont pour la plupart été décrites dès 1932 par Cushing lui-même. Elles sont très variables et inconstantes, elles sont la conséquence des excès hormonaux.

1°) Excès d'hormones glucocorticoïdes

Ces troubles peuvent se voir, à des degrés divers, quelle que soit l'étiologie:

- troubles du métabolisme des glucides (8), d'où mauvaise tolérance aux hydrates de carbone voire diabète vrai.

- troubles du métabolisme des protides: l'excès de catabolisme protidique explique les vergetures classiquement larges, pourpres et horizontales, l'atrophie cutanée, l'amyotrophie (9) touchant essentiellement les ceintures, et l'ostéoporose.

- troubles du métabolisme des lipides: l'obésité est fréquente, le plus souvent modérée. Il s'agit en fait surtout d'une anomalie de distribution des graisses, qui se répartissent préférentiellement dans les régions facio-tronculaires (10).

- troubles du métabolisme hydro-électrolytique: la diurèse aqueuse est augmentée, d'où une polyuro-polydipsie. L'excès de cortisol est responsable d'une rétention sodée, et la kaliurèse est augmentée, entraînant une hypokaliémie parfois sévère. L'absorption du calcium est diminuée, ce qui participe

également au développement de l'ostéoporose parfois sévère.

- troubles de l'hématopoïèse: une polyglobulie peut exister dans certains cas, les polynucléaires neutrophiles sont généralement élevés, les autres lignées blanches étant abaissées. Les processus de coagulation sont parfois accélérés, entraînant une élévation des risques thrombo-emboliques.

Par ailleurs l'excès de cortisol peut être responsable d'une hypertension artérielle par ses effets minéralocorticoïdes et par augmentation de la production d'angiotensinogène, et peut entraîner un syndrome psychiatrique aigu ou chronique, signe trompeur mais très évocateur du diagnostic. Il peut également provoquer des ulcères gastriques par augmentation de l'acidité gastrique, des troubles sexuels, une sensibilité accrue aux infections...

2°) Excès d'hormones corticolipotropes

Il se voit dans les formes avec hypersécrétion d'ACTH, et entraîne essentiellement une pigmentation d'intensité variable. notamment dans les syndromes de Nelson et les hypersécrétions d'origine ectopique.

3°) Excès d'hormones minéralocorticoïdes

Il se voit surtout dans les tumeurs malignes et entraîne une hypertension artérielle importante avec souvent hypokaliémie sévère.

4°) Excès d'androgènes surrénaliens

Il n'est important qu'en cas de tumeur maligne de la surrénale, entraînant alors notamment une polyglobulie et chez la femme un hirsutisme avec parfois virilisation.

B DOSAGES HORMONAUX

Ils doivent dans un premier temps confirmer l'hypercortisolisme, et dans un second temps l'attribuer à un authentique syndrome de Cushing.

L'hypercorticisme peut en effet être réactionnel à certaines situations physiologiques (obésité, stress, grossesse, prise d'oestroprogestatifs) ou à certaines pathologies extérieures à l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (certaines affections psychiatriques, éthylisme, diabète déséquilibré). La prise occulte ou ignorée de corticoïdes est un problème à part parfois difficile à régler.

De très nombreux dosages ou tests hormonaux sont disponibles pour explorer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (11). Cependant peu d'entre eux sont nécessaires pour affirmer l'existence d'un authentique syndrome de Cushing.

1°) Dosages plasmatiques de base

Le dosage radio-immunologique du cortisol est facilement disponible en routine. En cas de syndrome de Cushing le cortisol à 8 heures est

généralement élevé de façon plus ou moins importante, mais peut être normal. Le plus important à considérer est la persistance ou non d'un cycle nyctéméral. En effet, l'existence d'un taux de cortisol élevé le soir, restant au niveau des taux du matin, est très évocatrice de syndrome de Cushing.

La mesure de la cortisolémie intégrée sur 24 heures représente un bon moyen d'apprécier les variations nyctémérales et d'affirmer l'authenticité du syndrome de Cushing (12), mais est lourde à réaliser. Des mesures moins longues, sur 6 (13) ou 3 heures (14), ont été proposées.

2°) Dosages urinaires de base

Le cortisol libre urinaire des 24 heures est désormais le principal marqueur urinaire utilisé, et il fournit un important critère diagnostique. Son taux est en effet très peu influencé par le poids, les modifications du métabolisme du cortisol ou d'autres facteurs extrinsèques. De plus sa mesure sur les urines de 24 heures intègre les variations journalières de la fraction libre biologiquement active.

Dans un souci de simplification du test des recueils sur une période plus courte ont été proposés: recueil sur 1 heure entre 23 et 24 heures (15); sur 4 heures entre 20 et 24 heures (16). La mesure du rapport cortisol libre/créatinine dans les urines du matin a également été proposée (17).

Les 17-hydroxy- et 17-cétostéroïdes urinaires des 24 heures ont longtemps constitué les

principaux dosages urinaires et peuvent être encore utilisés. La mesure du taux d'excrétion urinaire sur 24 heures du tétrahydrocortisol (18) et du 20-alpha-hydrocortisol (19) peut être plus sensible que le cortisol libre urinaire.

3°) Tests dynamiques

Le test le plus simple en première intention est le test de freination rapide par la dexaméthasone ("freination minute") décrit par Nuggent (20). Il consiste à administrer par voie orale 1 mg de dexaméthasone à 0 heure, et à déterminer la cortisolémie à 8 heures le même jour. Chez les sujets normaux la cortisolémie chute au-dessous de 60 nmol/l elle reste supérieure à 600 nmol/l en cas de syndrome de Cushing. Ce test compte cependant une proportion non négligeable de faux positifs, notamment chez les sujets obèses ou traités par oestro-progestatifs (21).

Le test de référence (22) reste cependant le test de freination faible ou standard ("Liddle faible"). Ce test, décrit par Liddle (23), consiste à administrer par voie orale 2 mg de dexaméthasone par jour, répartis en 4 prises pendant 2 jours consécutifs. Chez les sujets normaux l'élimination urinaire des 17 hydroxystéroïdes tombe en-dessous de 2,5 mg par 24 heures au 2^e jour de la freination, alors que la freination est incomplète ou négative en cas de syndrome de Cushing. Ce test comporte également un petit nombre de faux positifs et de faux négatifs.

Actuellement le test de freination standard utilise plus volontiers le cortisol libre

- les formes ACTH-indépendantes dites "basses"

- . adénome surrénalien
- . carcinome surrénalien (corticosurréalome)
- . traitement par les glucocorticoïdes
- . hyperplasie surrénalienne micronodulaire

Le diagnostic étiologique doit respecter une stratégie précise afin d'être performant sans multiplier les examens inutiles et coûteux. Dans un premier temps il convient de faire le diagnostic de niveau, et donc de différencier les formes hautes des formes basses, ce qui pose généralement peu de problèmes. Par la suite le diagnostic étiologique précis à l'intérieur de chaque classe peut s'avérer plus difficile, notamment pour ce qui concerne les formes ACTH-dépendantes.

A DIAGNOSTIC DE NIVEAU

Peu de signes cliniques permettent d'orienter le diagnostic de façon satisfaisante. Tout au plus peut-on considérer que la mélanodermie, parfois présente dans les formes hautes, n'existe en principe pas dans les formes basses.

L'examen déterminant pour distinguer les formes hautes des formes basses reste le dosage de l'ACTH plasmatique. En effet, en cas de syndrome de Cushing dû à une tumeur surrénalienne le taux d'ACTH est effondré en réaction à l'hypercortisolisme, alors que dans les syndromes de Cushing de cause hypophysaire ou ectopique le taux d'ACTH reste normal

ou élevé, voire très élevé selon la cause, et ce malgré l'hypercortisolisme.

Jusqu'à ces dernières années sa détermination se faisait par dosage radio-immunologique, méthode sensible mais difficile et réservée aux laboratoires entraînés. La commercialisation de "trousses" de dosage a simplifié la technique sans régler tous les problèmes. Depuis peu sont apparus des dosages par immunoradiométrie, plus spécifiques que le dosage radio-immunologique. Cependant ce dosage par immunoradiométrie peut parfois être mis en défaut, notamment dans le cas des tumeurs ectopiques pouvant produire des fragments d'ACTH biologiquement actifs ou de la "big ACTH" (cf), qui ne sont pas détectés par cette technique (31).

Ce dosage peut en théorie à lui seul faire la distinction entre formes hautes et formes basses, et s'avère en pratique, compte tenu des restrictions émises, le plus souvent discriminatif. D'autres dosages hormonaux, qui seront décrits plus loin, sont généralement réalisés mais leur intérêt est de confirmer le diagnostic de niveau et surtout d'affiner le diagnostic étiologique.

Les examens morphologiques (scanner surrénalien, scanner ou IRM hypophysaire, scanner mettant en évidence une tumeur ectopique) peuvent permettre de confirmer le diagnostic en visualisant la tumeur, mais peuvent dans un nombre non négligeable de cas être pris en défaut, notamment au niveau hypophysaire.

B DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE PRECIS

Une fois la distinction entre forme haute et forme basse faite, la localisation exacte de la tumeur et la détermination de sa nature précise sont nécessaires notamment en vue de l'acte chirurgical.

1°) Formes basses

Ici la différence doit essentiellement être faite entre tumeur bénigne (adénome surrénalien) et maligne (corticosurréalome). Cette précision est souvent apportée par le bilan (32), mais dans certains cas la distinction peut être difficile.

Dès l'examen clinique, un syndrome de Cushing sévère, avec parfois signes d'hyperandrogénisme, altération de l'état général, adénopathies voire masse abdominale palpable oriente vers une étiologie maligne. Dans ce cas l'hypercortisolisme est souvent plus important et les androgènes sanguins et urinaires sont souvent élevés. Les tests dynamiques sont en principe négatifs dans les deux cas.

La localisation précise de la tumeur se fait généralement sans difficulté grâce au scanner surrénalien, voire à l'IRM ou à la scintigraphie au iodocholestérol, les tumeurs étant généralement d'un diamètre supérieur à 1 cm. Il s'agit le plus souvent d'une tumeur unilatérale, mais des formes bilatérales peuvent se voir. Le diagnostic est plus difficile en cas d'hyperplasie polymicro-adénomateuse des surrénales (33).

Dans tous les cas l'examen anatomo-pathologique de la lésion doit être réalisé, permettant généralement de distinguer les formes bénignes des tumeurs malignes. Cependant, dans certains cas même l'examen histologique ne permet pas de trancher formellement, l'évolution seule permettant de connaître la nature de la tumeur. Il est cependant admis qu'une tumeur de plus de 30 grammes est très suspecte de malignité.

2°) Formes hautes

Parfois évident ou facilement réalisé grâce à un bilan minimal, le diagnostic étiologique précis des syndromes de Cushing d'origine haute constitue parfois la principale difficulté de cette pathologie et nécessite généralement l'utilisation d'un ensemble d'examens biochimiques et morphologiques (34).

a) Clinique et biologie simple

Dans certains cas le diagnostic est d'emblée évident, principalement en cas de sécrétion ectopique où la tumeur causale peut parfois être déjà connue ou parlante cliniquement, et le tableau clinique évocateur (altération importante de l'état général, syndrome de Cushing très sévère et rapidement évolutif, pigmentation importante). L'hypokaliémie peut être sévère.

b) Dosages hormonaux de base

Le dosage d'ACTH est d'intérêt limité pour distinguer les causes hypophysaires des causes ectopiques car il peut varier dans une large fourchette dans les deux formes (35). Cependant des taux très élevés se voient préférentiellement dans les tumeurs extra-hypophysaires.

Le dosage statique le plus utile pour distinguer les deux formes paraît être celui des lipotropines (beta- et gamma LPH) (36), hormones co-sécrétées avec l'ACTH à partir d'un précurseur commun (cf). L'information apportée est surtout intéressante lorsque les taux de LPH sont interprétés en fonction de ceux d'ACTH (37). En effet ACTH et LPH sont sécrétées de façon équimolaire par la tumeur, leur rapport molaire est donc théoriquement voisin de 1. Or, dans les tumeurs ectopiques l'ACTH est souvent sécrété sous forme de "big ACTH" ou au contraire de fragments d'ACTH, toutes ces formes échappant au dosage classique. La LPH, intégralement reconnue, paraît donc sur-représentée par rapport à l'ACTH. Le rapport LPH/ACTH oriente donc vers une sécrétion ectopique lorsqu'il est très élevé (38). Ce point de physiopathologie sera détaillé plus loin.

c) Tests hormonaux dynamiques

De nombreux tests dynamiques sont utilisables, attestant du caractère imparfait de chacun. Aucun en effet ne permet à lui seul un diagnostic de certitude. L'interprétation de ces tests repose sur le principe suivant: les tumeurs antehypophysaires conservent un certain degré de régulation alors que les tumeurs ectopiques échappent à tout contrôle

physiologique. Dans le premier cas la sécrétion d'ACTH peut donc être stimulée ou freinée pour peu que le test employé soit suffisamment puissant, alors que dans le second cas il n'y aura ni stimulation ni freination.

Ce principe, simple en apparence, est cependant parfois pris en défaut. On doit donc souvent multiplier les tests, soit de freination soit de stimulation, pour renforcer l'orientation diagnostique, ce bilan nécessitant une hospitalisation de plusieurs jours.

>> test de freination forte

Ce test dit de "Liddle fort" a été mis au point par Liddle (23), et consiste à administrer de la dexaméthasone à la dose de 8 mg par jour pendant 2 jours à raison de 2 mg toutes les 6 heures. Les 17-hydroxystéroïdes urinaires sont dosés la veille et au 2^e jour du test, le critère de positivité étant une diminution des 17-hydroxystéroïdes au moins égale à 50% au 2^e jour. Ce test est en principe positif en cas de tumeur hypophysaire et négatif en cas de tumeur extra-hypophysaire. Désormais ce test de freination forte se fait plus volontiers en mesurant le cortisol plasmatique et le cortisol libre urinaire.

Des variantes de ce test ont été proposées, dans le but d'augmenter la sensibilité et la spécificité:

- prise de la dexaméthasone à la dose de 8 mg par jour pendant 3 jours et dosage du cortisol libre urinaire la veille et au second jour (25).

- administration de la dexaméthasone par perfusion intra-veineuse pendant 4 heures (39) ou 7 heures (40)

>> test à la métopyrone

La métopyrone bloque la 11 beta-hydroxylase, enzyme catalysant l'étape ultime de la synthèse du cortisol. Ce test permet d'explorer l'ensemble de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. 750 mg de métopyrone sont administrés oralement toutes les 6 heures pendant 24 heures, et l'on dose le cortisol, le 11-désoxycortisol (composé S) et l'ACTH plasmatiques, et les 17-hydroxystéroïdes urinaires avant et après la prise du produit. La chute de la cortisolémie atteste de la bonne absorption des comprimés et va entraîner en réaction une nette élévation de l'ACTH, du composé S et des 17-hydroxystéroïdes.

Ce test, mis au point initialement pour distinguer la maladie de Cushing des tumeurs surrénaliennes, a depuis été supplanté par d'autres moyens plus commodes et plus fiables dans cette indication. Il est d'un intérêt limité dans le diagnostic étiologique précis des formes ACTH-dépendantes. Cependant, un test à la métopyrone négatif exclut pratiquement la maladie de Cushing, mais un test positif n'a qu'une faible valeur prédictive en faveur de la maladie de Cushing.

>> test à la lysine vasopressine (LVP)

La LVP est un analogue synthétique de l'arginine vasopressine qui a, comme elle, une activité stimulante hypophysaire CRH-like à doses pharmacologiques. L'injection intra-musculaire de 10 unités de LVP entraîne chez le sujet sain une augmentation d'environ 100% de l'ACTH plasmatique.

Dans les hypercorticismes ACTH-dépendants par tumeur antehypophysaire le test est positif voire explosif, alors que dans les tumeurs ectopiques le test est généralement négatif. Depuis la découverte de la Corticotropin-releasing-hormone (CRH), ce test n'est en principe plus utilisé seul, la CRH ayant fait la preuve de sa supériorité dans cette indication (41).

>> test à la CRH

L'isolement et la synthèse de la CRH ovine en 1981 (42) a apporté un atout majeur dans le diagnostic étiologique du syndrome de Cushing. Par la suite il a été montré que la CRH humaine diffère de la CRH ovine par 7 acides aminés. La CRH ovine synthétique est capable de stimuler la sécrétion d'ACTH chez l'homme (43,44), il apparaît même que, à doses égales, la CRH ovine est plus efficace que la CRH humaine et a une meilleure sensibilité (45).

La CRH est administrée par voie intraveineuse à raison de 1 microg/kg de poids corporel ou d'une dose standard de 100 microg, le cortisol et l'ACTH plasmatiques sont dosés avant l'injection et 15'-30'-45'et 60' après l'injection. Les critères de positivité du test sont mal définis, le test est généralement

considéré positif lorsque l'ACTH augmente de 50% au moins et le cortisol de 20% au moins.

En cas de tumeur hypophysaire le test à la CRH est positif avec souvent même une réponse exagérée, alors que le test est négatif en cas de tumeur extra-hypophysaire (46,47).

Le test à la CRH est d'un apport important dans le diagnostic étiologique des syndromes de Cushing ACTH-dépendants (48), il paraît équivalent au test de freination forte (11) et supérieur au test à la LVP (45). Toutefois, comme les autres tests, il n'est pas suffisant à lui seul pour affirmer le diagnostic et ses résultats doivent être confrontés avec ceux des autres tests (49).

Les 2 tests précédents peuvent être couplés, le test CRH-LVP permet d'injecter une quantité inférieure de LVP, ce qui en limite les effets secondaires notamment tensionnels, pour une meilleure efficacité, les deux produits se potentialisant (50).

d) Techniques d'imagerie

Ce domaine a énormément évolué depuis quelques années. Une fois le diagnostic étiologique orienté la mise en évidence de la tumeur responsable est nécessaire pour confirmer le diagnostic et pour guider l'acte chirurgical généralement indiqué. Si par contre le diagnostic étiologique n'a pu être suspecté par les examens précédents, un bilan radiologique complet et systématique doit être fait à la recherche de la tumeur causale

>> explorations hypophysaires

La plupart des adénomes hypophysaires responsables de maladie de Cushing mesurent moins de 1 cm de diamètre, la taille moyenne étant de 5 à 6 mm (51). De plus la prise de contraste des adénomes est souvent identique à celle du tissu sain (52). Enfin l'hypophyse normale peut parfois apparaître un peu hétérogène.

Même en utilisant les appareils modernes de tomodensitométrie permettant des images à haute résolution, la sensibilité du scanner dans cette indication n'est que de l'ordre de 47% (11). La spécificité est meilleure (74%), mais des faux positifs peuvent exister (53,54).

L'avènement de la résonance magnétique nucléaire a été d'un grand apport dans cette indication, la sensibilité de l'examen étant estimée à 77% (11). Cet examen est donc nettement supérieur au scanner, surtout lorsqu'il est complété par l'injection de gadolinium. La spécificité est de l'ordre de 80 à 85% (55), les faux positifs ne sont cependant pas exceptionnels.

>> explorations extra-hypophysaires

Le scanner thoracique et abdominal est l'examen de choix lorsqu'une tumeur extra-hypophysaire est suspectée ou pour mettre en évidence d'éventuelles

métastases (56). Dans cette indication l'IRM n'apporte que peu d'avantages. Ces tumeurs étant parfois très petites, l'utilisation de coupes jointives de 1 cm, voire moins, est souhaitable, tout au moins sur les régions les plus suspectes (57).

e) Cathéterisme du sinus pétreux

Dans un certain nombre de cas, rares mais non exceptionnels, il est impossible de trancher entre un syndrome de Cushing par tumeur hypophysaire ou par tumeur ectopique, malgré un bilan hormonal et radiologique complet et bien mené. Dans ces cas particulièrement difficiles le cathérisme du sinus pétreux inférieur peut être proposé. Cette technique, développée depuis une dizaine d'années, doit être réalisée par un neurochirurgien entraîné, et est alors suivie de peu d'effets secondaires.

Chaque moitié de l'hypophyse se draine dans le sinus pétreux inférieur homolatéral, qui reçoit donc le sang provenant de l'hypophyse avant qu'il ne soit mêlé à celui provenant d'autres territoires. Chez un patient présentant un adénome hypophysaire la concentration d'ACTH sera donc plus forte dans le sinus pétreux inférieur que en périphérie. Le cathéterisme des deux cotés doit être réalisé simultanément, le risque de faux négatifs est en effet bien plus important en cas de cathéterisme d'un seul sinus (58,59).

On calcule le gradient entre la concentration d'ACTH retrouvée dans le sinus pétreux inférieur et celle retrouvée en périphérie. Certains auteurs ont rapporté qu'un gradient supérieur à 1,4 ou

1,5 serait en faveur d'un adénome hypophysaire (60,61,62). Cependant, il n'est pas rare que, si l'on mesure la concentration d'ACTH sur plusieurs prélèvements réalisés dans une même veine périphérique, le rapport entre la valeur la plus haute et la valeur la plus basse soit de l'ordre de 1,5 à 1,8. De plus, il a été rapporté un cas de sécrétion ectopique d'ACTH avec un gradient sinus pétreux inférieur/veine périphérique de 1,7 (63). Un gradient supérieur à 2 paraît donc plus sûrement être en faveur d'un adénome hypophysaire, l'examen perd alors en sensibilité mais gagne en spécificité. Des faux positifs restent cependant possibles, notamment en cas de sécrétion ectopique de CRH (64).

L'autre intérêt du cathétérisme du sinus pétreux inférieur est de situer l'adénome dans l'hypophyse. En effet il s'agit le plus souvent d'un micro-adénome hypophysaire qui peut être latéralisé dans une des moitiés de l'hypophyse (65). Un rapport au moins égal à 1,4 entre les deux sinus pétreux paraît indiquer que l'adénome se situe dans la moitié de l'hypophyse correspondant au taux le plus fort (66,67). Cette indication permet de guider le geste du chirurgien, qui peut ainsi être plus efficace et moins traumatisant.

Désormais le cathétérisme des sinus pétreux inférieurs est presque systématiquement couplé à une stimulation par la CRH, afin d'en augmenter la sensibilité (68,69). Le dosage d'autres peptides en plus de l'ACTH (LPH, vasopressine voire prolactine) peut parfois augmenter l'efficacité de cet examen (61,70,71).

D'autres prélèvements veineux sélectifs peuvent être réalisés, mais semblent moins utiles. Ainsi le dosage d'ACTH dans les deux veines jugulaires a la même signification que le cathéterisme des sinus pétreux inférieurs, mais est moins précis car le sang provenant de l'hypophyse est mêlé à celui d'autres territoires et l'ACTH est plus diluée (58,67). Les grosses veines drainant certains territoires extra-hypophysaires peuvent également être ponctionnées, guidé par d'éventuelles anomalies radiologiques. Par exemple des prélèvements dans la veine pulmonaire par ponction transseptale ont été tentés, sans grand résultat. Le dosage d'ACTH dans le liquide de lavage bronchique ne s'est pas avéré plus concluant (72).

Toutes ces données concernant le diagnostic des syndromes de Cushing peuvent être résumées sur l'arbre décisionnel représenté sur la figure 1.

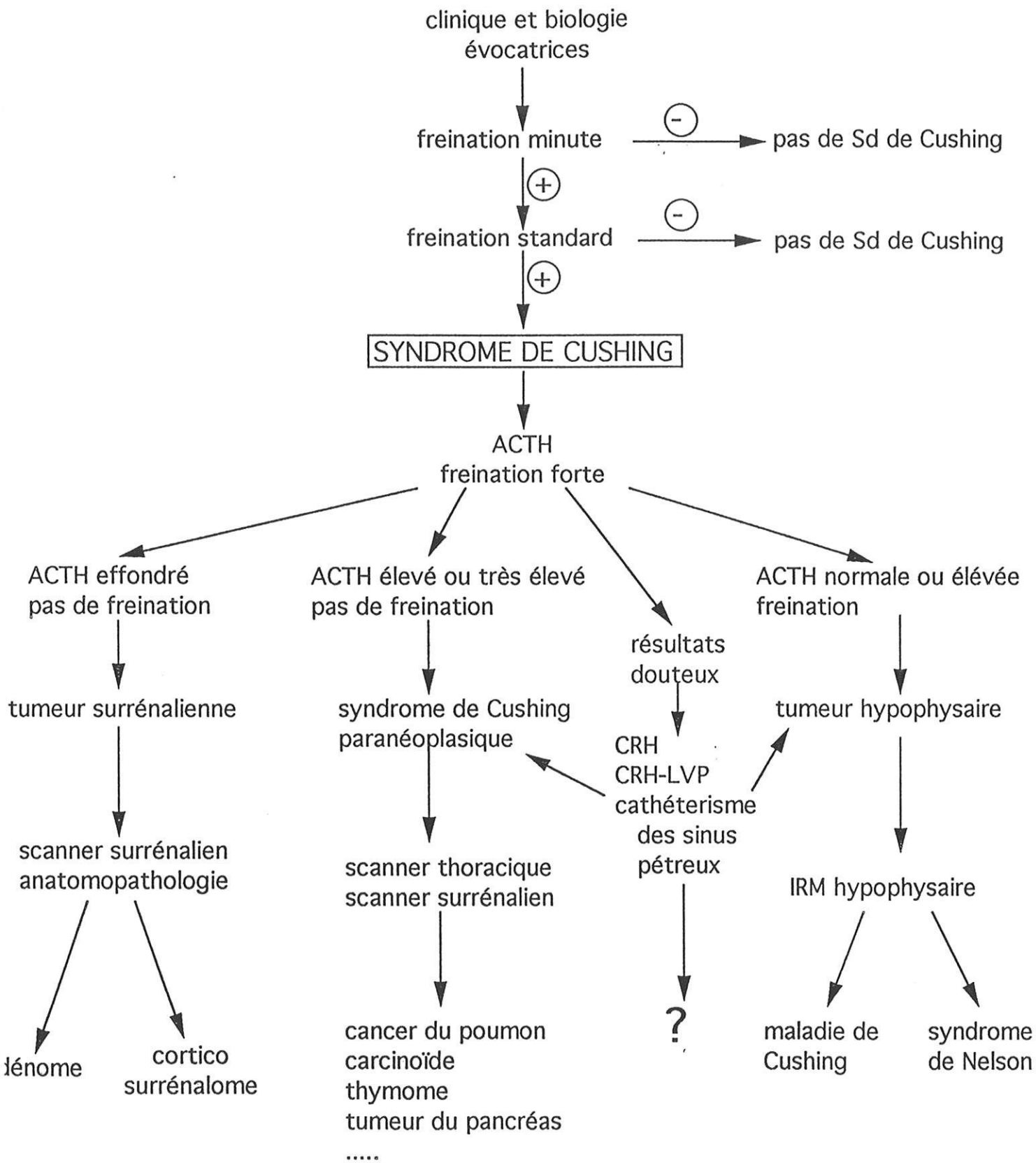


Figure 1

Diagnostic des syndromes de Cushing

PHYSIOLOGIE ET
PHYSIOPATHOLOGIE DE
LA SECRETION D'ACTH

Comme bon nombre de peptides, l'ACTH dérive d'un précurseur de haut poids moléculaire. Ce précurseur doit, pour produire des peptides biologiquement actifs, subir une série d'évènements post-traductionnels très organisés s'effectuant à l'intérieur de compartiments intra-cellulaires spécialisés.

I HISTORIQUE

Dès 1916 il a été démontré, par les travaux de Smith et coll., que le fonctionnement surrénalien dépendait d'une hormone hypophysaire. Il faut attendre cependant 1948 pour qu'apparaissent des tests biologiques permettant d'apprécier la fonction corticotrope (73).

Suite aux travaux de Yalow et Berson en 1959, décrivant, pour l'insuline, la première méthode de dosage radio-immunologique (74), Felber mettait au point un dosage radio-immunologique de l'ACTH, amélioré en 1964 par Yalow et Berson de façon à être suffisamment sensible pour détecter l'ACTH plasmatique. A cette même époque les séquences peptidiques de l'ACTH de plusieurs espèces, dont l'homme, ont été caractérisées.

Depuis la découverte en 1967 de la proinsuline (75), le concept selon lequel les peptides bioactifs dérivent de précurseurs s'est largement développé (76,77,78) et la structure de plusieurs de ces précurseurs a été établie.

En 1971 Yalow et Berson retrouvent dans le plasma et dans différents tissus produisant de l'ACTH une forme d'ACTH de haut poids moléculaire et de très faible activité biologique (79). La trypsinisation de cette "big ACTH" conduit à de l'ACTH pleinement active (80,81). De nombreux travaux ont par la suite affirmé l'existence, dans les tissus capables de produire de l'ACTH et dans le plasma, de 4 formes de poids moléculaire différent: 31 000; 23 000; 13 000 et 4 500 daltons (82,83,84,85,86). Un rôle de précurseur a été attribué aux formes de plus haut poids moléculaire (87,88).

Peu à peu la complexité de ce précurseur fut établie (rev. in 89). Il fut d'abord montré que l'ACTH co-existait dans la même cellule hypophysaire avec une substance de type MSH (Melanotropin Stimulating Hormone) (90), et qu'ils dérivait d'un précurseur commun (87,91,92). La production par ce même précurseur des lipotropines et des endorphines fut ensuite démontrée (87,93). Ce précurseur commun fut appelé "proopiomélanocortine" (94), terme reprenant les trois principales activités biologiques contenues dans sa séquence.

Ces quinze dernières années les techniques de plus en plus sophistiquées ont permis d'établir, tant dans le plasma que sur extraits tissulaires, la structure précise de la proopiomélanocortine (POMC) et des peptides qui en dérivent (90,95,96). On a pu en outre avoir une approche dynamique de sa maturation et caractériser précisément le gène de la POMC.

II LE GENE DE LA POMC

Le gène de la POMC code pour le précurseur complexe de plusieurs peptides hormonaux et neuromodulateurs biologiquement actifs et importants. Il est exprimé dans de nombreux tissus chez les mammifères, mais son principal site d'expression est le lobe antérieur corticotrope de l'hypophyse et son lobe intermédiaire mélanotrope, qui n'existe pas chez l'homme mais est retrouvé dans certaines espèces animales dont le rat.

A STRUCTURE (figure 2)

Compte tenu de sa régulation complexe et différente selon les tissus, on s'est initialement demandé s'il existait dans le génome plusieurs copies du gène de la POMC, chacune ayant ses propres caractéristiques et un mode d'expression spécifique à un tissu donné, ou si une simple copie était capable d'engendrer tous les peptides produits (97).

Le fragment d'ADN contenant les séquences codant pour la POMC a été isolé et séquencé chez plusieurs espèces de mammifères: homme (98,99), rat (100,101), bovin (102), souris (103,104). A chaque fois un seul gène fonctionnel a été identifié (105), mais dans le cas de la souris il existe un pseudogène associé au gène actif, ce pseudogène étant incapable de générer un ARN messager fonctionnel.(106,107).

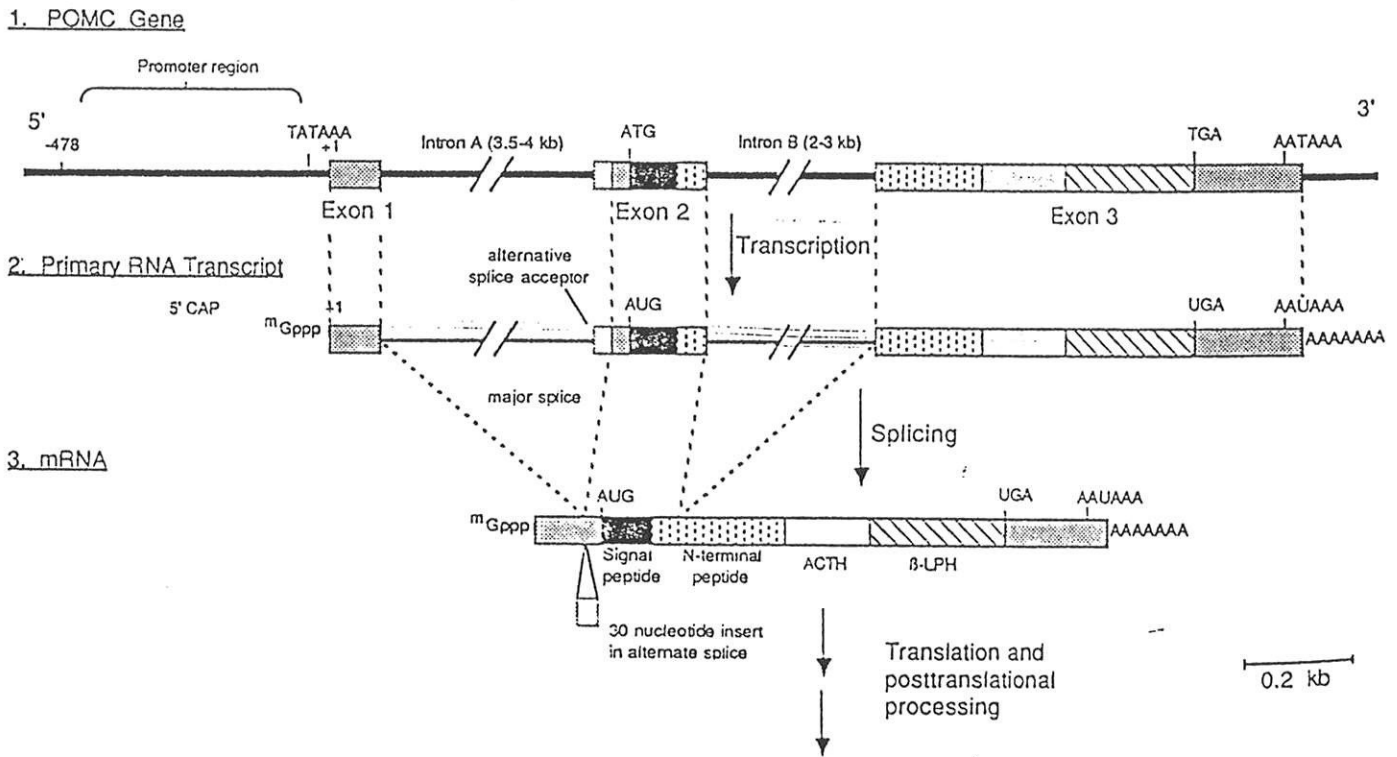


Figure 2

Le gène de la POMC
(d'après réf. 97)

Chez l'homme le gène de la POMC comporte 7665 paires de bases, divisées en 3 exons séparés par 2 longues séquences introniques. Le premier exon comporte 86 nucléotides et correspond à la majeure partie de l'extrémité 5' non traduite de l'ARN messager de la POMC. Le second exon représente 152 paires de bases et correspond à la fin de l'extrémité 5' non traduite, au peptide signal et au début du fragment N-terminal. Cet exon comprend à son extrémité 5' un site éventuel d'épissage alternatif. Le troisième exon est le plus important en taille et en fonction. Il représente 833 paires de bases et code pour pratiquement tout le précurseur: majeure partie du fragment N-terminal; Joining Peptide; ACTH; beta-LPH. Il comporte aussi une partie correspondant à l'extrémité 3' non traduite.

Les 2 introns sont de grande taille par rapport aux exons, comportant respectivement 3708 et 2886 paires de bases. Ils seront excisés lors de la formation de l'ARN messager.

Il existe une très grande homologie entre espèces pour les régions du gène correspondant au fragment N-terminal, à l'ACTH et à la partie beta-MSH/beta-endorphine, suggérant a priori la grande importance de ces régions. Par contre les parties codant pour le Joining Peptide et la gamma-MSH divergent beaucoup plus d'une espèce à l'autre. On note également un fragment de 50 paires de bases au sein de la partie 5' non traduite, riche en purines (plus de 80%), très bien conservé d'une espèce à l'autre, dont le rôle et l'importance ne sont pas encore définis.

B EXPRESSION

Chez l'homme de nombreux tissus, normaux ou tumoraux, sont capables de produire de la POMC (106). Ainsi, outre l'hypophyse, l'ARN messenger de la POMC a été détecté au niveau de l'hypothalamus et d'autres régions cérébrales extra-hypophysaires (107, 108,109,110,111,112,113), par exemple les amygdales, le cortex cérébral, le cervelet... De nombreux tissus non cérébraux sont également capables d'exprimer le gène de la POMC, soit à l'état normal soit à l'état pathologique. C'est le cas notamment de la médullosurrénale (107,114); des gonades (115,116, 117); des macrophages spléniques (118); de la thyroïde (119,120); du pancréas (121,122); du tractus gastro-intestinal (123,124); du placenta (125,126); du poumon, de la glande pinéale, du rein, de la corticosurrénale et de l'oeil (127).

Alors qu'un seul gène a été identifié dans les génomes haploïdes, plusieurs ARN messagers de taille différente ont été décrits, y compris dans les tissus normaux (128). Ainsi la forme classique retrouvée au niveau de l'antehypophyse compte 1150 bases environ, cette forme est également majoritairement présente dans l'hypothalamus et les macrophages spléniques (129). Plusieurs études (114, 116,117,129) ont rapporté que dans certains tissus normaux extra-hypophysaires l'expression du gène de la POMC aboutissait à un ARN messenger plus court de 850 bases environ. Il en est ainsi notamment du cerveau, de la médullosurrénale et des gonades (97). Une autre forme courte de 1000 bases environ a également été décrite. Enfin, une forme longue de 1300 à 1400 bases a

été retrouvée, associée en proportions variables à la forme classique, dans certaines tumeurs extra-hypophysaires responsables d'une hypersecrétion d'ACTH, comme les tumeurs carcinoïdes (130,131,132), le cancer médullaire de la thyroïde (133), le phéochromocytome (134,135), l'adénocarcinome pulmonaire (136)...

Ces ARN messagers de taille différente peuvent être le fait soit de différences dans la maturation post-transcriptionnelle du transcrit primaire du gène de la POMC, soit de différences dans la transcription à partir de sites promoteurs distincts dans la structure du gène (97). Il a été montré des différences de longueur au niveau de l'extrémité 5' non traduite (117).

De plus il a été montré que, même au niveau de l'hypophyse saine, il pouvait exister un épissage alternatif entre l'exon 1 et l'exon 2 (117,137), aboutissant à 2 formes différentes d'ARN messenger. Les 2 formes sont présentes en proportions sensiblement égales. Cette hétérogénéité n'est pas retrouvée dans toutes les espèces. Les 2 ARN messagers ainsi produits sont identiques au niveau de la partie codant pour la POMC, cependant il n'est pas exclu que des différences fonctionnelles puissent exister.

C REGULATION

La synthèse de le POMC est soumise, au moins à l'état physiologique pour ce qui concerne l'hypophyse antérieure et intermédiaire, à une

régulation exercée d'une part par des hormones et d'autre part par des neuropeptides. Cette régulation passe, au moins en partie, par un contrôle de la transcription du gène, comme en témoignent les changements des taux d'ARN messagers codant pour la POMC lorsque ces substances sont administrées.

Ainsi, la CRH (138,139,140) et l'arginine vasopressine (AVP) (141,142) exercent un effet stimulateur direct sur la transcription du gène de la POMC. Ces deux hormones constituent à l'état physiologique les principaux modes d'adaptation de la sécrétion de POMC. L'action de l'AVP est très rapide, mise en œuvre dans les situations d'urgence, celle de la CRH est plus progressive et plus prolongée.

Au contraire, les glucocorticoïdes exercent un effet inhibiteur sur la transcription du gène (139,143,144,145), cet effet s'établissant en partie directement au niveau corticotrope (146) et en partie indirectement par l'intermédiaire de l'hypothalamus et des voies nerveuses (147,148). Parmi les autres hormones, la somatostatine entraîne une diminution de la production de POMC (149,150,151).

Concernant les neuropeptides, les catécholamines et les agonistes bêta-adrénergiques stimulent la transcription du gène de la POMC (152), on en déduit aisément que le stress a le même effet stimulant. Par contre la dopamine et les agonistes dopaminergiques ont un effet inhibiteur (153), ainsi que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) (154).

Enfin, la sérotonine (155), l'angiotensine II (156) et la bradykinine (157) peuvent être impliquées dans la production de peptides relatifs à la POMC par l'hypophyse.

Il semble que, pour la plupart des agents, la régulation de la transcription du gène, passe, au moins en partie, par l'activation ou l'inhibition de l'adénylate cyclase, et donc par la modulation des taux d'AMP cyclique (140,158,159). L'action de l'AVP se fait par l'intermédiaire du phosphatidylinositol phosphate (142).

Cependant, même à l'état physiologique, la régulation de la transcription du gène de la POMC varie d'un tissu à l'autre. Ainsi elle n'est pas identique au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse et de son lobe intermédiaire. Par exemple, les glucocorticoïdes et la CRH ont peu d'effets au niveau du lobe intermédiaire (147,160), et au contraire la dopamine a peu d'effets au niveau de l'antehypophyse (161), ces différences tenant vraisemblablement à des différences dans le nombre de récepteurs à ces substances.

La régulation de la transcription du gène de la POMC au niveau des tissus extra-hypophysaires est encore assez mal connue. Cependant de notables différences paraissent exister par rapport à l'antehypophyse (162). Ainsi, dans les tumeurs responsables d'une sécrétion ectopique d'ACTH, la production de POMC n'est pas modifiée par la CRH et les glucocorticoïdes (163), il a même été rapporté dans un tel cas une augmentation des taux d'ACTH en réponse aux glucocorticoïdes (164).

III LA PROOPIOMELANOCORTINE

La structure complète de la POMC, et notamment sa séquence d'acides aminés, est désormais bien connue dans de nombreuses espèces dont l'homme. La maturation du précurseur polypeptidique en peptides biologiquement actifs comporte une protéolyse sélective de la molécule et des modifications chimiques post-traductionnelles (165).

A STRUCTURE DE LA POMC

La structure de la POMC a été déterminée à la fois par des méthodes classiques d'étude de séquence et plus récemment par des techniques utilisant l'ADN recombinant (166,167). La structure générale et l'organisation de la POMC ont été très bien conservées tout au long de l'évolution des vertébrés, et il y a une grande homologie de séquence pour toutes les espèces de POMC caractérisées à ce jour (168,169) (figure 3).

Après transcription du gène et épissage des transcrits primaires, l'ARN messager ainsi produit sera traduit en pré-POMC, qui peut entrer dans l'appareil de Golgi grâce à la présence à son extrémité N-terminale d'un peptide signal. Au cours de cette translation des ribosomes vers le réticulum endoplasmique, le peptide signal de 26 acides aminés sera clivé par une signalase (170), produisant la POMC proprement dite.

La POMC est un polypeptide de 241 acides aminés contenant dans sa séquence, outre l'ACTH, les lipotropines, les endorphines et les mélanotropines (171). Les principales séquences bioactives sont encadrées par des associations d'acides aminés basiques (Lysine et Arginine) dans leurs 4 combinaisons possibles (Lys-Lys; Lys-Arg; Arg-Lys; Arg-Arg). Dix doublets sont ainsi formés, deux d'entre eux étant associés pour former un quadruplet au sein de la séquence de l'ACTH. Ces doublets et ce quadruplet constituent les sites des clivages protéolytiques que subit la molécule de POMC. Ainsi:

- le fragment N-terminal est compris entre l'extrémité N-terminale et le site Lys-Arg en position 77-78. Ce fragment contient dans sa séquence un doublet Arg-Lys et un doublet Arg-Arg encadrant la gamma 3-MSH.

- le Joining Peptide (JP) est compris entre le site Lys-Arg 77-78 et le site Lys-Arg 110-111.

- l'ACTH est comprise entre le site Lys-Arg 110-111 et le site Lys-Arg 151-152. La molécule comprend en son centre un quadruplet basique Lys-Lys-Arg-Arg en position 126 à 129.

- la beta-LPH se trouve entre le site Lys-Arg 151-152 et l'extrémité C-terminale. Dans sa séquence elle contient 3 sites potentiels de clivage: 1 doublet Lys-Arg en position 209-210 et 2 doublets Lys-Lys aux positions 189-190 et 238-239.

La molécule de POMC contient à son extrémité N-terminale quatre résidus cystéine jouant un rôle important dans le maintien conformationnel de la molécule par l'intermédiaire de ponts disulfures (172).

B MATURATION PROTEOLYTIQUE DE LA POMC

Pour produire des peptides biologiquement actifs la molécule de POMC doit subir plusieurs clivages protéolytiques libérant ces peptides (figure 4). La première étape de cette maturation est donc le clivage du peptide signal N-terminal, assuré par une signalase, au moment où le précurseur pénètre dans l'espace intracisternal du réticulum endoplasmique.

La maturation protéolytique de la molécule de POMC a lieu à l'intérieur des vésicules de sécrétion (173,174). Il fait appel à deux types d'enzymes dont l'action est complémentaire. Tout d'abord une endopeptidase réalise une coupure de nature trypsique au niveau des doublets dibasiques flanquant les séquences des peptides bioactifs contenues à l'intérieur de la molécule de POMC, permettant à ces séquences d'être libérées (175,176). La nature de cette enzyme reste mal connue, on ignore d'ailleurs si une seule ou plusieurs enzymes sont en cause. Ensuite une exopeptidase excise les acides aminés basiques restant accrochés aux extrémités des fragments libérés par l'endopeptidase, générant ainsi les peptides actifs. Il existe une carboxypeptidase et une aminopeptidase selon l'extrémité considérée (177,178).

Cette maturation par clivage protéolytique n'est pas identique dans tous les tissus capables de produire de la POMC (91):

- dans l'hypophyse antérieure normale ou tumorale seuls les doublets Lys-Arg sont utilisés, conduisant donc à la production en quantité équimolaire de fragment N-terminal (179,180), de Joining Peptide,

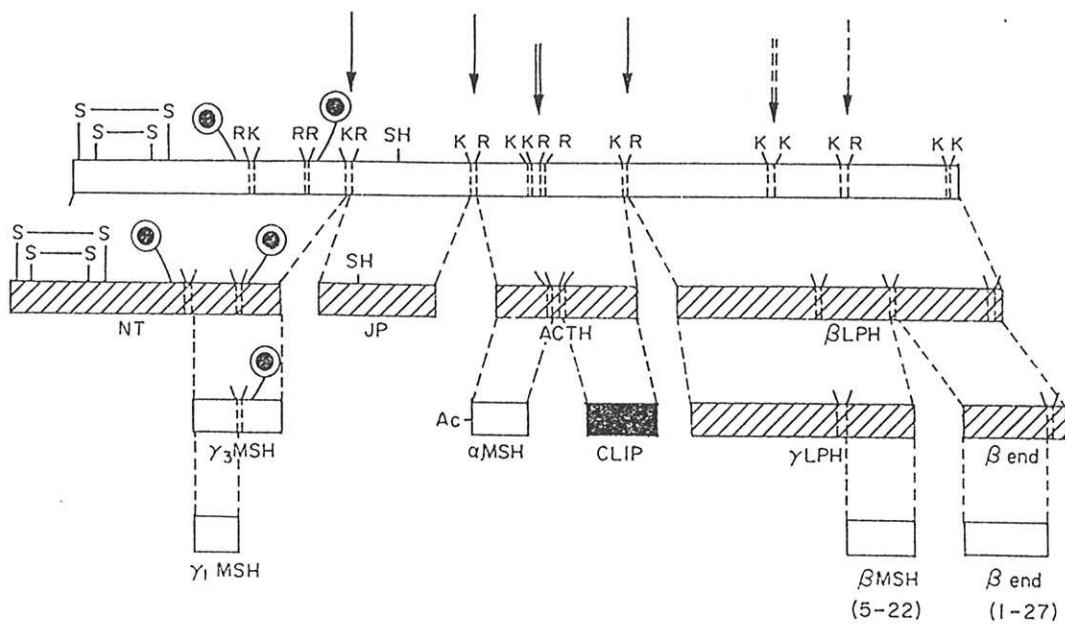


Figure 4

Schéma de maturation de la POMC
(d'après réf. 181)

d'ACTH et de beta-LPH. Le site Lys-Arg 209-210 de la beta-LPH n'est utilisé que partiellement, clivant certaines molécules de beta-LPH en gamma-LPH et en beta-endorphine.

- dans l'hypophyse intermédiaire (qui, rappelons-le, n'existe pas chez l'homme en dehors de la période foétale) et dans les tissus extra-hypophysaires synthétisant la POMC tous les sites de clivage peuvent être utilisés, conduisant à une maturation plus poussée de la molécule. Ainsi, le clivage des sites Arg-Lys et Arg-Arg libère la gamma 3-MSH à partir du fragment N-terminal; le clivage du quadruplet Lys-Lys-Arg-Arg 126-129 libère la alpha-MSH et le CLIP (Corticotropin-Like Intermediary lobe Peptide) (181) à partir de l'ACTH; le clivage des sites Lys-Lys 189-190 et Lys-Lys 238-239 libèrent respectivement la beta-MSH (182,183) et la beta-endorphine 1-27.

C ACTH ET CLIP (figure 5)

L'ACTH et le CLIP seront principalement étudiés dans ce travail et méritent à ce titre un développement particulier.

1°) L'ACTH

L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés (figure 5), dont l'activité biologique est assurée par la séquence 1-24, très bien conservée d'une espèce à l'autre. La partie C-terminale 25-39 confère à la molécule une prolongation de sa durée d'action, c'est au niveau de ce fragment que se situent les principales

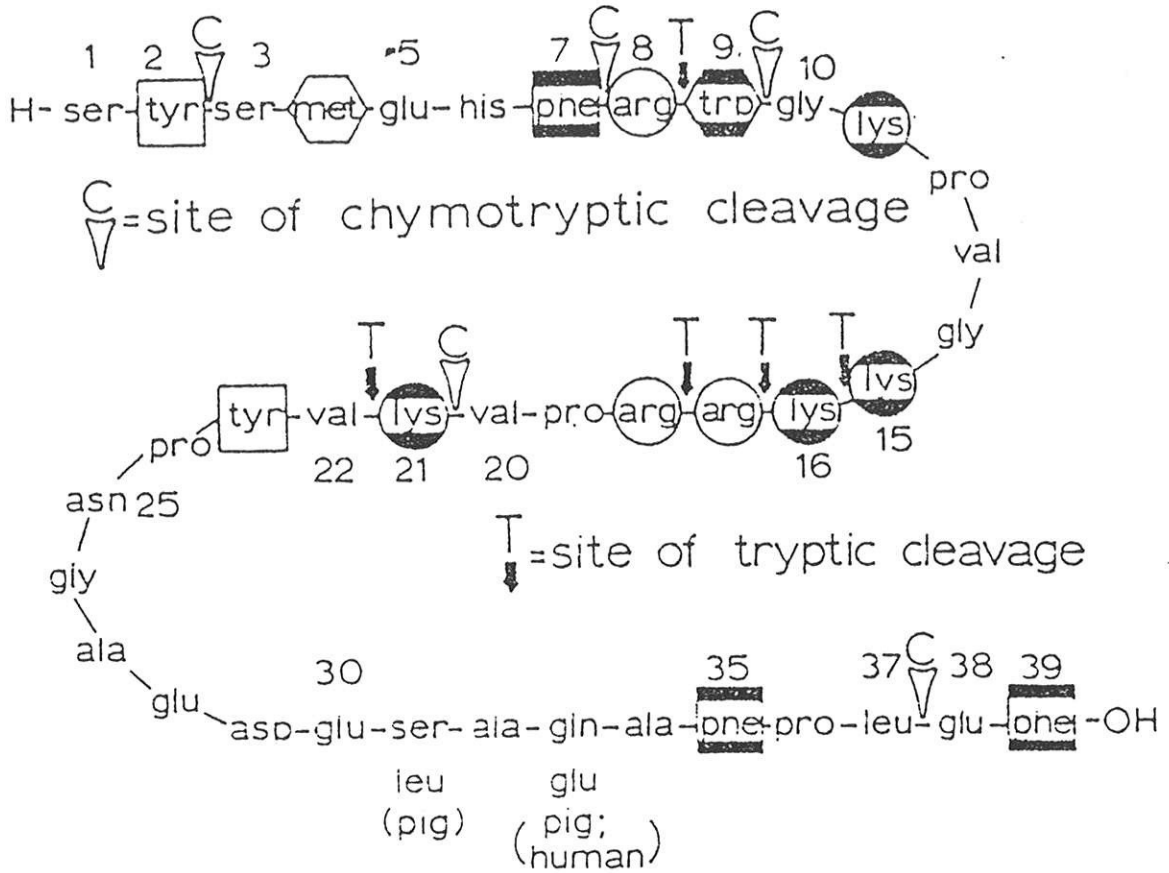


Figure 5

Structure de la molécule d'ACTH des mammifères
 (d'après réf. 89)

différences entre espèces (acides aminés 31 et 33 notamment).

C'est une molécule flexible, particulièrement au niveau du segment 10-21, et elle est capable d'adopter une conformation préférentielle dans certains milieux.

2°) Le CLIP

Le CLIP, mis en évidence en 1974 dans le lobe intermédiaire d'hypophyse de rat et de porc, est un peptide de 22 acides aminés présentant la même séquence peptidique que la partie C-terminale 18-39 de la molécule d'ACTH. Chez l'homme adulte, où le lobe intermédiaire n'existe plus, ce peptide n'est en principe pas retrouvé à l'état physiologique. Par contre, en cas de tumeur extra-hypophysaire capable d'exprimer le gène de la POMC, le site de clivage contenu dans la structure de la molécule d'ACTH est utilisé, et du CLIP est produit en quantité appréciable.

Ce clivage se réalise au niveau du quadruplet Lys-Lys-Arg-Arg en position 15 à 18 de l'ACTH, libérant donc le CLIP et l'alpha-MSH, l'ACTH peut donc être considérée comme une pro-hormone pour ces deux peptides. L'alpha-MSH n'a cependant jamais pu être mise en évidence dans le plasma chez l'homme. Un clivage trypsique s'effectue entre les acides aminés 16 et 17, puis une aminopeptidase libère le résidu Arg 17 pour donner le CLIP (18-39), tandis qu'une carboxypeptidase libère le résidu Lys 15 pour donner l'alpha-MSH.

Le rôle biologique du CLIP est mal connu, on pense qu'il pourrait stimuler l'insulinosécrétion. Une action sur le sommeil est également évoquée.

D AUTRES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES

La molécule de POMC et les peptides qui en dérivent peuvent subir des modifications chimiques, la plupart ayant lieu dans l'appareil de Golgi ou dans les vésicules de sécrétion en même temps que le clivage protéolytique.

1°) Glycosylations

Dans l'appareil de Golgi la molécule de POMC peut subir des glycosylations. Il peut s'agir d'une O-glycosylation sur un résidu sérine ou thréonine du fragment N-terminal (184) ou d'une N-glycosylation, plus complexe, sur l'asparagine de la séquence Asn-Gly-Ser de la gamma 3-MSH. Chez le rat une N-glycosylation peut avoir lieu au niveau de la molécule de CLIP sur l'asparagine 29 de la molécule d'ACTH (185), mais cette N-glycosylation ne semble pas exister chez l'homme à l'état physiologique.

2°) Phosphorylations

Chez le rat (186) et chez l'homme (187) environ 30% de l'ACTH est phosphorylée sur le résidu sérine 31 (188), cette réaction ayant également lieu dans l'appareil de Golgi. L'ACTH phosphorylée et l'ACTH

non phosphorylée semblent avoir une activité stéroïdogénique identique (189).

3°) Amidations

Certains des peptides générés par la POMC sont amidés à leur extrémité C-terminale, cette amidation se réalisant dans les vésicules de sécrétion (190). Dans certains cas cette amidation est essentielle pour une pleine activité biologique du peptide, et de plus elle permet de protéger le peptide de la dégradation par les carboxypeptidases extracellulaires. Cette amidation se réalise sur un résidu glycine C-terminal jouant le rôle de donneur d'azote (191).

L'alpha-amidation concerne essentiellement l'alpha-MSH (192). Plus récemment il a été montré que le Joining Peptide pouvait également être amidé à son extrémité C-terminale, tant au niveau de l'hypophyse antérieure que de l'hypophyse intermédiaire (193,194).

4°) Acétylations

La beta-endorphine (195) et l'alpha-MSH (196) sont alpha-acétylées à leur extrémité N-terminale, de façon substantielle au niveau du lobe intermédiaire de l'hypophyse, de façon moins importante dans l'antehypophyse et plusieurs autres tissus capables de synthétiser la POMC (108). Bien que la signification fonctionnelle de cette acétylation soit encore mal connue, la présence du groupement acétyl semble avoir d'importants effets sur l'activité

biologique tant de l'alpha-MSH que de la beta-endorphine (195,197).

5°) Oxydations

L'ACTH peut être oxydée sur le résidu méthionine en position 4. L'importance de cette oxydation est mal connue, mais il semble qu'elle puisse intervenir lors du vieillissement et entraîner une baisse d'activité biologique de l'ACTH (198).

6°) Sulfatations

Certaines études ont montré que le lobe intermédiaire de l'hypophyse de rat pouvait incorporer des groupements sulfate (199,200), qui paraissent se fixer sur les molécules de POMC de haut poids moléculaire, c'est-à-dire sur les formes glycosylées.

IV LES TUMEURS ACTH-SECRETANTES

De tout ce qui précède il apparait que l'on peut distinguer, en fonction des peptides produits et du mode de régulation, deux grandes catégories de tumeurs capables de provoquer un syndrome de Cushing par hyperproduction d'ACTH:

- les tumeurs "type antehypophyse", se comportant comme l'antehypophyse saine
- les tumeurs "type hypophyse intermédiaire" se comportant comme le lobe intermédiaire de l'hypophyse de certaines espèces animales

A LES TUMEURS "TYPE ANTEHYPOPHYSE"

Dans ce cas la maturation de la POMC n'est pas altérée qualitativement, ces tumeurs sécrètent les mêmes fragments peptidiques que ceux retrouvés dans l'antehypophyse saine. Deux situations physiopathologiques correspondent à ce cadre:

- la maladie de Cushing, où l'origine de la tumeur est vraisemblablement primitivement hypophysaire, bien qu'une origine hypothalamique ne soit pas exclue. Ces tumeurs sont responsables d'un syndrome de Cushing le plus souvent modéré, d'évolution modérément rapide. Elles représentent la principale cause des syndromes de Cushing, survenant surtout entre 30 et 50 ans, le plus souvent chez la femme. Les glucocorticoïdes sanguins et urinaires sont modérément élevés, et répondent aux tests dynamiques les plus puissants. L'ACTH est détectable, en règle normale ou modérément élevée, habituellement inférieure à 200 pg/ml, la LPH est élevée dans les mêmes proportions. Toutes deux répondent aux stimulations. Il s'agit généralement de microadénomes sécrétant des quantités relativement faibles d'ACTH.

- le syndrome de Nelson, où le développement de la tumeur antehypophysaire est secondaire à une surrénalectomie bilatérale. La régulation négative exercée par les glucocorticoïdes est alors perdue, d'où une stimulation excessive de l'hypophyse. Le taux d'ACTH est généralement élevé voire très élevé. Le rapport ACTH/LPH reste normal, les tests dynamiques

sont positifs. Les tumeurs sont généralement plus grosses

B LES TUMEURS "TYPE HYPOPHYSE INTERMEDIAIRE"

L'hypophyse intermédiaire, retrouvée dans certaines espèces animales comme le rat, n'existe pas chez l'homme, tout au moins en dehors de la période foétale. Certaines tumeurs humaines responsables d'une hypersécrétion ectopique d'ACTH ont cependant des caractéristiques les rapprochant de l'hypophyse intermédiaire.

Ces tumeurs sont responsables d'un syndrome de Cushing généralement sévère et rapidement évolutif. Ce syndrome de Cushing "paranéoplasique" est rare, et survient aussi souvent chez l'homme que chez la femme. Les glucocorticoïdes sanguins et urinaires sont généralement très élevés et ne répondent pas aux tests dynamiques même puissants. Les taux d'ACTH sont généralement très élevés, la LPH et les autres peptides dérivés de la POMC sont encore plus élevés, avec un rapport LPH/ACTH très élevé. Ces peptides ne sont pas stimulables.

Dans ces tumeurs, comme dans l'hypophyse intermédiaire, la maturation de la POMC est qualitativement différente de ce qu'elle est dans l'antehypophyse. Des sites de maturation nouveaux sont en effet utilisés, conduisant à la synthèse de peptides plus petits, et notamment de CLIP à partir de l'ACTH.

De nombreuses tumeurs, le plus souvent malignes, peuvent être responsables d'une hypersécrétion ectopique d'ACTH. Les plus fréquentes sont le cancer bronchique, notamment anaplasique à petites cellules, les tumeurs carcinoïdes de diverses localisations, les thymomes malins, les tumeurs pancréatiques. De très nombreuses autres tumeurs ont été, bien que plus rarement, rendues responsables d'un syndrome de Cushing paranéoplasique (cancers digestifs, cancer médullaire de la thyroïde, phéochromocytome, tumeurs ovariennes, néphroblastomes, cancer colique,...)

ETUDE DES DERIVES DE
L'ACTH DANS LE
PLASMA

Il est donc maintenant bien établi que d'importantes différences existent entre la production d'ACTH par les tumeurs antehypophysaires et cette même production par les tumeurs ectopiques, et que ces différences se retrouvent au niveau des peptides excrétés dans le plasma.

Le but de cette étude est de mettre à profit ces différences pour tenter d'établir un moyen permettant de distinguer de façon précise les patients présentant une hypersécrétion d'ACTH d'origine hypophysaire et ceux présentant une hypersécrétion ectopique d'ACTH.

Pour cela il a donc été nécessaire de mettre au point une technique permettant dans un premier temps de séparer les différents peptides présents dans le plasma de ces patients, et dans un second temps de reconnaître ces peptides.

I MATERIEL ET METHODES

A CHOIX DES PATIENTS - RECUEIL DES PLASMAS

Les patients ont été sélectionnés parmi ceux suivis dans le service d'explorations fonctionnelles endocriniennes pour syndrome de Cushing ACTH-dépendant, soit par tumeur antehypophysaire soit par tumeur ectopique. Le sang de ces patients a été prélevé sur EDTA, immédiatement centrifugé, le plasma étant séparé de la phase globulaire et congelé à -20° C. Les échantillons sont

décongelés individuellement à la demande pour une manipulation.

Afin de faciliter l'étude et compte tenu du rendement limité de la technique, les plasmas très riches en ACTH ont été utilisés en priorité. 11 patients ont ainsi été étudiés:

- 6 (4 femmes et 2 hommes) avaient un syndrome de Nelson:

. patiente 1: ACTH: 25 036 pmol/l;

LPH: 32 277 pmol/l

. patient 2: ACTH: 2 360 pmol/l

LPH: 8 215 pmol/l

. patiente 3: ACTH: 713 pmol/l

LPH: 1 377 pmol/l

. patiente 4: ACTH: 4 413 pmol/l

LPH: 7 462 pmol/l

. patiente 5: ACTH: 2 053 pmol/l

LPH: 2 327 pmol/l

. patient 6: ACTH: 122 pmol/l

LPH: 330 pmol/l

- 1 patiente avait une maladie de Cushing/

. patiente 7: ACTH: 94 fmol/l

LPH: 190 pmol/l

- 4 patients (3 femmes et 1 homme) avait un syndrome de Cushing paranéoplasique (une tumeur carcinoïde du poumon, un gastrinome pancréatique, deux cancers pulmonaires):

. patient 8: ACTH: 828 pmol/l

LPH: 7 000 pmol/l

. patiente 9: ACTH: 2 126 pmol/l

LPH: 9 937 pmol/l

- . patiente 10: ACTH: 122 pmol/l
LPH: 475 pmol/l
- . patiente 11: ACTH: 281 pmol/l
LPH: 3540 pmol/l

B PURIFICATION DES PLASMAS

Les plasmas décongelés ne sont pas utilisables tels quels pour la suite de la manipulation, et notamment pour la chromatographie où les grosses protéines et autres molécules dissoutes colmateront les pores de la colonne mesurant quelques microns. Les échantillons doivent donc subir une purification préalable et les peptides à étudier doivent être extraits de la phase plasmatique.

1°) Chauffage et centrifugation

Dans une première étape les plasmas sélectionnés sont chauffés dans un bain-marie à 58 °C pendant 40 minutes. Cette température de 58 °C est importante à respecter car une température trop faible rendrait cette opération inutile, mais un chauffage à plus de 60 °C dénaturerait les protéines à étudier. Ce chauffage des échantillons a pour but d'inactiver les enzymes dégradant la POMC et ses dérivés, et notamment l'ACTH. Après ce chauffage les échantillons sont centrifugés à 3500 g pendant 10 minutes, ce qui permet d'éliminer dans le culot les cryoprotéines formées lors de la congélation. Le surnageant est recueilli pour l'étape ultérieure de la manipulation.

2°) Extraction des peptides

La purification et l'extraction proprement dites font appel à une première technique de chromatographie liquide en phase inverse, de réalisation simple et rapide. La phase stationnaire est constituée de chaînes hydrocarbonées à 18 atomes de carbone greffées sur une silice, le tout étant conditionné dans de petites cartouches à usage unique (SEP-PAK C18, Waters Associates). En utilisant les solvants de polarité appropriée, on peut ainsi extraire l'ACTH et le CLIP, contenus dans une fraction débarrassée de la majeure partie des grosses molécules et grosses protéines dissoutes.

Les solvants sont composés d'acétonitrile, d'eau distillée et d'acide heptafluorobutyrique (HFBA) en proportions variables. On procède de la façon suivante:

- lavage de la cartouche par 2 ml d'acétonitrile pur.
- rinçage de la cartouche par 4 ml d'eau distillée + 0,1% d'HFBA.
- chargement de la cartouche avec l'échantillon de plasma dilué de la façon suivante: 1 ml du surnageant obtenu après centrifugation est additionné à 1 ml d'eau distillée + 0,1% d'HFBA. La plupart des protéines et certaines autres substances plasmatiques sont retenues sur la phase stationnaire.
- 1^{er} rinçage de la cartouche par 4 ml d'eau distillée + 0,1% d'HFBA, qui élimine bon nombre de grosses molécules dissoutes.
- 2^{ème} rinçage par 3 ml d'un solvant contenant 85% d'eau distillée, 15% d'acétonitrile et 0,1% d'HFBA, qui élimine certaines protéines.
- élution proprement dite par 3 ml d'un solvant composé de 20% d'eau distillée, 80% d'acétonitrile et

0,1% d'HFBA. La polarité de ce solvant est très faible, ce qui permet de décrocher de la phase stationnaire les protéines très polaires, comme le sont l'ACTH et le CLIP.

Seule cette dernière fraction contenant les peptides étudiés sera recueillie. Elle est dans un premier temps congelée à -80°C , puis lyophilisée pendant 48 heures. Cette lyophilisation permet de concentrer l'échantillon recueilli, étape nécessaire avant la phase ultérieure de séparation à proprement parler.

Afin de s'assurer que l'ACTH et le CLIP ont bien été recueillis dans l'éluat on utilise des marqueurs radio-actifs. En effet quelques fmoles d'ACTH et de CLIP marqués à l'iode 125 (ACTH* et CLIP*) sont rajoutées au plasma avant traitement, et pourront donc par la suite être repérées dans les diverses fractions recueillies. Si l'extraction s'est correctement effectuée la plus grande part de la radio-activité doit être recueillie dans la dernière fraction. On peut d'ailleurs ainsi évaluer approximativement le rendement de l'extraction.

C CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE

1° Principe (201)

Le terme "chromatographie" regroupe plusieurs techniques de séparation de molécules contenues dans un échantillon quelconque, cette

séparation se faisant en fonction de différences parfois minimes dans certaines propriétés physiques, comme par exemple la solubilité dans l'eau ou dans des solvants organiques, la charge positive ou négative, la taille, le poids...(202).

La chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HP^{LC}) est une chromatographie de partage utilisant les interactions de type hydrophobe entre d'une part une phase stationnaire inerte comportant des greffons apolaires, et d'autre part une phase mobile hydrophile de composition variable, sa polarité diminuant au fur et à mesure que la proportion du solvant hydrophobe contenue dans le mélange augmente (203) Elle est dénommée "en phase inverse" par opposition à la technique primitivement décrite où la phase stationnaire est hydrophile et la phase mobile peu polaire et de polarité croissante.

Les peptides étudiés (CLIP et ACTH) sont polaires, et sont initialement captés par la phase stationnaire, et sont d'autant plus retenus que la polarité de la phase mobile est forte, c'est-à-dire que la teneur en eau du mélange est grande. Plus la proportion de solvant organique augmente et plus la polarité du mélange diminue. Au fur et à mesure que la polarité de la phase mobile diminue les peptides sont progressivement décrochés de la phase stationnaire et entraînés par la phase mobile.

Ce système permet donc une séparation fine et rapide des peptides en fonction de leur caractère plus ou moins hydrophobe.

2°) Descriptions des deux phases

a) Phase stationnaire

La phase stationnaire, appelée "colonne", est formée de chaînes hydrocarbonées hydrophobes, de longueur variable, greffées sur une phase solide inerte, le plus souvent une silice, constituant un réseau à mailles très fines. Le volume de la colonne est diminué au maximum grâce à la faible taille des particules solides. Ceci permet une meilleure efficacité en ce qui concerne la séparation, mais nécessite d'augmenter très fortement la pression permettant à la phase liquide de traverser la colonne. Celle-ci est donc contenue dans un tube métallique capable de résister à des pressions très fortes.

Dans cette étude nous avons utilisé du nucléosyl 300 Angströms - 5 microns greffé de chaînes à 8 atomes de carbone.

b) phase mobile

Elle est formée d'un mélange en proportions variables d'eau distillée et d'un solvant organique. L'eau est un composé très polaire (paramètre p' de Rohrschneider = 10,2), les solvants organiques employés ayant une polarité très nettement inférieure ($p' = 5,8$ pour l'acétonitrile). Pendant la chromatographie on fait augmenter progressivement la teneur du mélange en acétonitrile, rendant la phase mobile de plus en plus hydrophobe.

L'eau employée doit être rigoureusement exempte de matières organiques, sous peine de modifier radicalement les conditions de séparation. On utilise donc de l'eau scrupuleusement distillée préparée extemporanément. Cette eau distillée est dans un second temps purifiée sur une cartouche de SEP-PAK lavée par de l'acétonitrile puis rincée par de l'eau distillée. Enfin cette eau est débarrassée d'éventuelles impuretés résiduelles par filtration sur une membrane poreuse à pores très fins (Millipore 0,4 micron).

La préparation des deux solvants se fait en mélangeant, en proportions bien définies, l'eau distillée ainsi obtenue et de l'acétonitrile. Ces solvants sont préparés au dernier moment avant chaque chromatographie. Le dosage de chaque composant doit être très précis, des différences même minimes pouvant entraîner des modifications importantes de la cinétique de séparation, les résultats sont alors peu reproductibles d'une manipulation à l'autre.

Les mélanges doivent être parfaitement homogénéisés par agitation pour que leur composition soit constante tout au long du travail. Le mélange eau distillée/acétonitrile se fait généralement avec une rétraction de volume notable dont il faut tenir compte.

Enfin, les solvants doivent être parfaitement "dégazés" afin d'éviter que les microbulles pouvant être contenues dans le mélange ne gênent l'écoulement de la phase liquide en colmatant les pores de la colonne. Ce dégazage doit être rapide, sous peine de voir les solvants se dégrader, et le plus complet possible. L'expérience a montré que ces deux

impératifs étaient respectés en utilisant l'action conjointe du vide et des ultra-sons. Les flacons contenant les solvants sont donc branchés sur une pompe à vide et simultanément agités dans une cuve à ultra-sons. Cette technique permet un dégazage complet en quelques secondes.

Au mélange eau distillée/acétonitrile on rajoute au dernier moment un composé ionisé acide formant avec les peptides (ions de signe contraire) une paire d'ions qui sera extraite par la phase mobile. On couple donc une chromatographie par échange d'ions à la RP-HPLC classique. De plus l'acidité de la phase mobile facilite la libération de l'ACTH de la phase solide, ce peptide ayant la propriété de "coller" facilement sur les supports solides quelqu'ils soient. Dans ce travail nous avons utilisé l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) à la proportion de 0,1%.

3°) Appareillage (figure 6)

La pratique de la RP-HPLC nécessite l'usage d'un matériel complexe et sophistiqué. Le système se compose (figure 7):

- de deux réservoirs contenant les deux solvants (solvant A riche en eau et donc le plus polaire, et solvant B plus riche en acétonitrile et donc moins polaire).

- d'un ensemble bi-pompe (LKB 2150 HPLC Pump) composé de deux pompes indépendantes, correspondant chacune à un des solvants. Chaque pompe possède deux pistons fonctionnant en opposition de phase, ce qui permet un débit parfaitement constant sans à-coups de pression.

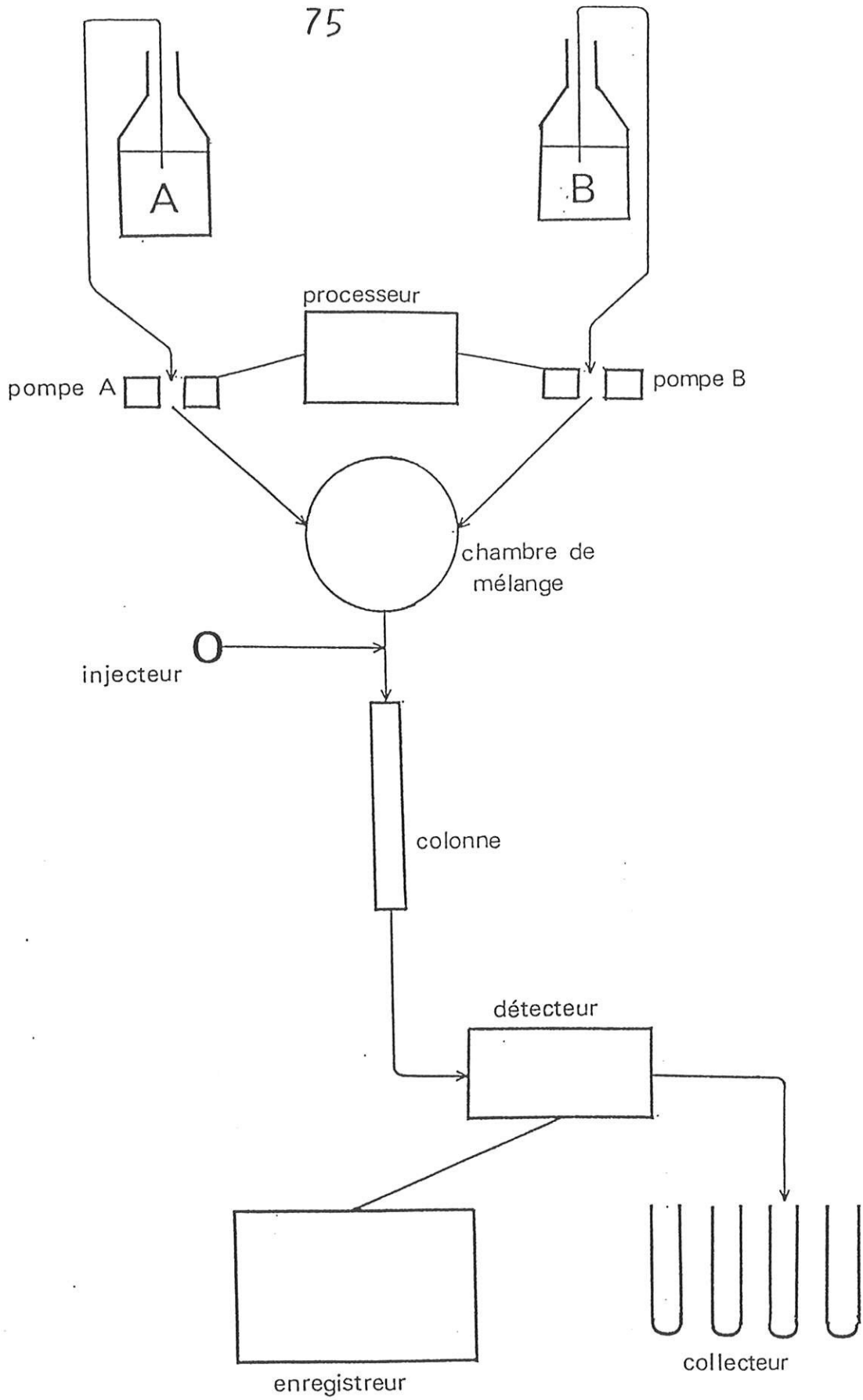


Figure 6

Schéma général de l'appareillage utilisé en HPLC

- d'une chambre de mélange située en aval des pompes, le mélange s'effectue donc à haute pression.
- d'un dispositif électronique de pilotage des pompes (LKB 2152 HPLC Controller) régulant en permanence et automatiquement, selon un programme pré-établi, le débit de chacune des pompes, et donc la composition de la phase mobile. Le programme débute en solvant A seul (0% de solvant B), puis le pourcentage de solvant B augmente progressivement, ce qui crée le gradient d'élution.
- d'un injecteur d'échantillon constitué d'une vanne à boucle de 200 microlitres type Rhéodyne, actionnée manuellement et permettant l'injection de l'échantillon dans la phase liquide en mouvement et sous pression peu avant l'entrée dans la colonne.
- d'une colonne (Brownlee Aquapore) d'une longueur de 25 cm et d'un diamètre interne de 4,6 mm. Cette phase stationnaire est constituée de nucléosyl 300 Angströms - 5 microns - C 8 et est contenue dans un cylindre d'acier capable de résister à des pressions de plusieurs centaines de bars. La colonne est protégée en amont par une pré-colonne de même composition, d'une longueur de 3 cm, retenant les impuretés pouvant subsister dans l'échantillon et s'accumuler au fur et à mesure des utilisations. Cette pré-colonne est régulièrement changée, et permet de prolonger la durée d'emploi de la colonne dans de bonnes conditions.
- d'un détecteur capable de reconnaître dans certaines conditions les peptides séparés par la colonne à la sortie de celle-ci. Nous avons utilisé un spectromètre d'absorption des ultra-violetts (LKB 2158 Univord SD) réglé sur la longueur d'ondes 226 nm, correspondant approximativement à la longueur d'onde spécifique de la liaison peptidique. Cependant ce

détecteur n'est capable de reconnaître que de très grandes quantités de peptide, de l'ordre du microgramme. Même dans les plasmas étudiés, très riches en ACTH et peptides dérivés, ces concentrations ne sont jamais atteintes et ce détecteur ne permet pas de suivre la séparation des peptides.

- d'un collecteur de fractions programmable (LKB 2212 Hélicon), recueillant de façon automatique l'éluat sortant de la colonne et après passage dans le détecteur, sous formes de fractions de volume standardisé pré-établi.

- d'un enregistreur (LKB 2210 Recorder) donnant sur un même graphique le profil du gradient d'élution, l'indication du moment d'injection et des fractions recueillies, et le profil d'absorption UV lorsque les quantités de peptides sont suffisantes.

La première partie du système, en amont des pompes, se trouve en basses pressions, les raccords se font grâce à des tubulures en matériau synthétique souple. En aval des pompes la circulation du liquide se fait en hautes pressions (70 à 100 bars environ), les connections sont donc assurées par des tubulures en acier, de faible section de façon à limiter au maximum le volume mort, mais très résistantes.

4°) Réalisation pratique

a) Composition des solvants employés

Les solvants sont donc préparés de façon extemporanée comme indiqué précédemment. Les solvants utilisés avaient la composition suivante:

>> solvant A

- . eau distillée: 85%
- . acétonitrile: 15%
- . HFBA: 0,1%.

>> solvant B

- . eau distillée: 40%
- . acétonitrile: 60%
- . HFBA: 0,1%.

b) Préparation et injection de l'échantillon

L'échantillon lyophilisé est remis en solution par 230 microlitres de solvant A, puis centrifugé à 3500 g pendant 10 minutes afin d'éliminer dans le culot les microparticules insolubles qui risqueraient de colmater la colonne. Dans certains cas où l'échantillon gardait un aspect trouble après la première centrifugation, une deuxième centrifugation du surnageant, identique à la première, a été réalisée.

Après centrifugation 200 microlitres du surnageant sont récupérés dans une seringue de précision Hamilton de 250 microlitres et introduits dans la boucle d'injection. L'injection proprement dite se fait manuellement par rotation rapide de la vanne, l'échantillon est alors entraîné en tête de colonne par la phase liquide en mouvement. Ce système permet une injection à haute pression au plus près de l'entrée dans la colonne.

Le gradient d'élution est lancé au moment de l'injection.

c) Gradient d'élution

Après essais de plusieurs profils d'élution, le choix s'est fixé sur le gradient suivant, permettant un bon compromis entre une séparation nette des peptides étudiés et l'obtention de pics le plus fins possibles:

- injection au temps 0
- de 0 à 4 minutes: gradient isocratique en solvant A pur (0% de solvant B), permettant une ultime purification de l'échantillon débarrassé d'une grande partie des protéines restant dissoutes
- de 4 à 47 minutes: élution proprement dite par un gradient linéaire faisant passer progressivement la teneur du mélange de 0 à 80% de solvant B
- de 47 à 47,2 minutes: augmentation rapide et linéaire de 80 à 100% de solvant B.
- de 47,2 à 57 minutes: rinçage de la colonne en solvant B pur. Un rinçage court en acétonitrile pur, puis en solvant A pur est systématiquement réalisé entre chaque série de chromatographies.

Le débit de la phase mobile est de 1,5 ml/mn et reste constant pendant toute la chromatographie. Le recueil se fait par tranches de 30 secondes entre la 21^è et la 45^è minutes, soit 50 fractions de 750 microlitres chacune. La pression est très élevée en début d'épreuve, de l'ordre de 80 à 100 bars selon l'ancienneté de la colonne, et diminue en cours de chromatographie jusqu'à 60 bars environ. La densité de l'acétonitrile est en effet inférieure à celle de l'eau, et la résistance à l'écoulement diminue au fur et à mesure que le mélange s'enrichit en acétonitrile.

d) Détection et étalonnage

Avant de poursuivre l'étude et notamment de passer à l'étape du dosage radio-immunologique il est nécessaire de repérer, au moins approximativement les fractions où ont élués les peptides étudiés. Ce sont bien évidemment ces fractions et celles les environnant qui feront l'objet du dosage. Or, d'une chromatographie à l'autre de minimes différences dans la composition des solvants existent inévitablement, risquant de déplacer le profil d'élution de quelques fractions vers la gauche ou vers la droite. En l'absence de repérage les fractions extrêmes, souvent parmi les plus intéressantes, peuvent échapper au dosage. De plus, avant d'entreprendre le dosage radio-immunologique il est prudent de s'assurer que les peptides étudiés ont bien été récupérés.

Comme il a été signalé plus haut le détecteur employé ne permet pas de reconnaître les peptides considérés aux concentrations où ils se trouvent dans les plasmas étudiés. Il a donc été nécessaire d'imaginer d'autres techniques permettant de repérer les fractions intéressantes sans altérer la séparation. Deux techniques, différentes dans leur principe mais équivalentes dans leurs résultats ont été successivement employées.

Dans un premier temps nous avons employé des marqueurs radio-actifs comme moyen de détection. A l'échantillon injecté nous avons adjoint quelques fmoles d'ACTH et de CLIP marqués à l'iode 125 (ACTH* et CLIP*). Il s'est avéré que l'ACTH* élue dans la même fraction que l'ACTH "froid" ou une fraction

après, et que le CLIP* élue 2 à 3 fractions après le CLIP froid. Après la chromatographie il nous a donc suffi de placer les fractions recueillies dans un compteur gamma afin de s'assurer que les peptides étudiés étaient bien contenus dans ces fractions, repérer les fractions contenant ACTH* et CLIP* et en déduire celles contenant l'ACTH et le CLIP froids.

Cette technique s'est avérée tout à fait satisfaisante tant que l'on s'intéressait à des plasmas très riches en ACTH et en CLIP (plusieurs centaines voire milliers de pmoles/l). Les quelques fmoles de peptides marqués n'avaient alors aucun retentissement sur les résultats des dosages. Par contre, lorsque nous avons étudié des plasmas moins riches en peptides (quelques dizaines de pmoles/l), le peptide marqué se retrouvait proportionnellement plus abondant par rapport au peptide froid et les résultats se trouvaient modifiés de façon faible mais non négligeable. Ceci était surtout important pour le CLIP, où un pic artificiel faible, mais nettement visible, était retrouvé au niveau de la fraction d'élution du CLIP*. Ce problème n'a pas pu être résolu, même en diminuant au maximum la quantité de traceur.

Afin de contourner cette difficulté nous avons choisi de substituer aux traceurs radio-actifs des marqueurs colorés. Deux colorants ont été employés simultanément, le bleu de bromophénol et le rouge de méthyle, qui éluent, dans les conditions employées, dans la même zone que l'ACTH et le CLIP. En effet dans ces conditions le premier d'entre eux élue environ 8 à 10 fractions avant le CLIP et le second 13 à 14 fractions avant l'ACTH. Ces colorants nous ont donc

fourni un moyen de détection satisfaisant, en n'interférant pas bien entendu avec le dosage radio-immunologique.

Avant chaque série de chromatographies une chromatographie témoin (ou "blanc") est réalisée, l'échantillon injecté étant constitué de 200 microlitres de solvant A auxquels sont rajoutés de l'ACTH* et du CLIP*. Ce témoin permet d'étalonner le système avant d'injecter les échantillons de plasma. De plus, les fractions collectées lors de cette chromatographie témoin sont recueillies et lyophilisées de la même façon que les autres, et font l'objet du même dosage radio-immunologique, permettant ainsi de s'assurer qu'il n'y a pas eu de "relargage" par la colonne.

e) Lyophilisation

Les fractions recueillies à la sortie ne peuvent pas être utilisées telles quelles pour la suite de l'étude. En effet les solvants employés, et notamment l'HFBA, sont incompatibles avec la réalisation d'un dosage radio-immunologique. Ces fractions sont donc dans un premier temps congelées à -80° C dès leur recueil et lyophilisées. Pour éliminer autant que possible toute trace de solvant cette lyophilisation doit être poursuivie pendant au moins 48 heures.

D DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE

1°) Principe

Le dosage radio-immunologique est une méthode d'analyse quantitative, précise, de réalisation relativement simple, hautement spécifique et extrêmement sensible (204). Cette méthode utilise la combinaison d'un marqueur radioactif et d'une immunoréaction, dans laquelle la substance à doser joue le rôle d'antigène qui réagit avec une quantité définie de réactif (anticorps). Il s'agit donc de titrer un antigène à l'aide d'un anticorps.

Il s'agit d'une méthode de dosage par défaut de réactif, il y a en effet compétition entre une quantité définie d'antigène radio-marqué (le traceur) et une quantité indéfinie (à déterminer) d'antigène non marqué (le peptide à doser), pour une quantité définie d'anticorps, les anticorps étant en quantité insuffisante par rapport aux antigènes. Plus la quantité d'antigène à déterminer est grande et plus les chances de liaison à l'anticorps des molécules traceuses sont faibles, du fait de la quantité limitée d'anticorps .

Etant donné que les paramètres nécessaires à la détermination mathématique du dosage radio-immunologique ne sont généralement pas connus, on adopte pour les mesurer un système d'étalonnage à l'aide de standards (quantités connues du peptide à doser). L'étalonnage avec des échantillons normalisés a, de plus, l'avantage d'éliminer les petits écarts dans les résultats, dus à la réalisation même du dosage car, étant à peu près égaux pour les standards et pour les échantillons à doser, ils s'éliminent pour ainsi dire d'eux-mêmes.

2°) Réactifs utilisés

a) Traceur

On emploie comme traceur du CLIP marqué par de l'iode 125 selon la méthode de Hunter et Greenwood (205): de l' ^{125}I ode-Na est oxydé par de la chloramine T, libérant un atome d' ^{125}I qui se fixe sur le radical tyrosine en position 23 du CLIP; la réaction est arrêtée par addition d'un réducteur, le métabisulfite de sodium. Le protocole de marquage est le suivant:

- CLIP dilué en HCl 0,05 M: 1,5 microg/10 microl.
- tampon phosphate disodique 0,25 M: 10 microl, pour ramener le pH à 7,5.
- ^{125}I (Amersham): 0,5 mCi/10 microl.
- chloramine T diluée en tampon phosphate disodique 0,05 M (2,5 mg/5 ml - pH:7,5): 10 microl. Agitation au Vortex pendant 2 minutes.
- métabisulfite de Na dilué en tampon phosphate disodique 0,05 M (2,5 mg/5 ml - pH 7,5): 10 microl. Agitation au Vortex pendant 1 minute.

Le traceur est ensuite purifié afin d'éliminer l'iode non fixé au CLIP. Cette purification se fait par chromatographie sur colonne de Séphadex G 25, équilibrée par du tampon "Standard Diluant" (SD): Na_2HPO_4 0,06 M; EDTA disodique 0,0126 M; merthiolate 100 mg/l; pH 7,4) auquel on rajoute du Triton 0,1%. On recueille des fractions de 40 gouttes et, dans ces conditions, le CLIP* sort dans les fractions 18 à 20, l' ^{125}I libre éluant au delà de la fraction 30.

Le rendement de marquage est estimé à 90%; l'activité spécifique est de l'ordre de 180 microCi/ microg.

Les fractions correspondant au pic de CLIP* sont ensuite poolées, aliquotées et conservées à -20° C. Le traceur reste utilisable au moins 3 mois, en pratiquant une deuxième purification, identique à la première, juste avant emploi.

b) Anticorps

On utilise l'anticorps 41-29, permettant le dosage de l'ACTH C-terminal mis au point dans le laboratoire par Christine Gicquel en 1987 lors de son travail de DEA (figure 7). Il s'agit d'un anticorps polyclonal préparé en 1984 par immunisation d'un cobaye par de l'ACTH extraite d'hypophyse humaine. Il est dirigé contre l'épitope formé par les acides aminés 25 à 33 et 39 de la molécule d'ACTH. Il reconnaît donc l'ACTH (1-39) et le CLIP (18-39)

Il est employé dilué au 1/2500^e initial, dilution permettant d'obtenir un B₀/T aux alentours de 35%, afin d'obtenir une bonne sensibilité. Ses caractéristiques sont les suivantes:

- constante d'affinité: $K = 2,61 \times 10^{11}$ L/M.
- concentration en sites anticorps: $A_{50} = 2 \times 10^{-8}$ M/L.
- limites du dosage: 2 à 80 pmoles/l.

Les taux de réaction avec des peptides autres que l'ACTH sont les suivants (figure 8):

- CLIP (18-39): 100%.
- ACTH (22-39): 87,5%.
- ACTH (25-39): 93%.
- ACTH (34-39): 0,1%.

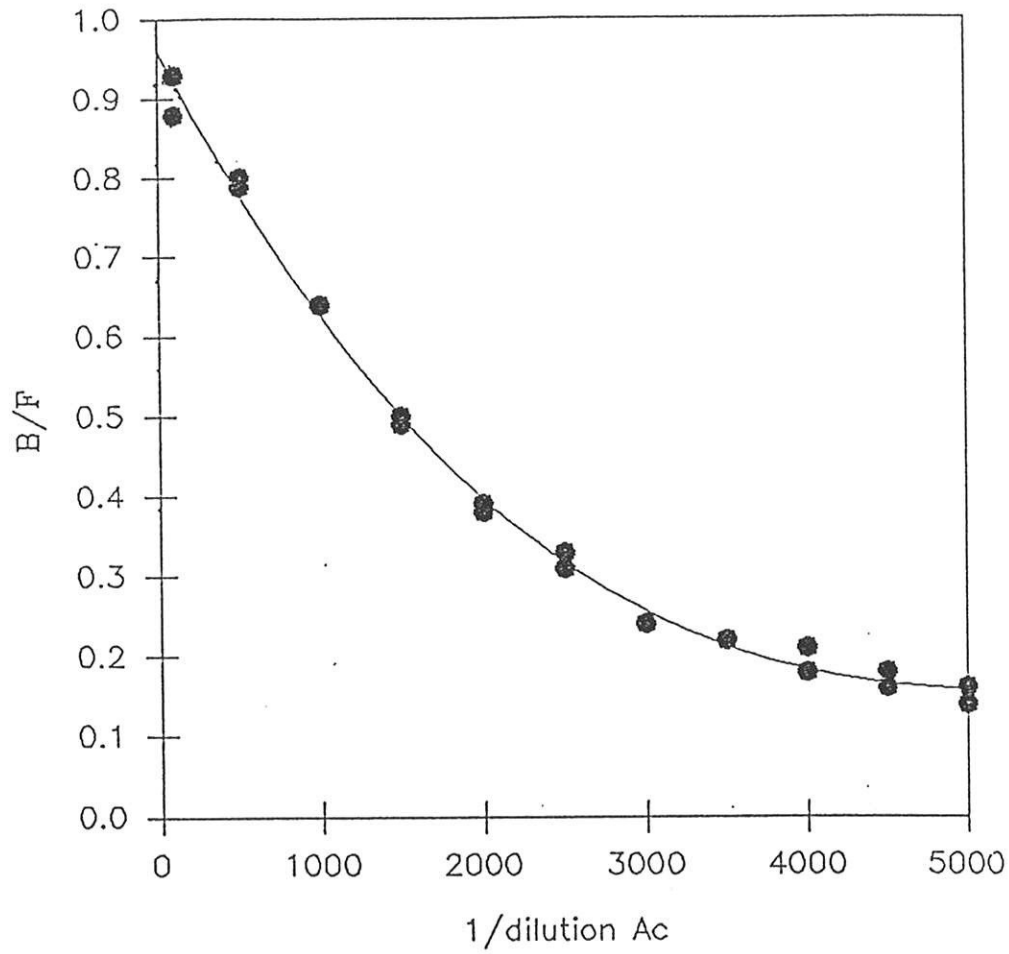


Figure 7

Courbe de titration de l'anticorps 41-29

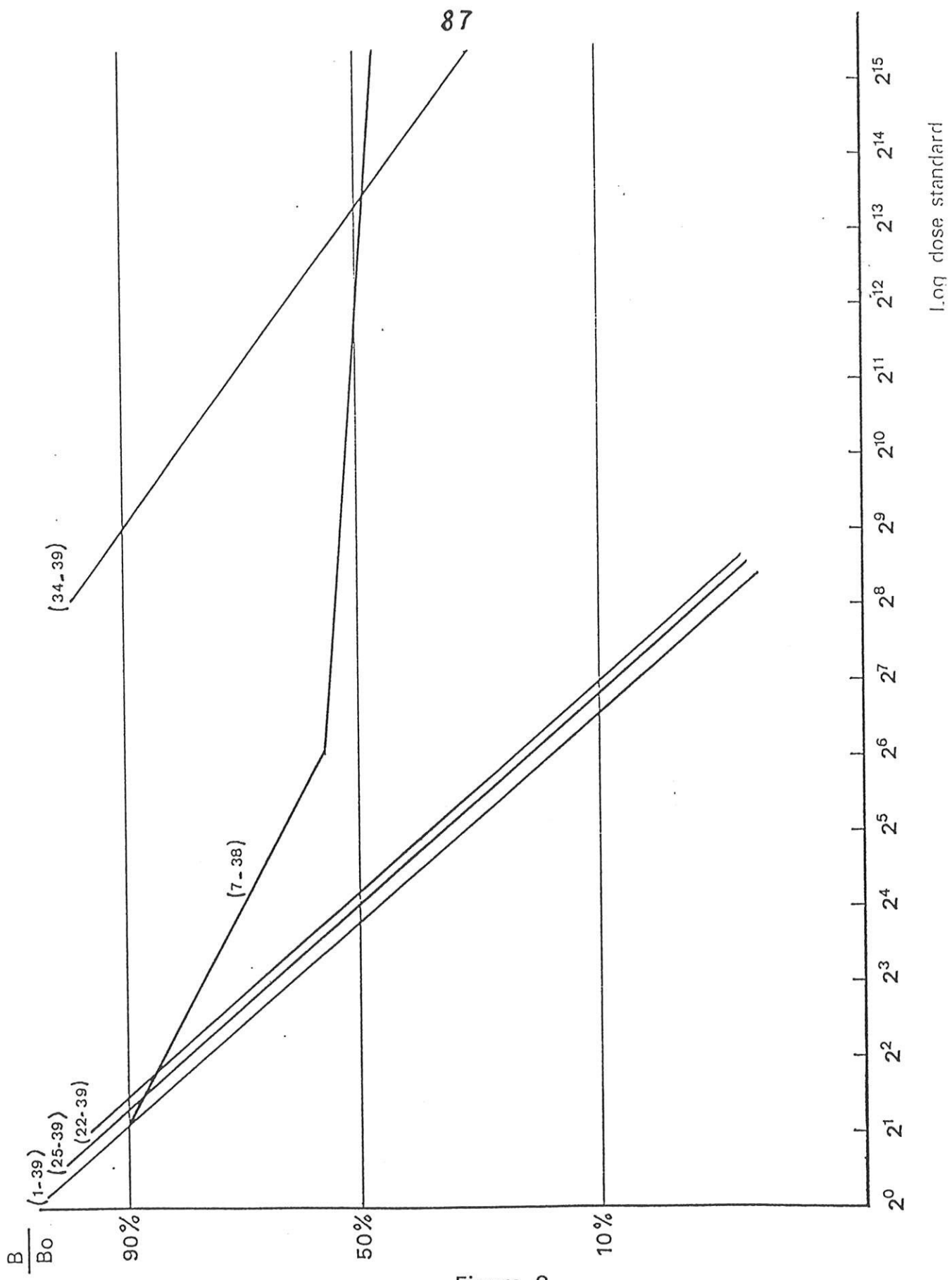


Figure 8

Spécificité de l'anticorps 41-29 vis-à-vis de différents fragments d'ACTH

- ACTH (7-38): 0,35%.

c) Standards et étalons

Le standard employé est de l'ACTH beta(1-39) synthétique (laboratoire CIBA), dilué en HCl 10^{-3} M contenant 2,5 mg d'albumine par ml. La gamme standard utilisée comporte les points suivants: 1-2-4-8-16-32-64-128-256 fmol/100 microl. Malgré plusieurs tentatives il n'a pas été possible d'obtenir de standard CLIP de bonne qualité. Les résultats sont donc exprimés uniquement par rapport au standard ACTH, mais il a été montré plus haut que la réaction croisée entre ACTH et CLIP vis-à-vis de l'anticorps utilisé est de 100%.

Lors de chaque dosage des étalons d'ACTH (A₁; A₂; A₃) sont dosés dans les mêmes conditions que les fractions à étudier, afin d'évaluer la variation inter-assay (pour 14 assays):

	moyenne	écart-type	coef. de variation
A ₁	58,5 pmol/l	0,87	14,9%
A ₂	109 pmol/l	0,73	6,7%
A ₃	292,2 pmol/l	3,89	13,3%

La variation intra-assay est de l'ordre de 4 à 7 %.

d) Echantillons à doser

Les fractions lyophilisées à la sortie de la colonne d'HPLC sont remises en solution par du tampon SD albuminé (1 mg/ml), à raison de 750

microl/fraction pour les plasmas les plus riches en ACTH, de 300 microl/fraction pour les plasmas moins concentrés.

3°) Protocole de dosage

a) Adaptation du RIA au "milieu HPLC"

Malgré les précautions prises pour réaliser une lyophilisation aussi complète que possible, il a été noté une influence du milieu HPLC (notamment l'HFBA) sur le dosage radio-immunologique. Les fractions issues de la chromatographie n'étaient donc pas dosés tout à fait dans les mêmes conditions que les échantillons servant à l'étalonnage du dosage ("non adsorbés", contenant le traceur mais pas l'anticorps; B_0 , contenant le traceur et l'anticorps mais pas de peptide; gamme standard).

Ce problème a pu être résolu en utilisant dans ces dosages un "diluant HPLC", préparé à partir des fractions de début et de fin de gradient, ne comportant pas de peptides reconnus par l'anticorps 41-29. Ces fractions sont recueillies, lyophilisées puis remises en solution de la même façon que les fractions à doser, puis sont poolées pour constituer le diluant HPLC.

La gamme standard est préparée grâce à ce diluant HPLC, qui est également utilisé pour diluer les fractions à doser lorsque cela est nécessaire. Dans les tubes ne contenant pas de peptides à doser ("non adsorbés", B_0), les 100 microl d'échantillon à doser sont remplacés par 100 microl de diluant HPLC.

b) Incubation

Le volume d'incubation est de 300 microl:

- 100 microl de l'échantillon à doser (ou de standard ou d'étalon), remplacés par 100 microl de diluant HPLC dans les tubes "non adsorbés" et B₀.

- 100 microl de traceur ¹²⁵I-CLIP, dilué en tampon SD albuminé (1 mg/ml) pour obtenir une solution à 1,5 fmol/100 microl environ. Des "totaux" sont préparés, contenant uniquement les 100 microl de traceur. Ces totaux servent à l'étalonnage du dosage.

- 100 microl d'anticorps 41-29 dilué au 1/2500^e initial en tampon SD albuminé (1 mg/ml). On y ajoute 3% de sérum de cobaye sain en vue de la séparation. Dans les tubes "non adsorbés" les 100 microl d'anticorps sont remplacés par 100 microl de tampon SD albuminé contenant 3% de sérum de cobaye sain.

Après agitation au Vortex, les tubes incubent à 4° C pendant 6 jours, délai nécessaire au déplacement complet du traceur par l'ACTH.

c) Séparation

Elle est effectuée au sixième jour d'incubation par addition d'un deuxième anticorps. Il s'agit d'un anticorps précipitant de chèvre, anti-IgG de cobaye, conservé à -20° C dans de l'azide de sodium au 1/1000^e (Antibodies incorporated - Davies California - lot n° 7MG33Y du 29/05/80 - degré de purification 4). Il est utilisé dilué au 1/10^e initial en tampon SD non albuminé. On en rajoute 60 microl par tube.

Après agitation au Vortex une deuxième incubation est pratiquée pendant 24 heures à 4° C. Puis les tubes sont centrifugés à 3500 g pendant 30 minutes, ce qui permet, grâce au deuxième anticorps précipitant et à la présence de protéines de cobaye, de recueillir dans le culot les peptides (froids ou marqués) s'étant lié à l'anticorps 41-29, lui-même étant lié au second anticorps. Le surnageant est aspiré, permettant d'éliminer les peptides non liés à l'anticorps.

4°) Expression des résultats

Après aspiration du surnageant le culot est compté dans un compteur gamma pendant 10 minutes.

Tous les échantillons sont dosés en double, sauf les "non adsorbés" et les B_0 qui sont faits en 4 exemplaires, et les "totaux" en 5 exemplaires qui sont répartis tout au long du comptage pour tenir compte de la perte spontanée d'activité spécifique avec le temps, le comptage de tous les tubes demande en effet généralement plusieurs dizaines d'heures.

Les résultats sont exprimés (figure 9):

- en représentation "Scatchard" exprimant B/F en fonction de B .

- en représentation "Logit-Log" donnant le rapport $B/B_0 \times 100$ pour chaque point de la gamme standard, les échantillons dosés étant lus sur cette courbe linéaire entre 90% et 10%.

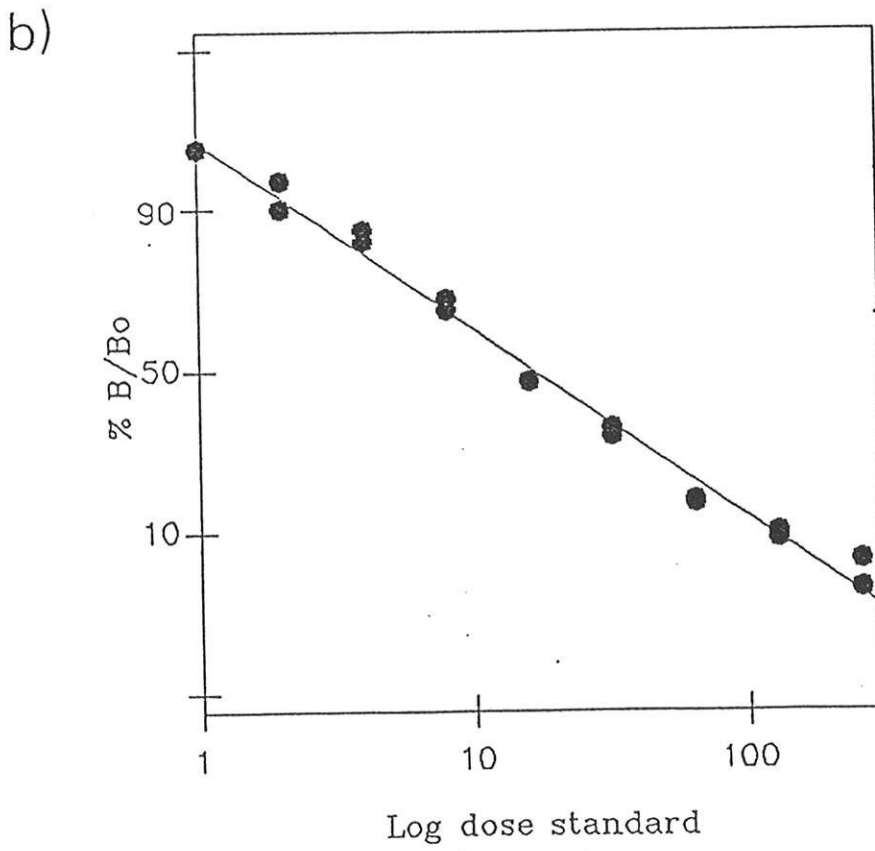
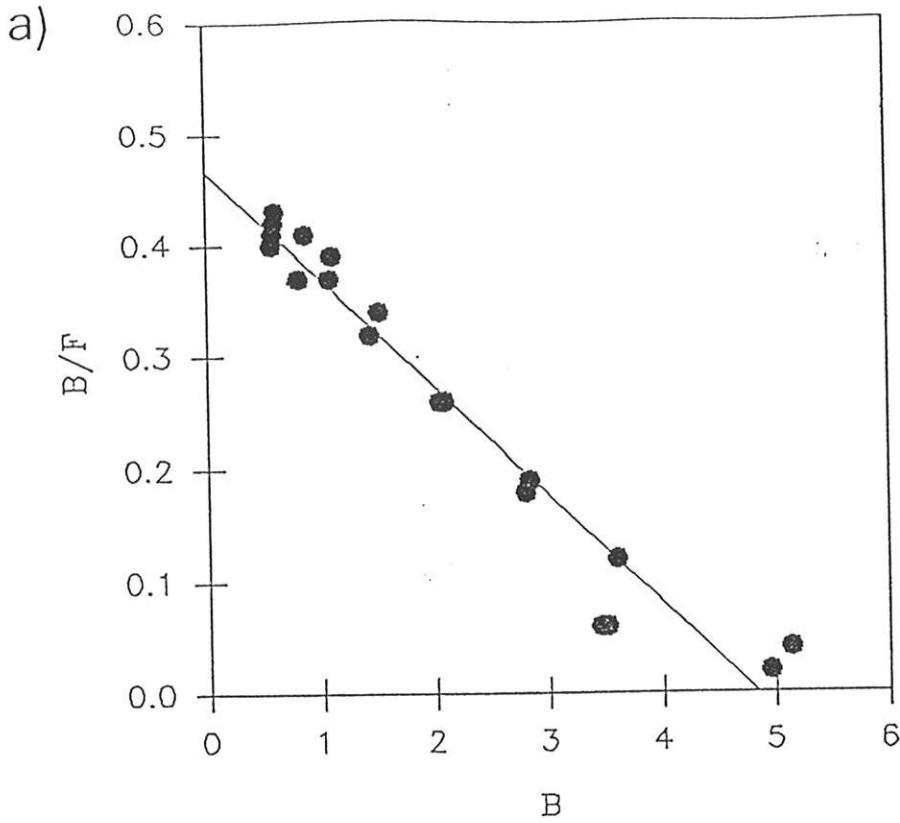


Figure 9

Expression des résultats du dosage

a) courbe Scatchard

b) courbe Logit/Log

II RESULTATS

A RENDEMENTS

Autant que possible les rendements de la manipulation ont été évalués à chacune de ses étapes, afin d'étudier l'efficacité de la méthode, de sélectionner les plasmas pouvant être étudiés, et de mettre en évidence les étapes où ce rendement doit être amélioré.

1°) Extraction sur SEP-PAK

Le rendement de cette étape n'a pas pu être étudié directement. En effet, comme cela a déjà été précisé, le dosage radio-immunologique employé n'est pas utilisable dans les solvants utilisés pour cette extraction. Il ne nous a donc pas été possible de comparer les taux de peptides avant et après extraction.

Nous n'avons pu réaliser qu'une estimation approximative de ce rendement grâce aux peptides marqués rajoutés à l'échantillon avant extraction, en comparant la radio-activité présente avant et après extraction.

Ce rendement estimé est en moyenne de 70% pour l'ACTH (64 à 82%) et de 85% pour le CLIP (79 à 92%).

2°) Lyophilisation

Le rendement de cette étape n'a pas pu être estimé. En effet, pour les raisons précédemment exposées le dosage radio-immunologique n'a pas pu être utilisé. Nous ne pouvions pas ici faire appel aux marqueurs radio-actifs car la perte spontanée de radio-activité durant les 48 heures de lyophilisation rendait impossible l'évaluation de la perte liée à la lyophilisation.

3°) RP-HPLC

Le rendement de cette étape a pu être estimé directement. Pour cela des échantillons de plasma ont subi une extraction sur SEP-PAK puis une lyophilisation. Au moment de l'HPLC ces échantillons ont été remis en solution par 500 microl de solvant A puis centrifugés. Pour chaque échantillon 200 microl du surnageant ont été injectés dans la colonne, alors que 200 microl étaient conservés, lyophilisés avec les fractions recueillies après HPLC, puis remis en solution et dosés dans les mêmes conditions.

Le rendement de cette étape a ainsi pu être évalué à 65% pour le CLIP et l'ACTH, mais semble très dépendant de la qualité de la colonne, et notamment diminue avec une colonne usagée.

4°) Rendement global et seuil de détection

Globalement on peut considérer que le rendement de l'étape extraction - séparation est de l'ordre de 55% pour le CLIP et de 45% pour l'ACTH.

Compte tenu du seuil de détection du dosage radio-immunologique employé, on peut estimer que cette méthode peut être appliquée à des plasmas dont la concentration de départ en ACTH est au moins égale à 100 pmol/l, les quantités de peptides contenues dans les fractions après séparation est alors suffisante pour que le profil du plasma puisse être déterminé.

B PROFIL DES PLASMAS ETUDIES

Pour chaque plasma l'immunoréactivité 41-29 totale est répartie dans la cinquantaine de fractions recueillies après chromatographie. Lorsque l'on reporte les résultats obtenus sur un graphique comportant en abscisse le numéro des fractions et en ordonnée la quantité de peptides retrouvée dans chaque fraction en fmoles, on obtient une courbe comportant un certain nombre de pics, ces pics correspondant à un peptide individualisé par la chromatographie et reconnu par l'anticorps 41-29. L'observation de ces courbes permet de remarquer certaines différences entre les plasmas de patients présentant une hypersécrétion d'origine hypophysaire et ceux présentant une tumeur ectopique.

La signification de ces pics et des différences constatées sera discutée plus loin.

1°) Tumeurs hypophysaires

Des échantillons plasmatiques provenant de sept patients ont été étudiés. Globalement nous

pouvons dégager certaines caractéristiques communes à ces sept patients:

- la majeure partie (de 70 à 80% selon les plasmas) de l'immunoréactivité détectée par l'anticorps 41-29 se trouve concentrée dans les fractions 73 à 81. Dans la majeure partie des cas cette immunoréactivité est répartie en deux pics principaux, plus ou moins bien séparés selon les cas, et d'importance relative variable. L'un de ces pics est généralement situé 1 à 2 fractions avant la fraction d'élution de l'ACTH*, l'autre se retrouve 2 à 3 tubes plus tôt. On remarque souvent, quoique de façon inconstante, l'existence d'un épaulement initial et/ou d'un épaulement final.

- l'immunoréactivité détectée dans les premières fractions (situées avant la fraction d'élution du CLIP*) est extrêmement faible (moins de 10% de l'immunoréactivité totale). On peut cependant dans quelques cas de plasmas très riches en peptides individualiser quelques pics mineurs situés dans cette zone. Ces pics, quantitativement très faibles, sont cependant suffisamment constants dans leur localisation pour être remarqués. Ils sont retrouvés dans les fractions 50; 53; 56; 58; 60.

- la zone contenant les fractions 63 à 73, intermédiaire entre les fractions d'élution du CLIP* et de l'ACTH*, est dans presque tous les cas le siège d'un pic, représentant près de 10% de l'immunoréactivité totale, correspondant généralement à la fraction 71.

Deux exemples du profil d'élution obtenu à partir de ces plasmas sont représentés sur la figure 10.

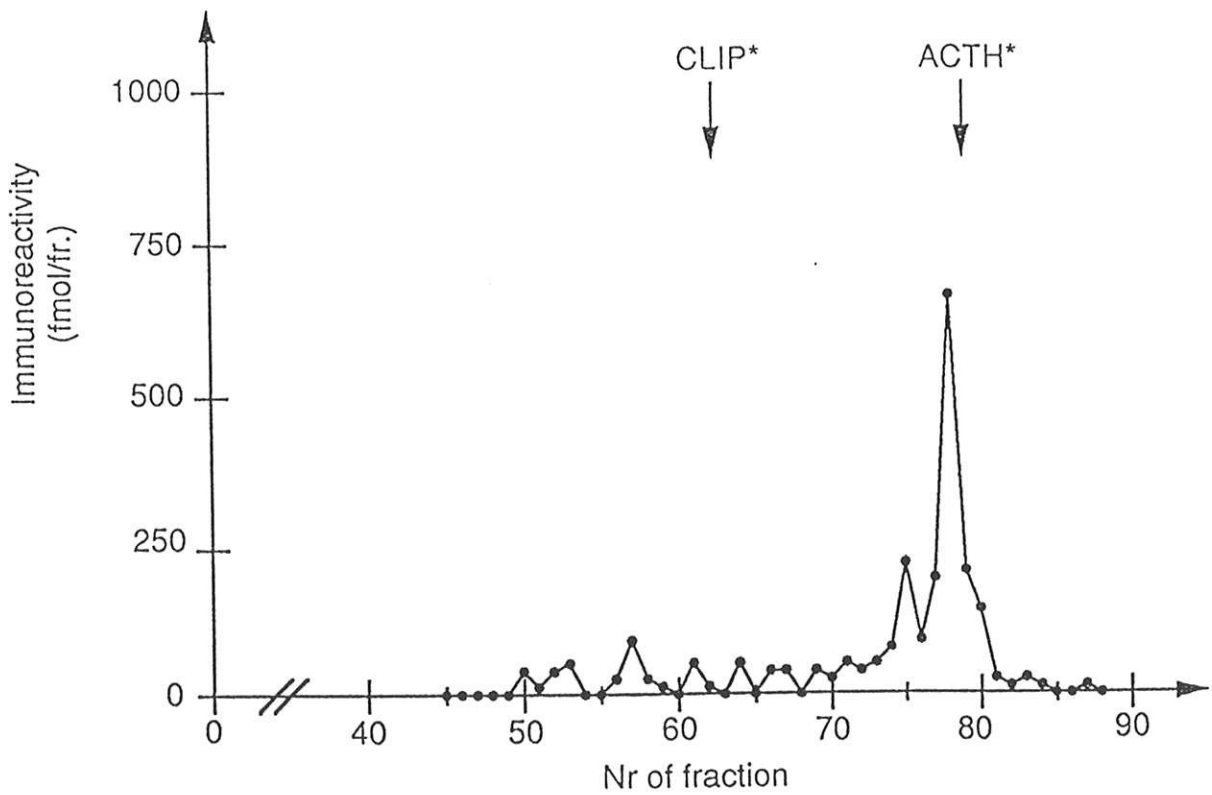
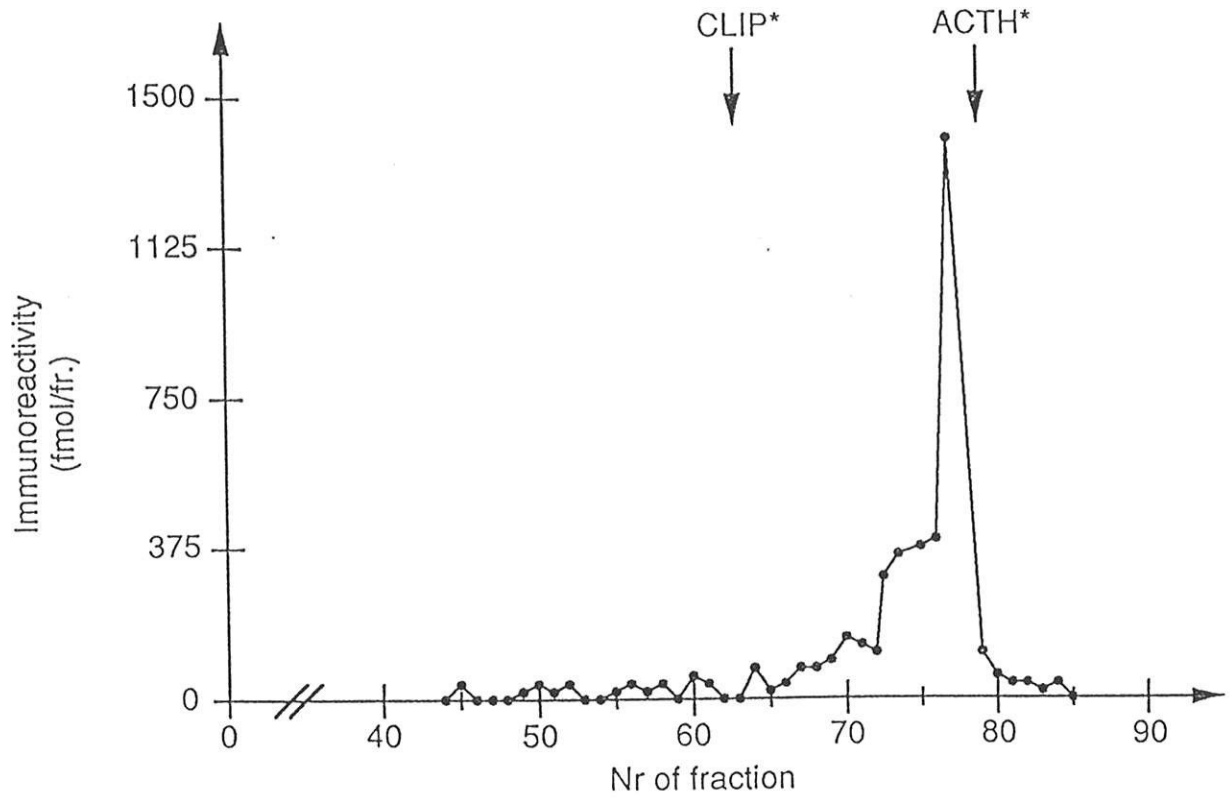


Figure 10

Plasmas de patients présentant une hypersécrétion d'ACTH d'origine hypophysaire (exemples)

2°) Tumeurs ectopiques

Des échantillons plasmatiques provenant de quatre patients ont été étudiés. Ici aussi des caractéristiques communes aux quatre plasmas peuvent être dégagées, ainsi que des différences par rapport aux plasmas précédemment étudiés:

- l'immunoréactivité retrouvée dans les fractions 73 à 89 n'est plus aussi prédominante, puisqu'elle ne représente plus que 40 à 45% de l'immunoréactivité totale. On retrouve cependant ici les deux mêmes pics, quantitativement moins importants, mais identiques dans leur situation et leur répartition. On note également le plus souvent un épaulement initial et/ou un épaulement final.

- les fractions situées avant la fraction d'élution du CLIP* contiennent ici 45 à 50% de l'immunoréactivité totale. Plusieurs pics relativement abondants sont ici nettement individualisables, généralement situés dans les fractions 50; 53; 56; 58; 60.

- la zone intermédiaire est le siège du même pic situé au niveau de la fraction 71, représentant de 5 à 10% de l'immunoréactivité totale.

Deux exemples du profil d'élution obtenu à partir de ces plasmas sont rapportés sur la figure 11.

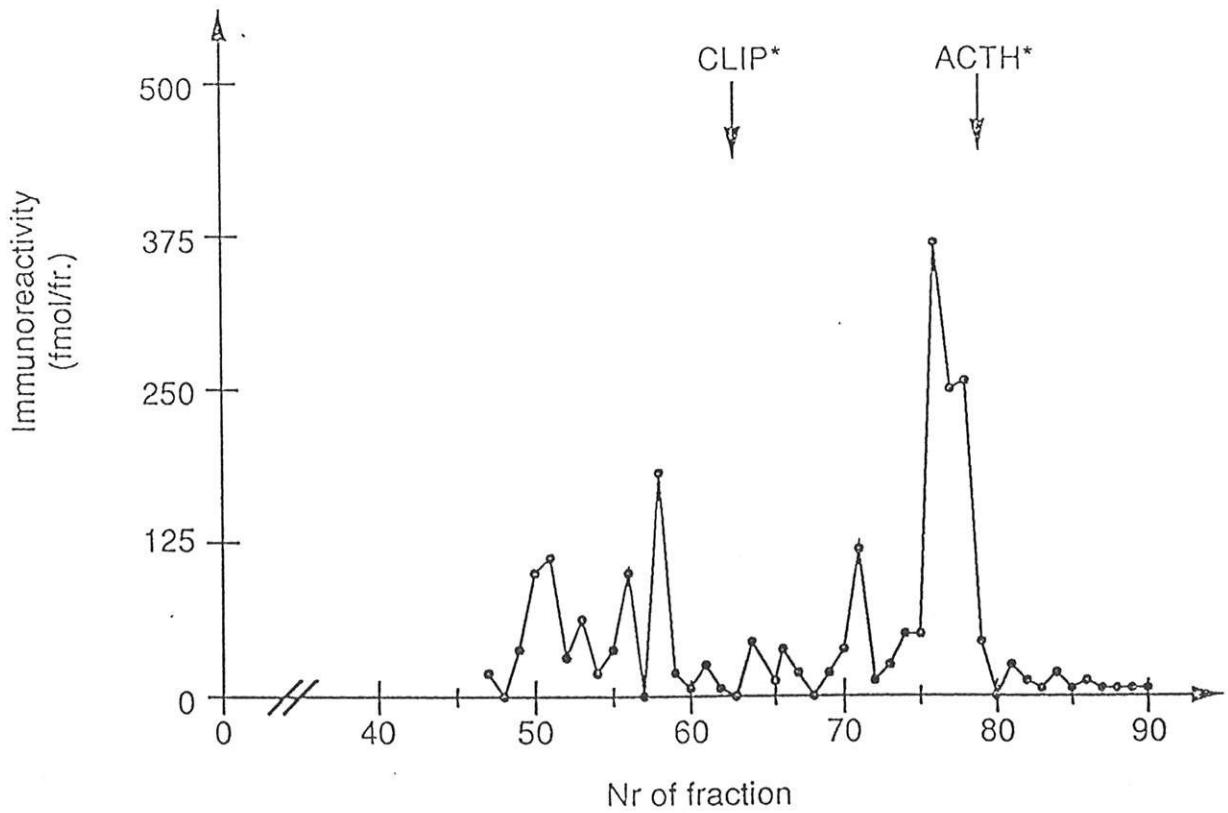
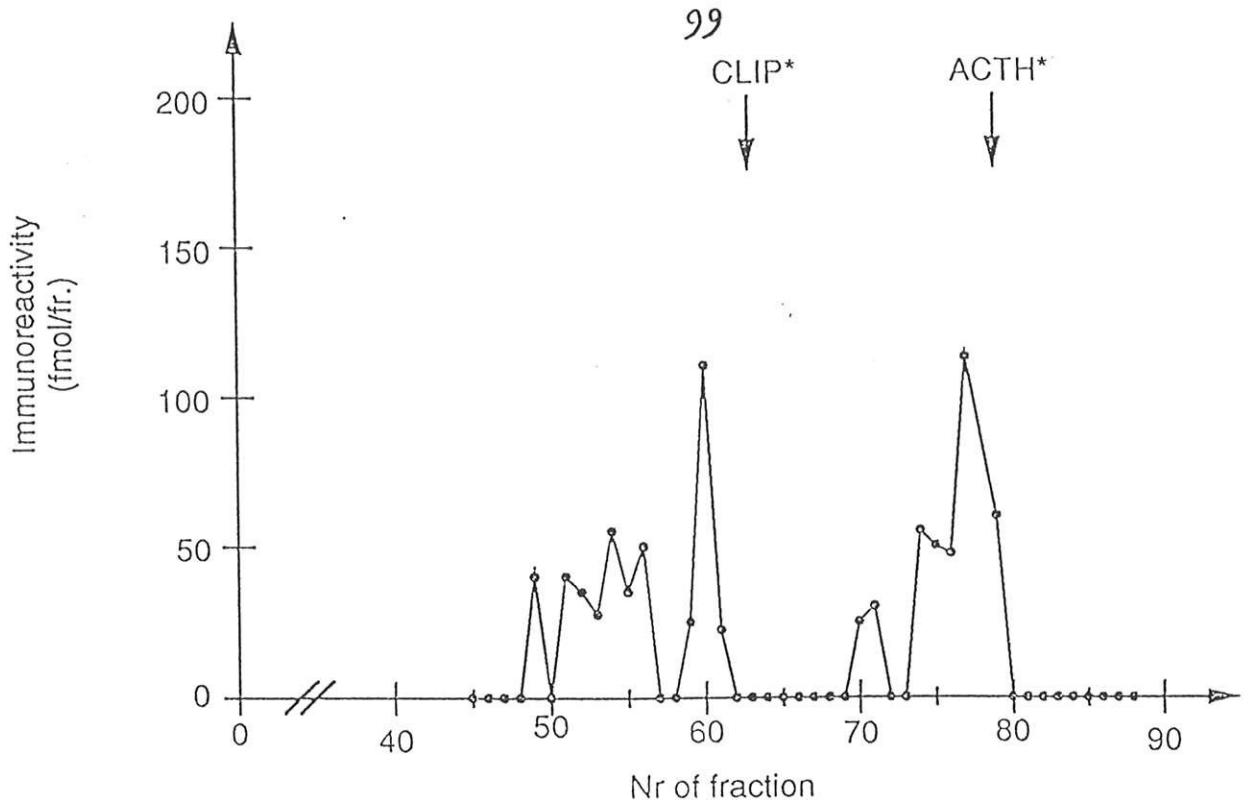


Figure 11

Plasmas de patients présentant une hypersécrétion d'ACTH d'origine extra-hypophysaire (exemples)

C EFFETS DU CHAUFFAGE

Afin de s'assurer que le chauffage initial des plasmas n'altère pas les peptides étudiés et ne modifie pas leur répartition nous avons traité simultanément deux échantillons d'un même plasma (prélevé chez un patient présentant un adénome hypophysaire), l'un ayant été préalablement chauffé et centrifugé dans les conditions définies plus haut, et l'autre n'ayant pas subi ces deux opérations. Les deux échantillons ont ensuite parallèlement suivi les différentes étapes, de l'extraction au dosage.

Le profil d'élution de ces deux échantillons est rapporté sur la figure 12. On constate que les résultats sont parfaitement superposables pour les deux échantillons, confirmant donc que le chauffage, qui reste utile pour éliminer les éventuelles enzymes de dégradation et cryoprotéines, n'altère pas les peptides étudiés.

Cette expérience permet en outre d'apporter des arguments en faveur de la fiabilité de la méthode, et notamment de sa bonne "répétabilité", puisque les résultats obtenus à partir de deux échantillons identiques traités séparément sont superposables.

D EFFETS DES STIMULATIONS

Afin d'étudier l'effet des stimulations sur la sécrétion d'ACTH, nous avons traité simultanément

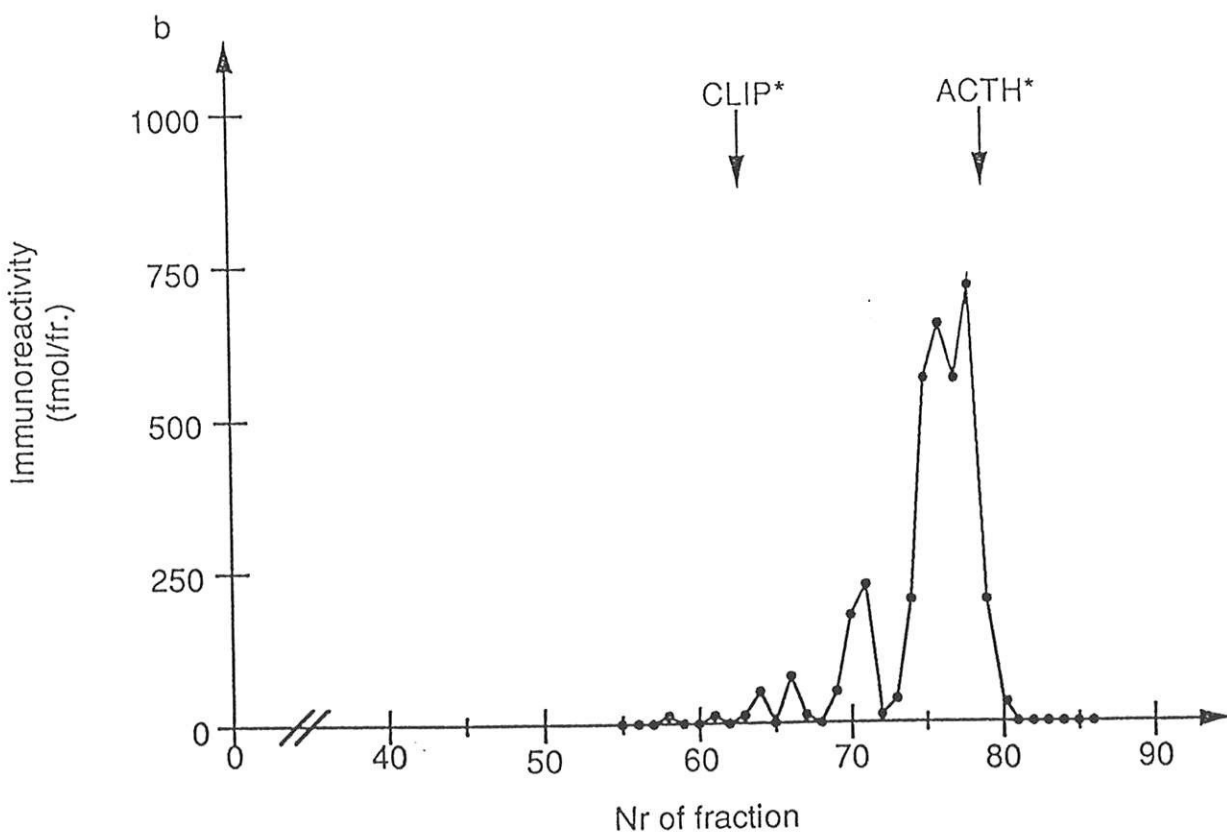
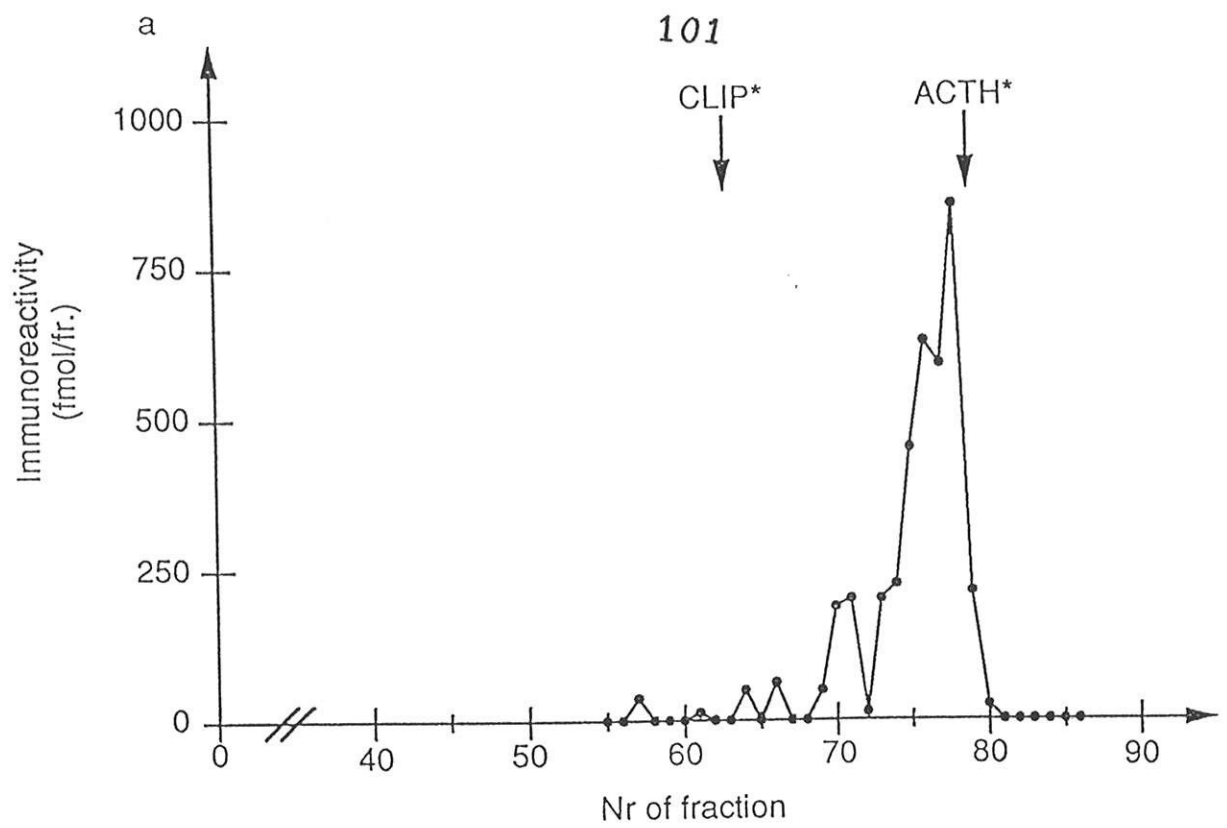


Figure 12

Effets du chauffage et de la centrifugation
 a) échantillon "brut"
 b) échantillon chauffé et centrifugé

deux échantillons prélevés chez un même patient, l'un à l'état basal et l'autre en cours de stimulation.

Deux types de stimulations ont été testées, la CRH seule d'une part et le test CRH-LVP d'autre part. Les résultats de cette étude sont représentés sur la figure 13.

On peut s'apercevoir que dans les deux cas l'effet de la stimulation sur la sécrétion hypophysaire est uniquement quantitatif. La hauteur des pics retrouvés aux alentours de la fraction d'élution de l'ACTH* est augmentée, cette élévation étant tout-à-fait proportionnelle à celle relevée pour l'ACTH dans le plasma avant séparation. Par contre ces pics ne sont pas déplacés, et on ne note pas d'apparition de nouveaux pics sous l'influence de la stimulation, confirmant l'absence de modification qualitative de la production de peptides.

Dans le cas de la stimulation par la CRH seule on peut par ailleurs noter que le pic intermédiaire situé à la fraction 71 paraît être stimulé dans les mêmes proportions.

Cette expérience n'a été réalisée qu'en cas de tumeur hypophysaire, il n'est donc pas possible pour nous de dire si l'absence de stimulation généralement constatée dans le plasma en cas de tumeur ectopique correspond effectivement à une stabilité des taux de peptides, ou si des peptides non détectés par les dosages usuels, tel le CLIP, peuvent néanmoins voir leur production augmenter en cas de stimulation.

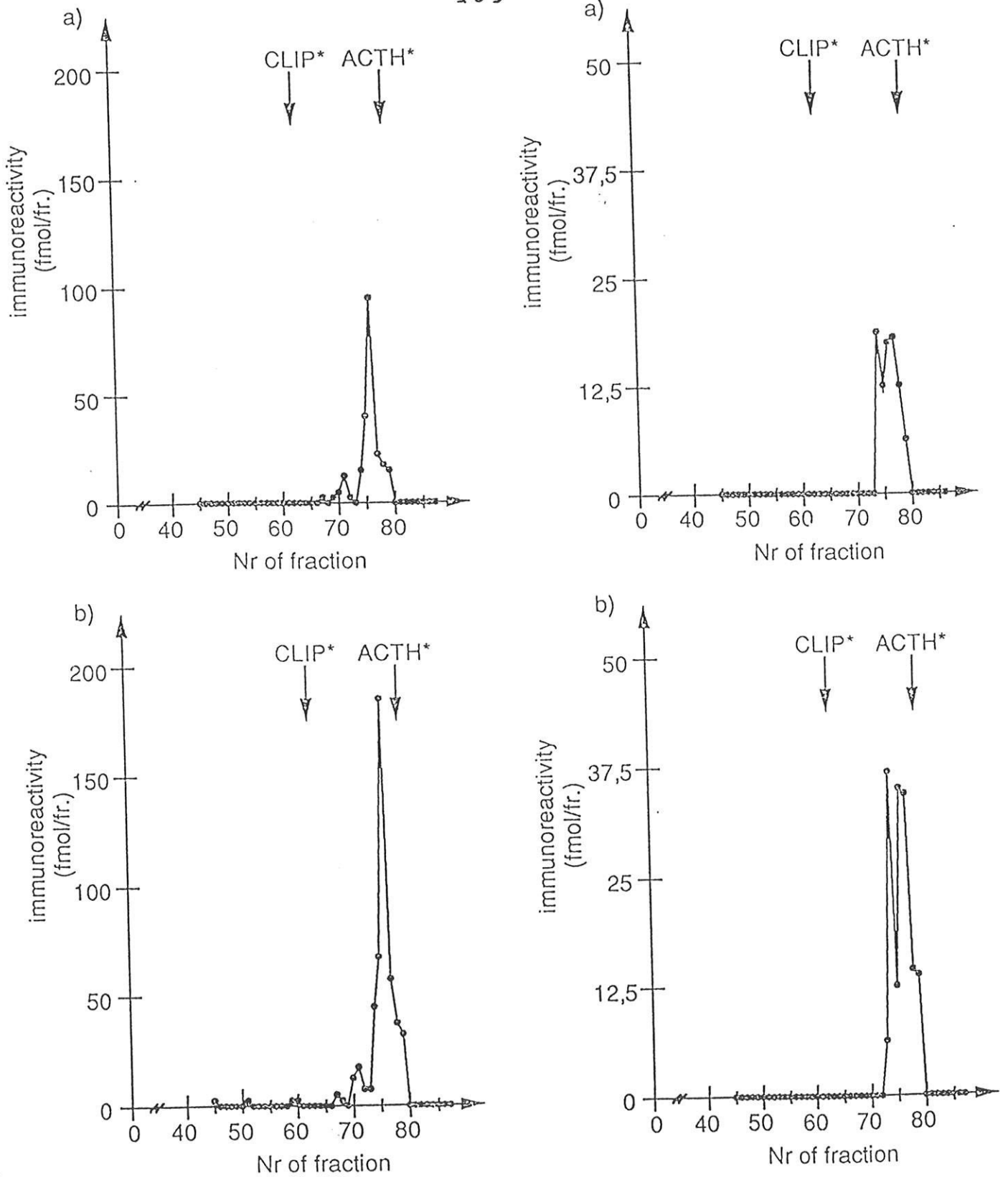


Figure 13

Effet des stimulations par la CRH (schémas de gauche)
et par la CRH-LVP (schémas de droite)

- a) avant stimulation
b) après stimulation

Enfin ces expériences, comme les précédentes, attestent de la fiabilité de la méthode, puisque dans les deux cas les deux échantillons prélevés chez un même malade et traités séparément ont un profil d'élution tout-à-fait similaire.

E DETECTION ET CALIBRATION

Afin d'étalonner la colonne en évitant au maximum les étapes intermédiaires, des études ont été réalisées en injectant dans la colonne, dans les conditions définies plus haut, de grosses quantités (de l'ordre du microg) de différents fragments d'ACTH synthétique. Cette étude permettait d'éviter les étapes de séparation et de lyophilisation, ainsi que le dosage radio-immunologique puisque ces énormes quantités de peptides étaient détectées par le spectromètre. Chaque peptide a été étudié isolément, les résultats, regroupés sur le même chromatogramme, sont représentés sur la figure 14.

On constate ainsi que, dans ces conditions:

- l'ACTH (34-39) élue à la fraction 53.
- l'ACTH (25-39) élue à la fraction 56.
- l'ACTH (22-39) élue à la fraction 58.
- le CLIP (18-39) élue aux fractions 60-61.
- l'ACTH (7-38) élue aux fractions 71-72.
- l'ACTH (1-39) élue à la fraction 79.

F COMPARAISON "PERIPHERIE-VEINE EFFERENTE"

Afin d'étudier plus précisément les peptides sécrétés par les tumeurs ectopiques, nous avons étudié simultanément deux échantillons plasmatiques prélevés chez un même patient, l'un dans une veine périphérique et l'autre dans la veine efférente de la tumeur (une tumeur carcinoïde bronchique) pendant l'intervention chirurgicale. Les deux échantillons ont suivi parallèlement toutes les étapes, de l'extraction au dosage. Les résultats de cette étude sont représentés sur la figure 15.

Dans un premier temps on peut constater que le profil de l'immunoréactivité, tant au niveau du prélèvement périphérique que de la veine efférente, correspond bien à celui mis en évidence pour les tumeurs ectopiques.

On remarque ensuite que les pics situés au-delà de la fraction 65 sont à peu près équivalents, tant en situation qu'en taille, en périphérie et dans la veine efférente. Ces pics ne correspondent donc peut-être pas à des peptides sécrétés par la tumeur.

Par contre, les pics retrouvés dans les fractions 50 à 65 en périphérie, sont également retrouvés dans la veine efférente. Leur situation est similaire, laissant penser que ces pics correspondent bien aux mêmes peptides. Leur hauteur est par contre nettement plus importante dans la veine efférente, alors que la valeur relative des uns par rapport aux autres reste inchangée. On peut donc penser que ces pics correspondent effectivement à des peptides

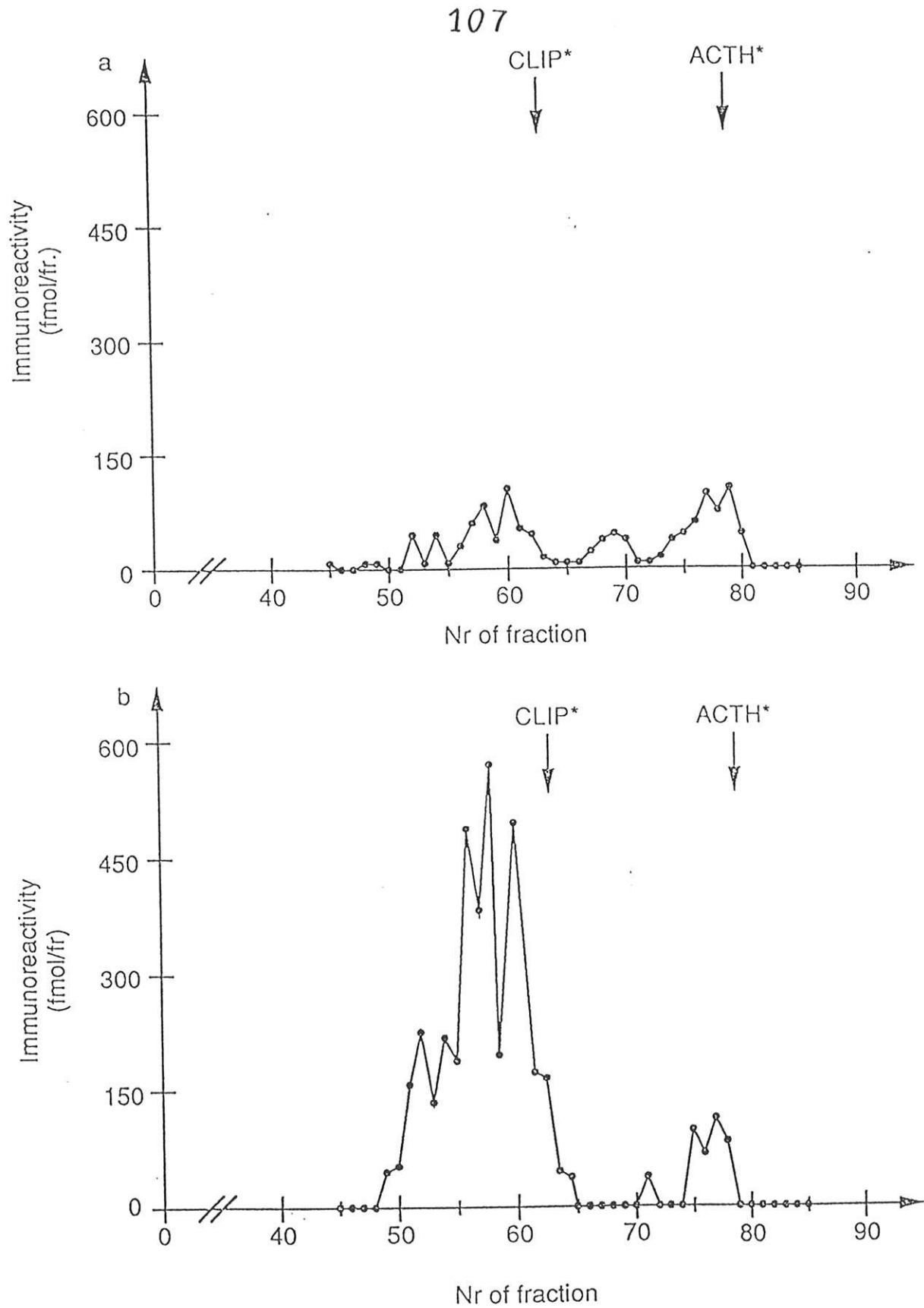


Figure 15

Profil d'éluion du plasma d'un patient présentant une
hypersécrétion d'origine ectopique d'ACTH
a) plasma prélevé dans une veine périphérique
b) plasma prélevé dans la veine efférente de la tumeur

sécrétés par la tumeur, se trouvant très concentrés dans la veine efférente et beaucoup plus dilués en périphérie.

III DISCUSSION

A JUSTIFICATION DES TECHNIQUES EMPLOYEES

1°) Méthode de séparation

Dans la littérature diverses méthodes de séparation ont été appliquées à l'étude de la POMC et des peptides dérivés, tant chez l'homme que chez l'animal, chez le sujet sain ou présentant un syndrome de Cushing, dans le plasma ou sur extraits tissulaires. Ainsi ont été utilisées l'électrophorèse (89,90); la chromatographie sur colonne de Séphadex G 50 (84,90, 133,206), sur colonne de Séphadex G 75 (207) ou sur Sépharose (95); la chromatographie d'affinité sur Concavaline A - Sépharose (207,208); la chromatographie par échange d'ions (84).

La RP-HPLC paraît néanmoins actuellement la méthode la plus couramment employée (181,182,190,198,209,210,211,212), permettant une séparation fine et précise des plasmas étudiés. En utilisant les solvants et les gradients appropriés, cette technique est capable de distinguer, en fonction de leur polarité, deux peptides différant seulement d'un acide aminé, ou deux peptides identiques existant sous deux formes chimiques différentes (phosphorylé et non phosphorylé par exemple). Elle présente cependant

l'inconvénient d'être relativement peu sensible, il est de plus indispensable d'y adjoindre une étape préalable d'extraction, et elle doit être suivie d'une étape de reconnaissance des peptides séparés.

De plus elle nécessite, pour être reproductible, une grande précision dans la préparation des solvants et dans leur dégazage. Ce problème du dégazage a longtemps été pour nous un frein au développement de cette technique, un dégazage incomplet entraînait une gêne à la séparation avec nombreux artefacts, un dégazage trop prolongé entraînait une altération des solvants responsable notamment d'une très mauvaise reproductibilité. Ce problème a pu être résolu par la mise au point d'une méthode de dégazage par action combinée du vide et des ultra-sons, qui a été exposée plus haut, permettant un dégazage complet en quelques secondes, de bonne qualité sans altération des solvants.

Le choix des deux phases s'est fait en fonction des données de la littérature (198,201, 203,210) et de l'expérience du service. Pour ce qui est de la phase stationnaire les chaînes hydrocarbonées en C 8 ont été préférées à celles en C 18 car elles semblent offrir un meilleur rendement pour une efficacité de séparation comparable. En ce qui concerne la phase mobile, l'HFBA a été choisie de préférence à l'acide trifluoro-acétique (TFA) car il semble assurer une meilleure séparation des peptides étudiés, au prix cependant d'un rendement apparemment inférieur. Pour la même raison, mais avec le même inconvénient, l'acétonitrile a été préféré au méthanol. De plus, les variations de viscosité en fonction de la teneur en

solvant organique sont moins importantes avec l'acétonitrile qu'avec le méthanol, et le mélange se fait avec une contraction de volume moindre, ce qui limite l'apparition de "pics fantomes" artefactuels en spectrographie (201).

Le choix du gradient s'est fait par tâtonnements, plusieurs formules ont successivement été essayées avant de se fixer sur celle exposée plus haut. Nous étions tenus par la double nécessité de réaliser un gradient à la fois suffisamment progressif pour que les peptides, et donc que les pics obtenus, soient nettement séparés, et suffisamment rapide pour que ces pics soient le plus fins possibles et répartis sur 1 à 2 fractions. Un compromis entre ces deux impératifs contradictoires a donc dû être trouvé.

2°) Méthodes de reconnaissance

a) Etalonnage de l'HPLC et repérage des fractions

Ce point a déjà été débattu plus haut. Comme cela a déjà été précisé le spectromètre utilisé ne permet pas de détecter les peptides aux quantités présentes dans les plasmas étudiés. Afin d'étalonner la méthode et de repérer sans intermédiaire les fractions d'élution de certains peptides, des chromatographies ont été réalisées avec plusieurs microg de peptides, permettant leur détection par le spectromètre.

Une détection sommaire des fractions avant le dosage radio-immunologique a pu être réalisée, ainsi que cela a déjà été exposé, par des traceurs

radio-actifs (CLIP* et ACTH*) et par des marqueurs colorés (bleu de bromophénol et rouge de méthyle)

b) Dosage radio-immunologique

Deux impératifs ont guidé le choix du dosage radio-immunologique. Il nous fallait en effet d'une part un anticorps capable de détecter à la fois l'ACTH et le CLIP, et d'autre part un dosage sensible avec un seuil de détection le plus bas possible, de façon à compenser le rendement relativement limité de la séparation, et pour pouvoir appliquer cette méthode à l'étude du plus large éventail possible de plasmas.

Le dosage radio-immunologique par l'anticorps 41-29 répond bien à ces deux impératifs. Cet anticorps est en effet dirigé contre la partie C-terminale de la molécule d'ACTH, plus précisément son épitope correspond aux acides aminés 25-26-27-28-29-30-31-32-33 et 39 de cette molécule. Il reconnaît donc à la fois le CLIP et l'ACTH, il a été montré par ailleurs que le taux de réactions croisées entre les deux molécules est de 100%. Il reconnaît également d'autres fragments C-terminaux de l'ACTH. Son seuil de détection est par ailleurs bas, de l'ordre de 1 à 2 pmol/l, nous avons vu que cette technique pouvait être appliquée à des plasmas contenant 100 pmol/l d'ACTH et plus.

En outre il présente l'avantage d'être utilisable en milieu non plasmatique, ce qui est indispensable ici du fait de l'HPLC. Sous réserves de quelques aménagements exposés plus haut (lyophilisation, utilisation du "diluant HPLC") il est

utilisable sans difficultés malgré les solvants employés au cours de l'HPLC.

B PROFIL DES PLASMAS ETUDIÉS

L'étude du plasma de 11 patients (7 présentant une tumeur corticotrope et 4 une hypersécrétion d'ACTH d'origine ectopique) a permis de dégager:

- d'une part des caractéristiques communes à tous les plasmas d'une étiologie donnée.
- d'autre part des caractéristiques permettant de différencier les plasmas des patients présentant une tumeur hypophysaire de ceux des patients présentant une tumeur ectopique.

1°) Caractéristiques générales des plasmas

Pour les 11 plasmas étudiés, une part importante de l'immunoréactivité se trouve concentrée dans les fractions 73 à 80, c'est-à-dire aux alentours de la fraction d'élution de l'ACTH* (fraction 79). La distribution de cette immunoréactivité est toujours la même, à savoir généralement 2 pics, plus ou moins bien nets, de valeur relative variable. Il existe souvent un épaulement initial et/ou un épaulement final.

Par contre, si le profil général de l'immunoréactivité dans cette région est identique quelle que soit l'étiologie, on remarque que, en cas de tumeur hypophysaire, l'immunoréactivité de cette zone représente la quasi-totalité de l'immunoréactivité

totale, alors que dans le cas des tumeurs ectopiques elle n'en représente qu'à peine la moitié.

De façon assez constante et quelle que soit l'étiologie on remarque souvent un pic intermédiaire, généralement dans les fractions 70 ou 71, à mi-chemin entre les fractions d'élution du CLIP* et de l'ACTH*.

En fait, la principale différence permettant de distinguer les plasmas prélevés chez des patients avec tumeur hypophysaire de ceux avec tumeur ectopique se situe au niveau des fractions 49 à 62, c'est-à-dire aux alentours de la fraction d'élution du CLIP* (fraction 63). En effet, en cas de tumeur hypophysaire, l'immunoréactivité détectée dans cette zone est très faible, voire nulle. Tout au plus peut-on dans certains cas retrouver quelques pics mineurs, notamment aux fractions 50-53-56-58-60. Par contre, en cas de sécrétion ectopique près de la moitié de l'immunoréactivité totale se trouve concentrée dans ces fractions, avec ici aussi plusieurs pics le plus souvent situés dans les fractions 50-53-56-58-60.

2°) Signification des pics

Ces pics correspondent à une immunoréactivité détectée par l'anticorps 41-29, on peut donc penser qu'il s'agit effectivement de peptides dérivés de l'ACTH, comportant au moins la partie C-terminale formée des acides aminés 25 à 39.

La première question à se poser à propos de ces peptides consiste à se demander s'ils sont

effectivement sécrétés par la tumeur, ou si certains d'entre eux sont le fruit d'une dégradation ultérieure de peptides plus gros, sous l'effet des solvants utilisés pour l'HPLC, ou de certaines manipulations comme le chauffage ou la centrifugation par exemple. Plusieurs éléments permettent de penser que ces peptides sont effectivement sécrétés par la tumeur.

En effet il a déjà été montré que le chauffage et la centrifugation ne dégradent pas les peptides et ne modifient ni le nombre ni la position des pics mis en évidence. Par ailleurs l'hypothèse d'une dégradation par les solvants utilisés en HPLC ne peut pas être rejetée a priori. Cependant on remarque que seuls les plasmas issus de patients présentant une sécrétion ectopique d'ACTH fournissent des pics importants en première partie de chromatogramme. Si ces pics correspondent effectivement à des peptides produits par dégradation de l'ACTH sous l'action des solvants d'HPLC, on ne comprend pas alors pourquoi cette dégradation ne se produirait pas également en cas de sécrétion d'origine hypophysaire. Pour la même raison on peut penser que ces peptides ne sont pas le fruit d'une dégradation de peptides plus gros dans le plasma.

L'expérience rapportée plus haut, comparant, chez un même patient présentant une tumeur carcinoïde du poumon responsable d'un syndrome de Cushing, le plasma prélevé dans une veine périphérique et celui prélevé dans la veine efférente de la tumeur, apporte des arguments supplémentaires pour penser que les peptides séparés sont effectivement sécrétés par la tumeur. On a ainsi pu montrer que tous

les pics isolés dans le plasma "périphérique" sont également retrouvés dans la veine efférente de la tumeur, aux mêmes endroits et répartis dans les mêmes proportions, mais en plus forte concentration compte-tenu du fait que le sang issu de la tumeur n'a pas encore été mêlé à celui d'autres territoires. Les peptides isolés paraissent donc effectivement être sécrétés par la tumeur elle-même. Il est par ailleurs intéressant de constater à nouveau que, si les peptides éluant avec le CLIP* sont effectivement plus concentrés dans la veine efférente qu'en périphérie, les peptides éluant avec l'ACTH* sont en concentration très proche dans la veine efférente et en périphérie, laissant penser que ceux-ci ne sont pas sécrétés par la tumeur mais ont une autre origine, hypophysaire par exemple.

3°) Nature des peptides isolés

Après avoir conclu que les pics mis en évidence correspondent effectivement à des peptides sécrétés par la tumeur, il reste à déterminer la nature de ces peptides. Peu d'éléments permettent de le faire de façon formelle, mais certaines données autorisent à émettre quelques hypothèses et à discuter la signification précise de ces pics.

La première de ces données est l'expérience menée en injectant dans la colonne de fortes quantités de peptides synthétiques repérables par densité optique. Il est en effet très frappant de constater la coïncidence entre la situation des pics retrouvés dans les plasmas et les fractions d'élution de ces peptides synthétiques:

- fraction 53 >> ACTH (34-39)

- fraction 56 >> ACTH (25-39)
- fraction 58 >> ACTH (22-39)
- fractions 60-61 >> ACTH (18-39) (=CLIP)
- fractions 71-72 >> ACTH (7-38)
- fraction 79 >> ACTH (1-39)

Cependant cette coïncidence doit être remise en question pour plusieurs raisons. Tout d'abord, nous avons vu que certains de ces peptides étudiés ne sont pas (ou très peu) reconnus par l'anticorps 41-29. C'est le cas notamment de l'ACTH (34-39), où manquent les acides aminés 25 à 33, et de l'ACTH (7-38), où manque l'acide aminé 39. Il est donc théoriquement impossible que certains des pics isolés dans le plasma puissent correspondre à ces peptides.

De plus, plusieurs de ces fragments ne correspondent pas à des peptides connus dans le plasma humain, les sites de clivage nécessaires à leur formation n'ayant jamais été décrits chez l'homme. C'est le cas de l'ACTH (34-39), de l'ACTH (25-39), de l'ACTH (22-39) et de l'ACTH (7-38). On ne peut donc se contenter sans arrière-pensée de cette explication aux pics isolés.

On peut par ailleurs émettre l'hypothèse, selon certaines données de la littérature (207,210, 211), que certains des pics isolés correspondent non pas à des fragments d'ACTH mais à des peptides de plus haut poids moléculaire, précurseurs de l'ACTH. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait pouvoir utiliser d'autres techniques de séparation, en fonction du poids par exemple, et employer une batterie d'anticorps afin de se faire une idée de la nature de ces peptides.

Quoiqu'il en soit, on peut raisonnablement penser que l'immunoréactivité détectée dans les fractions voisines de la fraction d'élution de l'ACTH* correspond effectivement à de l'ACTH (1-39) intacte, pouvant exister sous plusieurs formes. Cette hypothèse serait tout à fait cohérente avec le fait que, dans les tumeurs hypophysaires, la quasi-totalité de l'immunoréactivité se retrouve dans ces fractions, alors que d'autres peptides existent en cas de tumeur ectopique.

Il a été montré, par des techniques comparables à la nôtre, et notamment sur extraits tumoraux, que l'ACTH existe chez l'homme sous deux formes distinctes, phosphorylée et non phosphorylée, et ce en proportions variables d'un patient à l'autre. Ces études ont par ailleurs montré que l'ACTH phosphorylée éluée 2 à 3 fractions avant l'ACTH non phosphorylée. On peut donc raisonnablement penser que le pic retrouvé juste avant la fraction d'élution de l'ACTH* (fraction 77 ou 78) correspond à de l'ACTH non phosphorylée, et que le pic individualisé juste avant celui-là (fraction 75) correspond à de l'ACTH phosphorylée.

Cette hypothèse paraît confirmée par certains travaux effectués dans le laboratoire (Bertagna et Massias, données non publiées), menés sur extraits tumoraux. Dans ces travaux deux échantillons d'un même patient ont été étudiés par HPLC puis par RIA, l'un de ces échantillons ayant été mis en présence de phosphatase et l'autre n'ayant subi aucune modification. Dans l'échantillon intact les deux pics sont retrouvés comme précédemment décrits, alors

qu'après action de la phosphatase le premier pic a disparu et le second pic a été augmenté d'une valeur sensiblement équivalente à celle du premier, suggérant que l'ACTH phosphorylée a été déphosphorylée sous l'action de la phosphatase.

Nous n'avons pas d'explication pour les épaulements, il n'est pas possible de savoir s'ils correspondent effectivement à des peptides particuliers ou s'ils traduisent simplement une séparation imparfaite élargissant les pics à leur base.

Le pic intermédiaire n'est pas facile à expliquer, mais certains éléments permettent de penser qu'il correspond lui aussi à une forme entière d'ACTH (1-39). Nous nous fondons tout d'abord sur le fait qu'il est retrouvé, à peu près identique, à la fois chez les patients avec tumeur hypophysaire et chez ceux présentant une sécrétion ectopique. De plus, des travaux analogues à ceux-ci ont été menés dans le laboratoire il y a quelques années (213), quoique utilisant une technique un peu différente. L'anticorps employé alors était dirigé contre la partie N-terminale de la molécule d'ACTH, et reconnaissait donc l'ACTH mais pas le CLIP. Cette étude retrouvait également un pic intermédiaire entre les fractions d'élution du CLIP* et de l'ACTH*, d'une importance comparable à celui mis en évidence ici, et ce dans les deux types d'étiologie. Si cette hypothèse est juste le fait que ce pic soit détecté à la fois par un anticorps N-terminal et par un anticorps C-terminal signifierait que le peptide en question comprend (au moins) la séquence entière de la molécule d'ACTH. Cependant, les conditions employées dans cette étude diffèrent assez nettement des nôtres,

notamment dans les solvants utilisés (méthanol à la place de l'acétonitrile, TFA à la place de l'HFBA), la colonne étant également différente. Il nous est donc impossible de conclure formellement.

Dans le même ordre d'idées une étude a retrouvé, par des techniques voisines des nôtres, la présence dans le plasma humain d'ACTH oxydée sur le résidu Méthionine en position 4. Cette étude montre que l'ACTH oxydée, dans les conditions utilisées, élu plusieurs fractions avant la fraction d'élution de l'ACTH. Ce pic intermédiaire retrouvé dans les fractions 70 ou 71 pourrait donc correspondre, bien que cela demande à être vérifié, à de l'ACTH oxydée.

Concernant les pics situés avant la fraction d'élution du CLIP*, faute d'études précises sur le sujet, nous en sommes réduits à formuler des hypothèses, certaines fondées sur des données établies, et d'autres purement expectatives. Ainsi, on sait que le CLIP froid élu 2 à 3 fractions avant le CLIP*, il est donc vraisemblable que le pic retrouvé en position 60 ou 61 corresponde à du CLIP (18-39), ce qui expliquerait que ce pic ne soit important que chez les patients avec hypersécrétion ectopique d'ACTH. Ceci est du reste confirmé par la chromatographie effectuée avec des quantités de CLIP décelables en spectrométrie.

Comme pour l'ACTH, il a été montré que le CLIP pouvait exister sous forme phosphorylée et non phosphorylée, ce en proportion variable, et que le CLIP phosphorylé élu 2 à 3 fractions avant le CLIP non phosphorylé. Bertagna et Massias (données non publiées) ont, comme pour l'ACTH, montré qu'en faisant agir de la

phosphatase sur un échantillon d'extrait tumoral on faisait disparaître le premier pic au profit du second qui se retrouve augmenté d'une valeur équivalente à celle du premier. On peut donc raisonnablement émettre l'hypothèse que le pic 58 représente le CLIP phosphorylé et le pic 60 ou 61 le CLIP non phosphorylé.

La signification des pics 53 et 56 est impossible à établir compte-tenu des données dont nous disposons. On peut penser que ces pics correspondent à des fragments d'ACTH plus petits que le CLIP, soit deux fragments différents soit un seul fragment existant sous forme phosphorylée et non phosphorylée. Des études plus précises, utilisant notamment d'autres anticorps sont nécessaires pour progresser dans ce domaine.

D'autres pics sont parfois retrouvés (fractions 50, 64, 66) mais ils sont très inconstants et nettement moins importants. Il peut donc s'agir d'artefacts de manipulation, mais il n'est pas exclu que certains de ces pics puissent aussi correspondre à des peptides sécrétés par la tumeur.

4°) Comparaison entre tumeurs hypophysaires et tumeurs non hypophysaires

Quoiqu'il en soit et même si la nature de tous les pics isolés n'est pas parfaitement élucidée, il apparaît clairement que la technique exposée plus haut permet de distinguer nettement, à partir de leur profil d'élution en HPLC, deux catégories de plasmas chez les patients présentant un syndrome de Cushing ACTH-dépendant (figure 15):

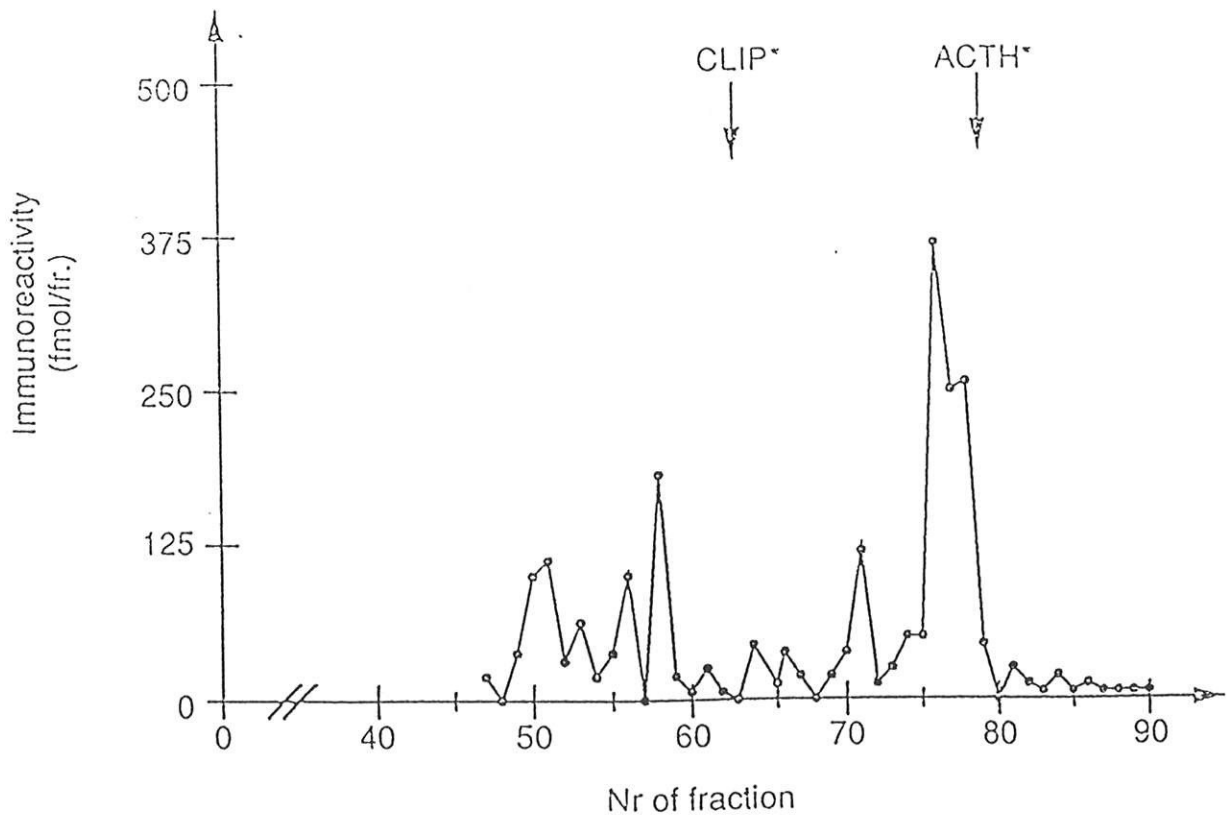
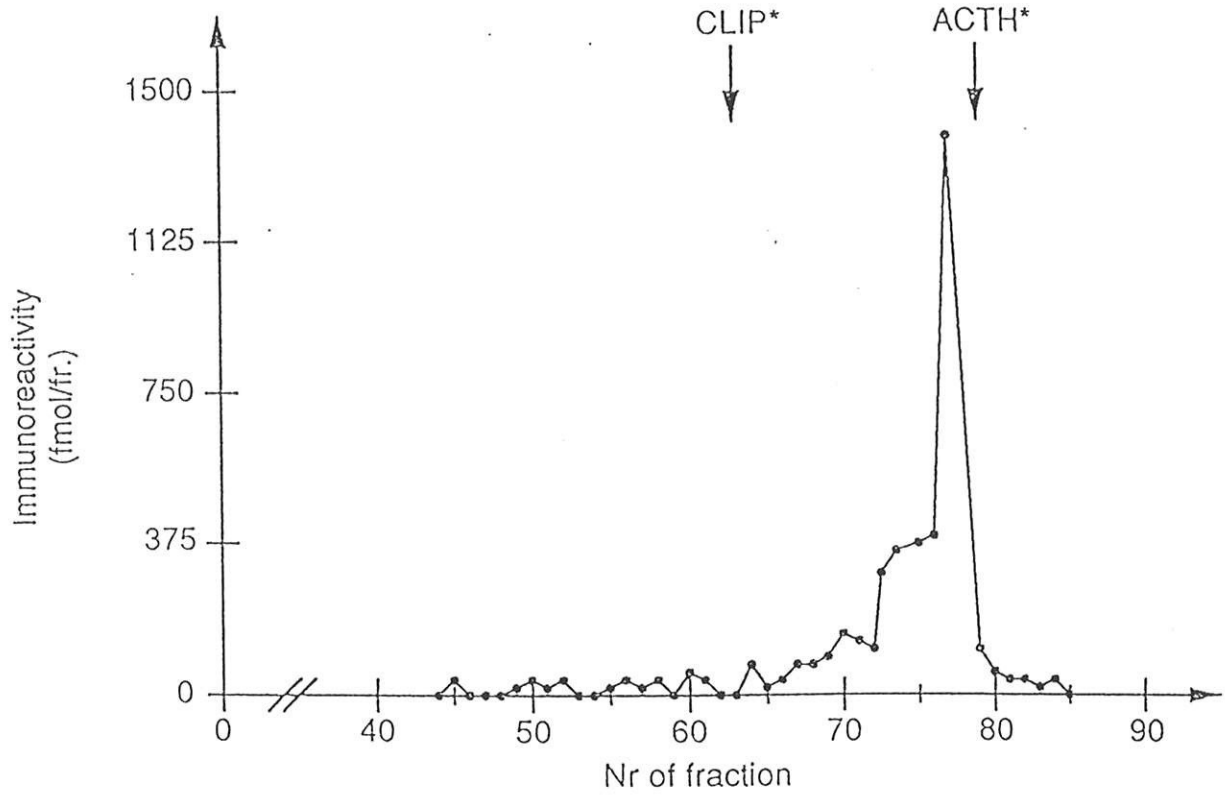


Figure 15

Distinction entre tumeur hypophysaire (schéma du haut)
et tumeur ectopique (schéma du bas)

- une catégorie de plasmas où l'immunoréactivité est retrouvée en quasi-totalité dans la région d'élution de l'ACTH (1-39), correspondant aux patients présentant une tumeur hypophysaire

- une catégorie de plasmas où l'immunoréactivité est répartie en deux zones bien distinctes, grossièrement équivalentes en quantités, l'une située dans la région d'élution de l'ACTH (1-39) et l'autre dans la région d'élution du CLIP (18-39).

On peut cependant remarquer que, chez la plupart des patients présentant une tumeur antehypophysaire, l'immunoréactivité retrouvée dans la région d'élution du CLIP n'est pas nulle, et est même parfois répartie dans des pics identiques, quoique de taille nettement inférieure, à ceux retrouvés en cas de sécrétion ectopique. Cela peut nous amener à penser que la différence de maturation de l'ACTH entre les tumeurs hypophysaires et les tumeurs non-hypophysaires n'est pas aussi radicale qu'il le paraissait, mais que la maturation plus poussée de l'ACTH existant dans les tumeurs ectopiques ne serait que l'exagération d'un phénomène se produisant déjà, à échelle plus réduite, dans les tumeurs antehypophysaires, voire dans l'antehypophyse saine. Ceci demande bien entendu à être étudié plus précisément.

C APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES DE CUSHING

1°) Intérêt

Nous avons déjà insisté auparavant sur la difficulté dans certains cas du diagnostic différentiel des syndromes de Cushing ACTH-dépendants. Dans certains cas en effet les résultats des différents tests de stimulation et de freination sont contradictoires ou insuffisamment nets pour pouvoir trancher. Les micro-adénomes corticotropes sont souvent suffisamment petits pour échapper au scanner hypophysaire, voire à l'IRM. Les tumeurs ectopiques sont parfois peu parlantes et peuvent échapper à un bilan morphologique rigoureux.

Cette difficulté du diagnostic différentiel peut résider dans le fait que certaines tumeurs hypophysaires peuvent synthétiser une quantité non négligeable de fragments d'ACTH, comme cela semble exister couramment dans les tumeurs ectopiques.(214) Ceci semble confirmé par notre étude retrouvant, pour les tumeurs hypophysaires, quelques pics peu importants dans la zone d'éluion du CLIP.

Dans ces cas où le diagnostic différentiel entre tumeur hypophysaire et tumeur ectopique ne peut pas être réalisé par les moyens usuels, certains ont recours au dosage de l'ACTH dans les sinus pétreux inférieurs. Il s'agit là cependant d'une technique lourde, prolongeant l'hospitalisation, devant être réalisée par un neurochirurgien entraîné et nécessitant une anesthésie générale. Même si les accidents rapportés sont rares, les risques potentiels ne sont pas négligeables et les problèmes peuvent être graves. D'autre part cette technique ne permet pas de trancher dans tous les cas, nous avons précédemment vu que les normes concernant le gradient d'ACTH entre sinus

pétreux inférieurs et périphérie ne sont pas parfaitement définies. De plus il a été rapporté des cas de tumeurs hypophysaires avec gradient proche de 1 et des tumeurs ectopiques avec gradient élevé, notamment chez des patients surrénalectomisés.

Nous pensons que la technique présentée ici peut constituer une aide au diagnostic étiologique des syndromes de Cushing dans les cas difficiles. Les exemples présentés ici concernent des patients pour lesquels le diagnostic étiologique ne posait pas pour la plupart de problème particulier et avait été le plus souvent réalisé auparavant par les moyens usuels. Il serait donc intéressant, pour tester l'utilité de cette méthode, de l'appliquer à des cas plus difficiles. Il peut en tous cas s'agir selon nous d'une alternative séduisante au dosage d'ACTH dans les sinus pétreux inférieurs. Cette méthode est en effet beaucoup moins lourde et moins dangereuse pour le patient, nécessitant un simple prélèvement dans une veine périphérique. Sa sensibilité et sa spécificité restent à établir, mais nous pensons qu'elles devraient être satisfaisantes, au moins équivalentes à celles retrouvées avec le cathétérisme des sinus pétreux inférieurs.

2°) Inconvénients

Cette technique, qui n'est encore qu'expérimentale, présente un certain nombre d'inconvénients et doit être améliorée pour envisager son utilisation plus large.

Il s'agit nous l'avons dit d'une technique relativement peu sensible, dont le rendement n'est que de l'ordre de 45 à 50%, et ne pouvant donc être appliquée de façon fiable qu'à des plasmas contenant au moins 100 pmol/l d'ACTH. Cette sensibilité doit donc être sensiblement améliorée afin de pouvoir étudier des plasmas moins riches en ACTH (de l'ordre de 20 à 30 pmol/l), représentant un grand nombre de patients. Cette sensibilité limitée est essentiellement due aux deux extractions et séparations successives (SEP-PAK et HPLC), où il existe une perte de peptides importante. En effet la molécule d'ACTH a la fâcheuse propriété de "coller" à la plupart des supports solides, et peut donc rester adsorbée sur la colonne indépendamment des conditions d'HPLC. Cet inconvénient est limité par l'utilisation de l'HFBA, mais reste cependant non négligeable. La recherche de nouveaux solvants pourrait peut-être atténuer ce problème. L'ACTH peut également adhérer aux parois des tubes de prélèvement, ce qui limite encore le rendement. Enfin la molécule d'ACTH est fragile et rapidement dégradée à température ambiante, il est donc nécessaire d'apporter un soin tout particulier au traitement des prélèvements, qui doivent être centrifugés et congelés sans délai, afin de limiter au maximum la perte d'ACTH. Enfin il n'est pas exclu que la conservation prolongée des prélèvements, même congelés, s'accompagne d'une perte d'ACTH. Les plasmas gagnent donc à être étudiés le plus tôt possible. Cette sensibilité relativement limitée est en partie compensée par le seuil de détection bas du dosage radio-immunologique. La mise au point d'un dosage capable de détecter des quantités encore plus basses de peptides peut cependant être envisagée.

Il s'agit par ailleurs d'une technique relativement longue, demandant 2 à 3 semaines entre le prélèvement et l'obtention des résultats. Cependant 4 à 5 plasmas peuvent être traités simultanément, et une série d'études peut succéder à une autre tous les 2 à 3 jours, une quarantaine de plasmas peuvent donc être étudiés chaque mois par une seule personne. Cette durée peut être réduite à plusieurs niveaux. Les deux lyophilisations tout d'abord, demandant chacune 48 heures, devraient pouvoir être faites plus rapidement grâce à l'emploi de matériel plus performant. Le dosage radio-immunologique demande 7 jours d'incubation, la mise au point d'un dosage présentant les mêmes caractéristiques, mais pouvant être réalisé plus rapidement devrait être possible. Enfin le comptage en compteur gamma a été réalisé sur 10 minutes pour chaque fraction et demande donc 2 à 3 jours suivant le nombre de fractions. Cette durée de comptage devrait pouvoir être réduite notablement.

On peut enfin considérer que le coût de cette méthode est relativement élevé. Elle nécessite tout d'abord une personne pouvant réaliser l'HPLC et le RIA, techniques très spécialisées. L'appareillage nécessaire à l'HPLC est par ailleurs très sophistiqué et onéreux, la colonne doit être changée régulièrement pour assurer une qualité et une efficacité de séparation optimum, même si la pré-colonne protégeant la colonne permet d'en allonger notablement la durée de vie. L'HPLC et le RIA nécessitent enfin une quantité importantes de réactifs dont certains sont relativement chers. Cependant, le coût de cette technique ne parait pas être supérieur à celui du cathétérisme des sinus pétreux inférieurs.

En tout état de cause ce mode d'étude ne pourra sans doute jamais être utilisable en routine pour le diagnostic au quotidien des syndromes de Cushing. Il restera très spécialisé et doit être réservé à l'étude de quelques cas particulièrement difficiles où tous les autres moyens de diagnostic ont été utilisés sans permettre de trancher de façon certaine, et comme alternative au cathéterisme des sinus pétreux inférieurs.

3°) Autres applications

Cette méthode, outre le diagnostic étiologique des syndromes de Cushing ACTH-dépendants, peut-être utilisée comme moyen d'étude de la physiopathologie de ces affections. Nous avons vu que différents peptides pouvaient être isolés dans le plasma des patients, mais que nous n'avons aucune certitude quant à la nature précise de ces peptides. Des travaux plus poussés peuvent donc être réalisés dans ce sens, en utilisant par exemple une batterie d'anticorps couplés à l'HPLC.

Elle pourrait également être appliquée à l'étude de la physiologie de la production et de la maturation de la POMC, tant au niveau hypophysaire qu'au niveau des tissus sains non hypophysaires capables d'exprimer le gène de la POMC. Des techniques voisines de la nôtre ont d'ailleurs déjà été utilisées dans ce sens. Il faudrait cependant améliorer très nettement le rendement et le seuil de détection de la méthode afin de pouvoir l'appliquer à des plasmas

normaux, c'est-à-dire contenant moins de 20 pmol/l d'ACTH.

Enfin des travaux ont été esquissés grâce à cette technique afin d'étudier la maturation de la POMC chez le nouveau-né. En effet chez l'homme on retrouve pendant la vie foétale un lobe intermédiaire de l'hypophyse, dans lequel la maturation de la POMC se fait comme dans les tissus extra-hypophysaires. Ce lobe intermédiaire disparaît par la suite et n'existe plus chez l'adulte. Il nous a paru intéressant d'étudier chez le nouveau-né le profil d'élution du plasma par cette technique, à la recherche de pics apparentés au CLIP. Ce travail a été compliqué par le fait que le plasma de ces nouveaux-nés (ne présentant pas de pathologie hypophyso-surrénalienne) contenait peu d'ACTH, et que les prélèvements étaient à chaque fois de petite taille. Plusieurs prélèvements ont donc dû être poolés et concentrés pour être exploitables.

Ces travaux n'ont pas été assez poussés pour que des résultats probants puissent être obtenus, mais les premières chromatographies semblaient effectivement retrouver des pics avant la fraction d'élution du CLIP. La poursuite de cette étude est bien entendue nécessaire afin d'apporter des résultats interprétables.

CONCLUSION

Le diagnostic étiologique précis des syndromes de Cushing ACTH-dépendants est parfois un des plus difficiles qui soit en endocrinologie. Un bilan clinique et biologique soigneux, un bilan hormonal complet et bien mené, un bilan morphologique systématique ne suffisent parfois pas à trancher entre tumeur hypophysaire et tumeur ectopique, ce qui retarde et gêne considérablement le traitement.

Pourtant, l'étude de la physiopathologie de ces maladies met en évidence d'importantes différences, notamment au niveau de l'expression du gène de la POMC, de la maturation de la POMC et des peptides produits, et au niveau de la régulation des sécrétions. Notre objectif dans ce travail était de développer une technique nous permettant, de façon simple, rapide, peu invasive et fiable, de mettre en évidence ces différences dans le plasma de patients.

Nous avons pu développer une technique de séparation par RP-HPLC permettant l'étude précise dans le plasma de l'ACTH et des peptides dérivés. Il nous a fallu régler certains problèmes afin que cette méthode devienne efficace, simple et reproductible. La composition et la préparation de la phase mobile constituent le point crucial. L'utilisation d'acétonitrile et d'HFBA a permis une séparation fine et nette des différents peptides. Les problèmes de dégazage des solvants et de rétention aléatoire des peptides sur la colonne ont pu être résolus pour leur plus grande part, permettant une bonne fiabilité et une reproductibilité satisfaisante. L'association à une méthode de dosage sensible et fiable par RIA, reconnaissant à la fois

l'ACTH et le CLIP, permet de mettre simplement en évidence les peptides séparés.

Grâce à cette méthode il est possible de distinguer deux aspects très différents chez les patients présentant un syndrome de Cushing ACTH-dépendant:

- en cas de tumeur hypophysaire la quasi-totalité de l'immunoréactivité détectée correspond à de l'ACTH intacte, phosphorylée ou non.

- en cas de tumeur ectopique une partie importante de l'immunoréactivité correspond à des peptides plus petits, notamment du CLIP phosphorylé ou non et possiblement d'autres fragments d'ACTH.

Cette technique demande bien évidemment à être développée et améliorée. Elle paraît cependant pouvoir apporter une aide efficace dans le diagnostic étiologique de ces cas difficiles, où les méthodes classiques sont insuffisantes et où le seul recours est parfois le cathétérisme des sinus pétreux inférieurs, examen lourd, potentiellement dangereux et dont la fiabilité n'est pas absolue.

Certaines questions demeurent posées, concernant notamment la nature exacte des peptides séparés. De plus, les applications de cette technique restent pour une bonne part à préciser.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- Luton JP, Guilhaume B, Bertagna X, Kuhn JM, Bricaire H 1981 - Le syndrome de Cushing. *Encycl. Méd. Chir., Paris, glandes endocrines*, 10015 B¹⁰, 9-1981.
- 2- Apert E 1910 - Dystrophies en relation avec des lésions des capsules surrénales. *Bull. Soc. Pédiat. (Paris)*, 12:501.
- 3- Gallais A 1912 - Le syndrome surrénalo-génital. Thèse, Paris.
- 4- Sicard JA, Reilly J 1913 - Dissociation des fonctions de pilosité avec dysécrétion endocrinienne. Réaction hypophysaire avec hyperalbuminose rachidienne. *B. M. Soc. Méd. Hôp. Paris* 36:708.
- 5- Cushing H 1932 - The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). *Bull. Johns Hopk. Hosp.* 50:137.
- 6- Crooke AC 1935 - A change in the basophil cells of the pituitary gland common to conditions which exhibit the syndrome attributed to basophil adenomas. *J. Pathol. Bact.* 41:339.
- 7- Nelson DH, Meakin JW, Thorn GW 1960 - ACTH producing pituitary tumors following adrenalectomy for Cushing's syndrome. *Ann. Intern. Med.* 52:560.
- 8- Bowes SB, Benn JJ, Scobie IN, Umpleby AM, Lowy C, Sönksen PH 1991 - Glucose metabolism in patients with Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 34:311.
- 9- Khaleeli AA, Edwards RHT, Gohil K, McPhail G, Rennie MJ, Round J, Ross EJ 1983 - Corticosteroid myopathy: a clinical and pathological study. *Clin. Endocrinol.* 18:155.
- 10- Lamberts SWJ, Birkenhäger JC 1976 - Body composition in Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42:864.
- 11- Kaye TB, Crapo L 1990 - The Cushing syndrome: an update on diagnostic tests. *Ann. Intern. Med.* 112:434.
- 12- Zadik Z, de Lacerda L, de Camargo LA, Hamilton BP, Migeon CJ, Kowarski AA 1980 - A comparative study of urinary 17-hydroxycorticosteroids, free urinary cortisol, and the integrated concentration of plasma cortisol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1099.
- 13- Zadik Z, de Lacerda L, Kowarski AA 1982 - Evaluation of the 6-hour integrated concentration of cortisol as a diagnostic procedure for Cushing's syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54:1072.
- 14- Desai RK, Jialal I, Naidoo C, Omar MA, Joubert SM 1987 - Evaluation of the integrated 3-hour plasma cortisol concentration as a test for Cushing's syndrome. *S. Afr. Med. J.* 71:156.

- 15- Contreras LN, Hane S, Tyrrell JB 1986 - Urinary cortisol in the assessment of pituitary-adrenal function: utility of 24-hour and spot determination. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62:965.
- 16- Laudat MH, Billaud L, Thomopoulos P, Vera O, Yllia A, Luton JP 1988 - Evening urinary free corticoids: a screening test in Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 119:459.
- 17- Walker MS 1979 - Screening for Cushing's syndrome using early morning urine samples. *Ann. Clin. Biochem.* 16:86.
- 18- Phillipou G 1982 - Investigation of urinary steroid profile as a diagnostic method in Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 16:86.
- 19- Schoneshofer M, Weber B, Oelkers W, Nahoul K, Mantero F 1986 - Measurement of urinary free 20 alpha-dihydroxycorticosteroid in biochemical diagnosis of chronic hypercorticism. *Clin. Chem.* 32:808.
- 20- Nugent CA, Nichols T, Tyler FH 1965 - Diagnosis of Cushing's syndrome. Single dose dexamethasone suppression test. *Arch. Intern. Med.* 116:172.
- 21- Crapo L 1979 - Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests. *Metabolism* 28:955.
- 22- Cronin C, Igoe M, Duffy S, Cunningham SK, McKenna TJ 1990 - The overnight dexamethasone test is a worthwhile screening procedure. *Clin. Endocrinol.* 33:27.
- 23- Liddle GW 1960 - Tests of pituitary-adrenal suppressibility in the diagnosis of Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 20:1539.
- 24- Streeten DH, Stevenson CT, Dalakos TG, Nicholas JJ, Dennick LG, Fellerman H 1969 - The diagnosis of hypercorticism. Biochemical criteria differentiating patients from lean and obese normal subjects and from female on oral contraceptives. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29:1191.
- 25- Bricaire H, Leprat J, Luton JP 1968 - Etat actuel des explorations dynamiques de la corticosurrénale. *Nouv. Pres. Méd.* 76:2157.
- 26- Tyrrell JB, Findling JW, Aron DC 1986 - An overnight high-dose dexamethasone suppression test for rapid differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Ann. Intern. Med.* 104:180.
- 27- Ashcraft MW, Van Herle AJ, Vener SL, Geffner DL 1982 - Serum cortisol levels in Cushing's syndrome after low- and high-dose dexamethasone suppression. *Ann. Intern. Med.* 96:21.

- 28- Kennedy L, Atkinson AB, Sheridan B, Hadden DL 1984 - Serum cortisol concentrations during low dose dexamethasone suppression test to screen for Cushing's syndrome. *Br. Med. J.* 289:1188.
- 29- Atkinson AB, McAteer EJ, Hadden DR, Kennedy L, Sheridan B, Traub AI 1989 - A weight-related intravenous dexamethasone suppression test distinguishes obese control from patients with Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 120:753.
- 30- Trainer PJ, Grossman A 1991 - The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 34:317.
- 31- Raff H, Finding JW 1989 - A new immunoradiometric assay for corticotropin evaluated in normal subjects and patients with Cushing's syndrome. *Clin. Chem.* 35:596.
- 32- Chalendar D, Tourniaire J 1988 - Le syndrome de Cushing par adénome surrénalien. 12 observations. *Rev. Franç. Endocrinol. Clin.* 29:553.
- 33- Young WF, Carney JA, Musa BU, Wulffraat NM, Lens JW, Drexhage HA 1989 - Familial Cushing's syndrome due to primary pigmented nodular adrenocortical disease. Reinvestigation 50 years later. *N. Engl. J. Med.* 321:1659.
- 34- Howlett TA, Drury PL, Perry L, Doniach I, Rees LH, Besser GM 1986 - Diagnosis and management of ACTH-dependent Cushing's syndrome: comparison of the features in ectopic and pituitary ACTH production. *Clin. Endocrinol.* 24:699.
- 35- Gewirtz G, Yalow RS 1974 - Ectopic ACTH production in carcinoma of the lung. *J. Clin. Invest.* 13:1022.
- 36- Kuhn JM, Seurin D, Bertagna X, Hadjiat R, Thieblot P, Girard F 1984 - Les lipotropines (beta- et gamma-LPH): marqueurs fiables de la fonction corticotrope. *Ann. Endocrinol.* 45:369
- 37- Kuhn JM, Seurin D, Proeschel MF, Luton JP, Bricaire H, Girard F - Intérêt de la détermination simultanée des taux de l'ACTH et des hormones lipotropes plasmatiques dans le syndrome de Cushing chez l'homme. - Peptides lipocorticotropes et maladie de Cushing. XXIII^e journées internationales d'endocrinologie clinique, Paris, mai 1980.
- 38- Kuhn JM, Proeschel MF, Seurin D, Bertagna X, Luton JP, Girard F 1989 - Comparative assessment of ACTH and lipotropin plasma levels in the diagnosis and follow-up of patients with Cushing's syndrome: a study of 210 cases. *AM. J. Med.* 86:678

- 39- Linquette M, Cappoen JP, Fourlinnie JC, Harpignies G 1980 - Le test de freinage cortico-surrénal par le phosphate de dexaméthasone en intra-veineux. *Sem. Hôp. Paris* 56:1380.
- 40- Biemond P, de Jong FH, Lamberts SWJ 1990 - Continuous dexamethasone infusion for seven hours in patients with the Cushing's syndrome. A superior differential diagnosis test. *Ann. Intern. Med.* 112:738.
- 41- Tabarin A, San Galli F, Dezou S, Leprat F, Corcuff JB, Latapie JL, Guérin J, Roger P 1990 - The corticotropin-releasing factor test in the differential diagnosis of Cushing's syndrome: a comparison with the lysine-vasopressin test. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 123:331.
- 42- Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J 1981 - Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* 213:1394.
- 43- Muller OA, Dorr HG, Hagen B, Stallia GK, von Werder K 1982 - Corticotrophin-releasing factor (CRF)-stimulation test in normals and patients with disturbances of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Klin. Wochensch.* 60:1485.
- 44- Orth DN, De Bold CR, De Cherney GS, Jackson RV, Alexander AV, Rivier J, Rivier C, Speiss J, Vale W 1982 - Pituitary microadenomas causing Cushing's disease respond to corticotrophin-releasing factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 55:1017.
- 45- Nieman LK, Cutler GB, Oldfield EH, Loriaux DL, Chrousos GP 1989 - The ovine corticotropin-releasing hormone (CRH) stimulation test is superior to the human CRH stimulation test for the diagnosis of Cushing's disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:165.
- 46- Chrousos GP, Schulte HM, Oldfield EH, Gold PW, Cutler GB, Loriaux DL 1984 - The corticotropin-releasing factor stimulation test. An aid in the evaluation of patients with Cushing's syndrome. *N. Engl. J. Med.* 310:622.
- 47- Gold PW, Loriaux DL, Roy A, Kling MA, Calabrese JR, Kellner CH, Nieman LK, Post RM, Pickar D, Galluci W, Avgerinos P, Paul S, Oldfield EH, Cutler GB, Chrousos GP 1986 - Responses to corticotropin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. Pathophysiologic and diagnosis implications. *N. Engl. J. Med.* 314:1329.
- 48- Orth DN, DeBold R, DeCherney S, Jackson RV, Sheldon WR, Nicholson WE, Island DP, Alexander AN, Uderman H, Evans WS, Thorner MO 1984 - Clinical studies with ovine corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 114:963.

49- Tabarin A, San Galli F, Guérin J, Corcuff B, Manciet G, Lefort G, Latapie JL, Roger P 1990 - Intérêt du test à la corticolibérine dans le diagnostic étiologique du syndrome de Cushing. *Press. Méd.* 19:557.

50- Favrod-Coune C, Raux-Demay MC, Proeschel MF, Bertagna X, Girard F, Luton JP Potentialisation of the classical ovine corticotrophin releasing hormone (oCRH) stimulation test by the combined administration of small doses of lysine vasopressine (LVP). *Clin. Endocrinol.* (sous presse)

51- Mampalam TJ, Tyrrell JB, Wilson CB 1988 - Transphenoidal microsurgery for Cushing's disease: a report of 216 cases. *Ann. Intern. Med.* 109:487.

52- Marcovitz S, Wee R, Chan J, Hardy J 1987 - The diagnostic accuracy of preoperative CT scanning in the evaluation of pituitary ACTH-secreting adenomas. *A.J.R.* 149:803.

53- Findling JW, Tyrrell JB 1986 - Occult ectopic secretion of corticotropin. *Arch. Intern. Med.* 146:929.

54- Boggan JE, Tyrrell JB, Wilson CB 1983 - Transphenoidal microsurgical management of Cushing's disease. Report of 100 cases. *J. Neurosurg.* 59:195.

55- Doppman JL, Franck JA, Dwyer AJ, Oldfield EH, Miller DL, Nieman LK, Chrousos GP, Cutler GP, Loriaux DL 1988 - Gadolinium DTPA enhanced MR imaging of ACTH-secreting microadenomas of the pituitary gland. *Journal of clinical computer assisted tomography* 12:728.

56- White FE, White MC, Drury PL, Kelsey Fry I, Beser GM 1982 - Value of computed tomography of the abdomen and chest in investigation of Cushing's syndrome. *Br. Med. J.* 284:771.

57- Trainer PJ, Besser GM 1990 - Cushing's syndrome: difficulties in diagnosis. *Trends in endocrinology and metabolism.* 1:292.

58- Oldfield EH, Chrousos GP, Schulte HM, Schaff M, McKeever PE, Krudy AG, Cutler GB, Loriaux DL, Doppman JL 1985 - Pre-operative lateralization of ACTH-secreting microadenomas by bilateral and simultaneous inferior petrosal sinus sampling. *N. Engl. J. Med.* 312:100.

59- Findling JW, Aron DC, Tyrrell JB, Shinsako JH, Fitzgerald PA, Norman D, Wilson CB, Forsham PH 1981 - Selective venous sampling for ACTH in Cushing's syndrome: differentiation between Cushing's disease and the ectopic ACTH syndrome. *Ann. Intern. Med.* 94:647.

60- Schulte HM, Allolio B, Gunther RW, Benker G, Windeck R, Winkelmann W, Reinwein D 1987 - Bilateral and simultaneous sinus petrosus inferior catheterization in patients with Cushing's

syndrome: plasma immunoreactive ACTH concentrations before and after administration of CRF. *Horm. Metab. Res. (suppl.)* 166:66.

61- Crook PA, Pestell RG, Calenti AJ, Gilford EJ, Henderson KJ, Best JD, Alford FP 1988 - Multiple pituitary hormone gradients from inferior petrosal sinus sampling in Cushing's disease. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 119:75.

62- McCance DR, McIlrath E, McNeil A, Gordon DS, Hadden DR, Kennedy L, Sheridan B, Atkinson AB 1989 - Bilateral inferior petrosal sinus sampling as a routine procedure in ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 30:157.

63- Tabarin A, Greselle JF, San Galli F, Leprat F, Angibeau RM, Latapie JL, Guérin J, Roger P 1990 - The CRF test during bilateral inferior petrosal sinus sampling in the diagnosis of Cushing's disease. *Neuroendocrinology* 52,P4.38 (Abstr.).

64- Dluhy RG 1987 - Case reports of the Massachusetts General Hospital. Weekly clinicopathological exercises. Case 52-1987. A 20-year-old woman with Cushing's disease and a pulmonary nodule. *N. Engl. J. Med.* 317:1648.

65- Boggan JE, Tyrrell JB, Wilson CB 1983 - Transsphenoidal microsurgical management of Cushing's disease. *J. Neurosurg.* 59:195.

66- Snow RB, Patterson RH Jr, Horwith M, Saint-Louis L, Fraser RA 1988 - Usefulness of preoperative inferior petrosal vein sampling in Cushing's disease. *Surg. Neurol.* 29:17.

67- Manni A, Latshaw RF, Page R, Santen RJ 1983 - Simultaneous bilateral venous sampling for adrenocorticotropin in pituitary-dependent Cushing's disease: evidence for lateralization of pituitary venous drainage. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57:1070.

68- Landolt AM, Valavanis A, Girard J, Eberle AN 1986 - Corticotrophin-releasing factor-test used with bilateral, simultaneous inferior petrosal sinus blood-sampling for the diagnosis of pituitary-dependent Cushing's disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 25:687.

69- Trainer PJ, Howlett TA, Dacie JE, Besser GM 1990 - Simultaneous bilateral inferior petrosal sinus sampling with 100 microg of corticotrophin-releasing hormone (CRH-41) for ACTH in 32 patients with ACTH-dependent Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 52,P4.18.

70- Schulte HM, Allolio B, Gunther RW, Benker G, Winkelmann W, Ohnhaus EE, Reinwein D 1988 - Selective bilateral and simultaneous catheterization of the inferior petrosal sinus: CRF stimulates prolactin secretion from ACTH-producing microadenomas in Cushing's disease. *Clin. Endocrinol.* 28:289.

- 71- Wittert GA, Crock PA, Donald RA, Gilford EJ, Boolell M, Alford FP, Espiner EA 1990 - Arginine vasopressin in Cushing's disease. *Lancet* 335:991.
- 72- Doppman JL, Pass HI, Nieman L, Cutler GB, Chrousos GP, Loriaux DL 1989 - Failure of bronchial lavage to detect elevated levels of adrenocorticotropin (ACTH) in patients with ACTH-producing bronchial carcinoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69:1302.
- 73- Gicquel C. 1988 - Estimation comparée du CLIP et de l'ACTH dans le plasma. Intérêt dans les situations d'hypersécrétion corticotrope. Thèse, Nantes.
- 74- Yalow RS, Berson SA 1959 - Radiobiology. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184:1648.
- 75- Steiner DF, Oyer PE 1967 - The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57:473.
- 76- Bennett HPJ 1985 - Peptide hormone biosynthesis: recent developments. *Recent Results Cancer Res.* 99:34.
- 77- Herbert E, Uhler M 1982 - Biosynthesis of polypeptide precursors to regulatory peptides. *Cell* 30:1.
- 78- Yanaihara N 1980 - Hormone precursors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 9:223.
- 79- Yalow RS, Berson SA 1971 - Size heterogeneity of immunoreactive human ACTH in plasma and in extracts of pituitary glands and ACTH producing thymoma. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44:439.
- 80- Yalow RS, Berson SA 1973 - Characteristics of "big ACTH" in human plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36:415.
- 81- Gewirtz G, Schneider B, Krieger DT, Yalow RS 1974 - Big ACTH: conversion to biologically active ACTH by trypsin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38:227.
- 82- Orth DN, Nicholson WE, Mitchell WM, Island DP, Liddle GW 1973 - Biologic and immunologic characterization and physical separation of ACTH and ACTH fragments in the ectopic ACTH syndrome. *J. Clin. Invest.* 52:1756.
- 83- Coslovsky R, Schneider B, Yalow RS 1975 - Characterization of mouse ACTH in plasma and in extracts of pituitary and of adrenotropic pituitary tumor. *Endocrinology* 97:1308.

- 84- Eipper BA, Mains RE 1975 - High molecular weight forms of adrenocorticotrophic hormone in the mouse pituitary and in a mouse pituitary tumor cell line. *Biochemistry* 14:3834.
- 85- Mains RE, Eipper BA 1975 - Molecular weights of adrenocorticotrophic hormone in extracts of anterior and intermediate-posterior lobes of mouse pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3565.
- 86- Mains RE, Eipper BA 1976 - Biosynthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.* 251:4115.
- 87- Mains RE, Eipper BA, Ling NR 1977 - Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3014.
- 88- Eipper BA, Mains RE 1977 - Peptide analysis of a glycoprotein form of adrenocorticotrophic hormone. *J. Biol. Chem.* 252:8821.
- 89- Eipper BA, Mains RE 1980 - Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocrine Rev.* 1:1.
- 90- Phifer JE, Orth DN, Spicer SS 1974 - Specific demonstration of the human hypophyseal adrenocortico-melanotropic (ACTH/MSH) cell. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:684.
- 91- Roberts JL, Herbert E 1977 - Characterization of a common precursor to corticotropin and beta-lipotropin: cell-free synthesis of the precursor and identification of corticotropin peptides in the molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4826.
- 92- Lowry PJ, Rees LH, Tomlin S, Gillies G., Landon J. 1976 - Chemical characterization of ectopic ACTH purified from a malignant thymic carcinoid tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43:831.
- 93- Bertagna XY, Nicholson WE, Sorenson GD, Pettengill OS, Mount CD, Orth DN 1978 - Corticotropin, lipotropin, and beta-endorphin production by a human non pituitary tumor in culture: evidence for a common precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5130.
- 94- Chrétien M, Benjannet S, Gossard F, Gianoulakis G, Crine P, Lis M, Seidah NG 1979 - From beta-lipotropin to beta-endorphin and "proopiomelanocortin". *Can. J. Biochem.* 57:1111.
- 95- Scott AP, Lowry PJ, Bennett HPJ, McMartin, C Ratcliffe JG 1974 - Purification and characterization of porcine corticotrophin-like intermediate lobe peptide. *J. Endocrinol.* 61:369.
- 96- Hughes J., Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR 1975 - Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577.

- 97- Lundblad JR, Roberts JL 1988 - Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocrine rev.* 9:135.
- 98- Chang ACY, Cochet M, Cohen SN 1980 - Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4890.
- 99- Takahashi H, Hakamata Y, Watanebe Y, Kikuno R, Miyata T, Numa S 1983 - Complete nucleotide sequence of the human corticotropin-beta-lipoprotein precursor gene. *Nucleic Acids Res.* 11:6847.
- 100- Drouin J, Goodmann HM 1980 - Most of the coding region of rat ACTH and beta-LPH precursor gene lacks intervening sequences. *Nature* 288:610.
- 101- Drouin J, Chamberland M, Charron J, Jeannotte L, Nemer M 1985 - Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *FEBS Lett* 193:54.
- 102- Nakanishi S, Teranishi Y, Watanabe Y, Notake M, Noda M, Kakidani H, Jingami H, Numa S 1981 - Isolation and characterization of the bovine corticotropin/beta-lipotropin precursor gene. *Eur. J. Biochem.* 115:429.
- 103- Uhler M, Herbert E, Deustachio P, Ruddle FD 1983 - The mouse genome contains two nonallelic pro-opiomelanocortin genes. *J. Biol. Chem.* 258:9444.
- 104- Notake M, Tobimatsu T, Watanabe Y, Takahashi H, Mishina M, Numa S 1983 - Isolation and characterization of the mouse corticotropin-beta-lipotropin precursor gene and a related pseudogene. *FEBS Lett.* 156:67.
- 105- Eberwine JH, Roberts JL 1983 - Analysis of pro-opiomelanocortin gene structure and function. *DNA* 2:1.
- 106- Krieger DT 1983 - The multiple faces of pro-opiomelanocortin, a prototype precursor molecule. *Clin. Res.* 31:342.
- 107- Civelli O, Birnberg N, Herbert H 1982 - Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J. Biol. Chem.* 257:6783.
- 108- Guillemin R, Schally AV, Lipscomb HS, Andersen RN, Lung JM 1962 - On the presence in hog hypothalamus of beta-corticotropin releasing factor, alpha- and beta-melanocyte stimulating hormones, adrenocorticotropin, lysine vasopressin and oxytocin. *Endocrinology* 70:471.

- 109-Krieger DT, Liotta AS, Brownstein MJ 1977 - Presence of corticotropin in brain of normal and hypophysectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:648.
- 110- Orwoll E, Kendall JW, Lamorena L, McGilvra R 1979 - Adrenocorticotropin and melanocyte-stimulating hormone in the brain. *Endocrinology* 104:1845.
- 111- Gramsch C, Kleber G, Höllt V, Pasi A, Merhaein P, Herz A 1980 - Pro-opioid fragments in human and rat brain: beta-endorphin and alpha-MSH are the predominant peptides. *Brain Res.* 192:109.
- 112- Emson PC, Corder R, Ratter SJ, Tomlin S, Lowry PJ, Rees LH, Arregui A, Besser MN 1984 - Regional distribution of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the human brain. *Neuroendocrinology* 38:45.
- 113- Pique L, Jegou S, Bertagna X, Javoy-Agid F, Seurin D, Proeschel MF, Girard F, Agid Y, Vaudry H, Luton JP 1985 - Proopiomelanocortin peptides in the human hypothalamus. *Neurosciences letters* 54:141.
- 114- Jingami H, Nakanishi S, Imura H, Numa S 1984 - Tissue distribution of messenger RNAs coding for opioid peptide precursors and related RNA. *Eur. J. Biochem.* 142:441.
- 115- Pintar JE, Schacter BS, Herman AB, Durgerian S, Krieger DT 1984 - Characterization and localization of proopiomelanocortin messenger RNA in the adult rat testes. *Science* 225:632.
- 116- Chen C-L C, Chang C-C, Krieger DT Bardin CW 1986 - Expression and regulation of proopiomelanocortin-like gene in ovary and placenta: comparison with the testes. *Endocrinology* 118:2382.
- 117- Lacaze-Masmonteil T, de Keyzer Y, Luton JP, Kahn A, Bertagna X 1987 - Characterization of proopiomelanocortin transcripts in human nonpituitary tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7261.
- 118- Lolait SJ, Clements JA, Markwick AJ, Cheng C, McNally M, Smith AI, Funder JW 1986 - Pro-opiomelanocortin messenger ribonucleic acid and posttranslational processing of beta endorphin in spleen macrophages. *J. Clin. Invest.* 77:1776.
- 119- Cheng MC, Smith AI, Funder JW 1986 - Alpha-endorphin and its congeners in rat pituitary and thyroid: effects of propylthiouracil and thyroid hormone administration. *Endocrinology* 119:642.
- 120- Clements JA, Funder JW, Tracy K, Morgan FJ, Campbell DJ, Lewis P, Hearn MTW 1982 - Adrenocorticotropin, beta-endorphin and beta-lipotropin in normal thyroid and lung: possible implications for ectopic hormone secretion. *Endocrinology* 111:2097.

121- Bruni JF, Watkins WB, Yen SSC 1979 - Beta-endorphin in the human pancreas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:649.

122- Fuerle GE, Weber U, Helmstaedter V 1980 - Corticotropin-like substances in human gastric antrum and pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1656.

123- Tanaka I, Yoshikatsu N, Kazuwa N, Oki S, Masaki N, Ohtsuki H, Imira H 1982 - Presence of immunoreactive gamma-melanocyte-stimulating hormone, adrenocorticotropin, and beta-endorphin in human gastric antral mucosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54:392.

124- Orwoll ES, Kendall JW 1980 - Beta-endorphin and adrenocorticotropin in extrapituitary sites: gastrointestinal tract. *Endocrinology* 107:408.

125- Liotta A, Osathanondh R, Ryan KJ, Krieger DT 1977 - Presence of corticotropin in human placental: demonstration of in vitro synthesis. *Endocrinology* 101:1552.

126- Liotta AS, Houghten R, Krieger DT 1982 - Identification of a beta-endorphin-like peptide in cultured human placental cells; *Nature* 295:593.

127- Vuolteenaho O, Vakkuri O, Leppäluoto J 1980 - Wide distribution of beta-endorphin-like immunoreactivity in extrapituitary tissues of rat. *Life Sci.* 27:57.

128- Bertagna X, de Keyzer Y, Girard F, Luton JP, Kahn A 1985 - Expression du gène de la proopiomélanocortine en pathologie tumorale chez l'homme. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 46:283.

129- Bardin CW, Shaha C, Mather J, Salomon Y, Margioris AN, Liotta AS, Gerendai I, Chen CL, Krieger DT 1984 - Identification and possible function of proopiomelanocortin derived peptides in the testis. *Ann. NY Acad.Sci* 438:346.

130- De Bold CR, Schwarzer ME, Connor TB, Bird RE, Orth DN 1983 - Ectopic pro-opiomelanocortin: sequence of cDNA coding for beta-melanocyte stimulating hormone and beta-endorphin. *Science* 220:721.

131- de Keyzer Y, Bertagna X, Lenne F, Girard F, Luton JP, Kahn A 1985 - Altered proopiomelanocortin gene expression in adrenocorticotropin producing non-pituitary tumors. *J. Clin. Invest.* 76:1892.

132- Tsukada T, Nakai Y, Jingami H, Imura H, Taii S, Nakanishi S, Numa S 1981 - Identification of the mRNA coding for the ACTH-beta-lipotrophin precursor in a human ectopic ACTH producing tumor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 98:535.

133- Steenbergh PH, Hoppener JWM, Zandberg J, Roos BA, Jansz HS, Lips CJM 1984 - Expression of the proopiomelanocortin gene in human medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:904.

134- Hoppener JWM, Steenbergh PH, Mooren PJJ, Wagenaar SS, Jansz HS, Lips CJM 1986 - Detection of mRNA encoding calcitonin, calcitonin gene related peptide and proopiomelanocortin in human tumors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 47:125.

135- de Keyzer Y, Rousseau-Merck MF, Luton JP, Girard F, Kahn A, Bertagna X 1989 - Pro-opiomelanocortin gene expression in human pheochromocytomas. *J. Mol. Endocrinol.* 2:175

136- Clark AJL, Lavender PM, Besser GM, Rees LH 1989 - Pro-opiomelanocortin mRNA size heterogeneity in ACTH secreting tumours. *J. Mol. Endocrinol.* 2:3.

137- Oates E, Herbert E 1984 - 5' sequence of porcine and rat proopiomelanocortin mRNA. *J. Biol. Chem.* 259:7421.

138- Gagner JP, Drouin J 1985 - Opposite regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription by glucocorticoids and CRH. *Mol. Cell. Endocrinol.* 40:25.

139- Eberwine JH, Jonassen JA, Evinger MJQ, Roberts JL 1987 - Complex transcriptional regulation by glucocorticoids and corticotropin releasing hormone of proopiomelanocortin gene expression in rat pituitary cultures. *DNA* 6:483.

140- Chan JSD, Lu Ch-L, Seidah NG, Chrétien M 1982 - Corticotropin releasing factor (CRF): Effects on the release of pro-opiomelanocortin (POMC)-related peptides by human anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 111:1388.

141- Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ 1982 - Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299:355.

142- Raymond V, Leung PCK, Veilleux R, Labrie F 1985 - Vasopressin rapidly stimulates phosphatidic acid-phosphatidylinositol turn-over in rat anterior pituitary cells. *FEBS Lett* 182:196.

143- Roberts JL, Lundblad JR, Eberwine JH, Freneau RT, Salton SJR, Blum M 1988 - Hormonal regulation of proopiomelanocortin gene expression in the pituitary. *Proc. Ann. NY Acad. Sci.*

144- Roberts JL, Budarf MJ, Baxter JD, Herbert E 1979 - Selective reduction of pro-adrenocorticotropin/endorphin protein and messenger ribonucleic acid activity in mouse pituitary tumor cells by glucocorticoids. *Biochemistry* 18:4907.

145- Nakamura N, Nakanishi S, Sueoka S, Imura H, Numa S 1978 - Effects of steroid hormones on the level of corticotropin messenger RNA activity in cultured mouse-pituitary-tumor cells. *Eur. J. Biochem.* 86:61.

146- Jingami H, Matsukura S, Numa S, Imura H 1985 - Effects of adrenalectomy and dexamethasone administration on the level of prepro-corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamus and adrenocorticotropin/beta lipotropin precursor mRNA in the pituitary in rats. *Endocrinology* 117:1314.

147- Bruhn TA, Sutton RE, Rivier CL, Vale WW 1984 - Corticotropin-releasing factor regulated proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo. *Neuroendocrinology* 39:170.

148- Dallman MF, Makara GB, Roberts JL, Levin M, Blum M 1985 - Corticotropin response to removal of releasing factors and corticosteroids in vivo. *Endocrinology* 117:2190.

149- Heisler S, Reisine TD, Hook VY, Axelrod J 1982 - Somatostatin inhibits multireceptor stimulation of cAMP and corticotropin secretion in mouse pituitary tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6502.

150- Luini A, Lewis D, Guild S, Schofield G, Weight F 1986 - Somatostatin, an inhibitor of ACTH secretion, decreases cytosolic free calcium and voltage-dependent calcium current in a pituitary cell line. *J. Neurosci.* 6:3128.

151- Bertagna X, Favrod-Coune C, Escourolle H, Beuzeboc P, Christoforov B, Girard F, Luton JP 1989 - Suppression of ectopic adrenocorticotropin secretion by the long-acting somatostatin analog octreotide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68:988.

152- Eberwine JH, Jonassen J, Dionne FT, Blum M, Roberts JL 1984 - Catecholamine regulation of POMC gene expression in primary cultures and intact rat anterior and intermediate pituitary lobes. *Program of the 7th International Congress of endocrinology, Quebec City, Quebec, Canada (Abstract 1003).*

153- Chen CL, Dionne FT, Roberts JL 1984 - Regulation of the proopiomelanocortin mRNA level in rat pituitary by dopaminergic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2211.

154- Tomiko SA, Taraskevich PS, Douglas WW 1983 - GABA acts directly on cells of pituitary pars intermedia to alter hormone output. *Nature* 301:706.

155- Petraglia F, Facchinetti F, Martignoni E, Nappi G, Volpe A, Genazzani AR 1984 - Serotonergic agonists increase plasma levels of beta-endorphin and beta-lipotropin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 59:1138.

- 156- Gaillard RC, Grossmann A, Gillies G, Rees LH, Besser GM 1981 - Angiotensin II stimulates the release of ACTH from dispersed rat anterior pituitary cells. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 15:573.
- 157- Matsumura M, Ohura M, Shimizu I, Yamanoi A, Iwasaki, Saito S 1985 - In vivo and in vitro effects of bradykinin on the release of beta-endorphin-like immunoreactivity. *Neuroendocrinology* 41:101.
- 158- Miyazaki K, Reisine T, Keibian JW 1984 - Adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinase activity in rodent pituitary tissue: possible role of cAMP-dependent hormone secretion. *Endocrinology* 115:1993.
- 159- Reisine T, Rougon G, Barbet J, Affolte HU 1985 - Corticotropin-releasing factor-induced adrenocorticotropin hormone release and synthesis is blocked by incorporation of the inhibitor of the cyclic AMP-dependent protein kinase into anterior pituitary cells by liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8261.
- 160- Antakly T, Eisen HJ 1984 - Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in target cells. *Endocrinology* 115:1984.
- 161- Swennen L, Deneff C 1982 - Physiological concentrations of dopamine decrease adenosine 3', 5' monophosphate levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs: evidence for a causal relationship to inhibition of prolactin release. *Endocrinology* 111:398.
- 162- Clark AJL, Stewart MF, Lavender PM, Farrell, Crosby SR, Rees LH, White A 1990 - Defective glucocorticoid regulation of proopiomelanocortin gene expression and peptide secretion in a small cell lung cancer cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78:485.
- 163- Keller-Wood ME, Dallman MF 1984 - Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine rev.* 5:1.
- 164- Roth KA, Newell DC, Dorin RI, Eberwine JH, Hoffman AR 1988 - Aberrant production and regulation of pro-opiomelanocortin derived peptides in ectopic Cushing's syndrome. *Horm. Metab. Res.* 20:225.
- 165- Smith AI, Funder JW 1988 - Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine Rev.* 9:159.
- 166- Chrétien M, Seidah N 1984 - Precursor polyproteins in endocrine and neuroendocrine systems. *Int. J. Pep. Prot. Res.* 23:355.
- 167- Herbert E, Comb M, Seasholtz A, Martin M, Liston D 1986 - Use of gene transfer approaches to study regulation of expression of opioid peptide genes. In: Martin JB, Barchas JD (eds) *Neuropeptides in neurology and psychiatric disease*. Raven Press New York, p.33.

168- Nakanishi S, Inoue A, Kita T, Nakamura M, Chang ACY, Cohen SN, Numa S 1979 - Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278:423.

169- Kawauchi H 1983 - Chemistry of proopiomelanocortin-related peptides in the salmon pituitary. *Arch. Biochem. Biophys.* 227:343.

170- Harwood R 1980 - Protein transfer across membranes: the role of signal sequence and signal peptidase activity. In: Freedman RB, Hawkins HC (eds) *The enzymology of post-translational modifications of proteins*. Academic Press, London, vol. 1:3.

171- Vieau D, Gicquel C, Proeschel MF 1991 - La proopiomélanocortine et ses fragments: application à l'investigation clinique. *Méd. Sci.* 7:918.

172- Bennett HPJ, Seidah N, Benjannet S, Solomon S, Chrétien M 1986 - Reinvestigation of the disulfure bridge arrangement in human pro-opiomelanocortin N-terminal segment (hNT 1-76). *Int. J. Pep. Protein Res.* 27:306.

173- Imura H, Kato Y, Nakai Y, Nakao K, Tanaka I, Jingami H, Koh T, Yoshimasa T, Tsukada T, Suda M, Sakamoto Morii N, Takahashi H, Tojo K, Sugawara A 1985 - Endogeneous opioids and related peptides: from molecular biology to clinical medicine. *J. Endocrinol.* 107:147.

174- Gainer H, Russell JT, Loh YP 1985 - The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicles hypothesis. *Neuroendocrinology* 40:171.

175- Loh YP, Brownstein MJ, Gainer H 1984 - Proteolysis in neuropeptide processing and other neural functions. *Ann. Rev. Neurosci.* 7:189.

176- Graf L, Kennessey A 1981 - Characterization of proteinases involved in the generation of opioid peptides from beta-lipotropin. *Horm. Protein Res.* 10:35.

177- Hook VYH, Mezey E, Fricker LD, Pruss RM, Siegel RE, Brownstein MJ 1985 - Immunochemical characterization of carboxypeptidase B-like peptide-hormone-processing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4745.

178- Gainer H, Russell JT, Loh YP 1984 - An aminopeptidase activity in bovine pituitary secretory vesicles that cleaves the N-terminal arginine from beta-lipoprotein 60-65. *FEBS Lett.* 185:109.

179- Bertagna X, Girard F, Seurin D, Luton JP, Mains RE, Eipper BA 1980 - Evidence for a peptide similar to 16K fragment in man. Its relationship to ACTH. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 51:182.

180- Bertagna X, Seurin D, Pique L, Luton JP, Bricaire H, Girard F 1983 - Peptides related to the NH₂-terminal end of propiocortin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56:489.

181- Vieau D, Massias JF, Girard F, Luton JP, Bertagna X 1989 - Corticotrophin-like intermediary lobe peptide as a marker of alternate pro-opiomelanocortin processing in ACTH-producing non-pituitary tumours. *Clin. Endocrinol.* 31:691.

182- Bertagna X, Lenne F, Comar D, Massias H, Baudin V, Girard F 1986 - Human beta-melanocyte stimulating hormone revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9719.

183- Bertagna X, Seidah N, Massias JF, Lenne F, Luton JP, Girard F, Chrétien M 1989 - Microsequencing evidence for the maturation of human proopiomelanocortin into an 18 amino acid beta-melanocyte stimulating hormone (h beta MSH (5-22)) in nonpituitary tissue. *Peptides* 10:83.

184- Seidah N, Chrétien M 1981 - Complete aminoacid sequence of a human pituitary glycopeptide: an important maturation product of pro-opiomelanocortin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4236.

185- Bennett HPJ, Browne CA, Solomon S 1982 - Characterization of eight forms of corticotropin-like intermediary lobe peptide from the rat intermediary pituitary. *J. Biol. Chem.* 257:10096.

186- Bennett HPJ, Browne CA, Solomon S 1981 - Biosynthesis of phosphorylated forms of corticotropin related peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:4713.

187- Bennett HPJ, Brubaker PL, Seger MA, Solomon S 1983 - Human phosphoserine 31 corticotropin 1-39 isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 258:8108.

188- Eipper BA; Mains RE 1982 - Phosphorylation of pro-adrenocorticotropin/endorphin-derived peptides. *J. Biol. Chem.* 257:4907.

189- Bennett HPJ, Brubaker PL, Seger MA, Solomon S 1983 - Human phosphoserine 31 corticotropin 1-39: isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 258:8108.

190- Fenger M, Johnsen AH 1988 - Alpha-amidated peptides derived from pro-opiomelanocortin in human pituitary tumours. *J. Endocrinol.* 118:239.

191- Bradbury AF, Finnie MDA, Smyth DG 1982 - Mechanisms of C-terminal amide formation by pituitary enzymes. *Nature* 198:686.

192- Eipper BA, Mains RE, Glembotski CC 1983 - Identification in pituitary tissue of a peptide alpha-amidation activity that acts on

glycine-extended peptides and requires molecular oxygen, copper and ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:5144.

193- Seidah NG, Rochemont J, Hamelin J, Benjannet S, Chrétien M 1981 - The missing fragment of the pro-sequence of human pro-opiomelanocortin: sequence and evidence for C-terminal amidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:710.

194- Eipper BA, Park L, Keutmann HT, Mains RE 1986 - Amidation of joining peptide, a major pro-ACTH/endorphin-derived product peptide. *J. Biol. Chem.* 261:8686.

195- Smyth DG, Massey DE, Zakarian S 1979 - Endorphins are stored in biologically active and inactive forms: isolation of alpha-N-acetyl peptides. *Nature* 279:252.

196- Harris JI, Lerner AB 1957 - Amino-acid sequence of the alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Nature* 179:1346.

197- Guttmann S, Biossonnas RA 1961 - Influence of the structure of the N-terminal extremity of alpha-MSH on the melanophore stimulating activity of this hormone. *Experientia* 17:265.

198- Antonini G, Spoto G 1988 - Reversed phase high performance liquid chromatography of adrenocorticotropin 1-39 and its fragments in the native and oxidized forms. *Biochem. International.* 16:1009.

199- Hoshina H, Hortin G, Boime I 1982 - Rat pro-opiomelanocortin contains sulfate. *Science* 217:63.

200- Bourbonnais Y, Crines P 1985 - Post-translational incorporation (³⁵S) sulfate into oligosaccharide side chains of pro-opiomelanocortin in rat intermediate lobe cells. *J. Biol. Chem.* 260:5832.

201- Rosset R, Caude M, Jardy A 1982 - Manuel pratique de chromatographie en phase liquide. Ed. Masson, Paris.

202- Bird IM 1989 - High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *Br. Med. J.* 299:783.

203- Rochette J, Wajcman H 1985 - Application de la chromatographie liquide haute performance à l'isolement et à l'étude des protéines. *L'opéron* XI n°2:27.

204- Strecker H, Hachmann H, Seidel L, Messinger HG, Devillierre N 1981 - Le dosage radioimmunologique (RIA). *Bulletin Behring Biologie*, mars 1981.

205- Hunter WM, Greenwood FC 1962 - Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495.

206- Raux-Demay MC, Proeschel MF, de Keyzer Y, Bertagna X, Luton JP, Girard F 1988 - Characterization of human corticotrophin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin-related peptides in a thymic carcinoid tumour responsible for Cushing's syndrome. *Clin. Endocrinol.* 29:649.

207- Ratter SJ, Lowry PJ, Besser GM, Rees LH 1980 - Chromatographic characterization of adrenocorticotrophin in human plasma. *J. Endocrinol.* 85:359.

208- Hale AC, Besser GM, Rees LH, 1986 - Characterization of pro-opiomelanocortin-derived peptides in pituitary and ectopic adrenocorticotrophin-secreting tumours. *J. Endocrinol.* 108:49.

209- Cromlish JA, Seidah NG, Chrétien M 1986 - Selective cleavage of human ACTH, beta-lipotropin, and the N-terminal glycopeptide at pairs of basic residues by IRCM-Serine Protease 1. *J. Biol. Chem.* 261:10859.

210- Akil H, Ueda Y, Watson SJ 1981 - A sensitive coupled HPLC/RIA technique for separation of endorphins: multiple forms of beta-endorphin in rat pituitary intermediate vs. anterior lobe. *Neuropeptides* 1:429.

211- Bennett HPJ, Browne CA, Solomon S 1981 - Purification of two major forms of rat pituitary corticotropin using only reversed-phase liquid chromatography. *Biochem.* 20:4530.

212- Schöneshöfer M, Fenner AM 1981 - ACTH immunoreactivities predominating in normal human plasma are not attributable to the human ACTH 1-39 molecule. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 102:476.

213- Méchély C 1988 - Etude dans le plasma par HPLC des dérivés de la POMC: ACTH, CLIP et beta-MSH. Mise au point de la technique. Application au syndrome de Cushing. Mémoire de DEA, Université Paris Sud.

214- Coates PJ, Doniach I, Wells C, Hale AC, Rees LH, Besser GM 1989 - Peptides related to alpha-melanocyte-stimulating hormone are commonly produced by human pituitary corticotroph adenomas: no relationship with pars intermedia origin. *J. Endocrinol.* 120:531.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 16
LE SYNDROME DE CUSHING	p. 18
I DEFINITION	p. 19
II HISTORIQUE	p. 19
III DIAGNOSTIC POSITIF	p. 21
A CLINIQUE ET BIOLOGIE COURANTE	p. 21
B DOSAGES HORMONAUX	p. 23
IV DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE	p. 26
A DIAGNOSTIC DE NIVEAU	p. 27
B DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE PRECIS	p.29
PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SECRETION D'ACTH	p. 41
I HISTORIQUE	p. 42
II LE GENE DE LA POMC	p. 44
A STRUCTURE	p. 44
B EXPRESSION	p. 47
C REGULATION	p. 48
III LA PROOPIOMELANOCORTINE	p. 51
A STRUCTURE DE LA POMC	p. 51
B MATURATION PROTEOLYTIQUE DE LA POMC	p. 54
C ACTH ET CLIP	p. 56
D AUTRES MODIFICATIONS POST- TRADUCTIONNELLES	p. 59

IV LES TUMEURS ACTH-SECRETANTES	p. 61
A LES TUMEURS "TYPE ANTEHYPOPHYSE"	p. 62
B LES TUMEURS "TYPE HYPOPHYSE INTERMEDIAIRE"	p. 63
ETUDE DES DERIVES DE L'ACTH DANS LE PLASMA	p. 65
I MATERIEL ET METHODES	p. 66
A CHOIX DES PATIENTS - RECUEIL DES PLASMAS	p. 66
B PURIFICATION DES PLASMAS	p. 68
C CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE	p. 70
D DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE	p. 82
II RESULTATS	p. 93
A RENDEMENTS	p. 93
B PROFIL DES PLASMAS ETUDIES	p. 95
C EFFETS DU CHAUFFAGE	p. 100
D EFFETS DES STIMULATIONS	p. 100
E DETECTION ET CALIBRATION	p. 104
F COMPARAISON "PERIPHERIE - VEINE EFFERENTE"	p. 106
III DISCUSSION	p. 108
A JUSTIFICATION DES METHODES EMPLOYEES	p. 108
B PROFIL DES PLASMAS ETUDIES	p. 112
C APPLICATION AU DIAGNOSTIC DES SYNDROMES DE CUSHING	p. 122
CONCLUSION	p. 129
BIBLIOGRAPHIE	p. 132

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

BON A IMPRIMER N° 67

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME

Le syndrome de Cushing, pathologie rare mais potentiellement grave, reconnaît plusieurs cadres étiologiques. Si le diagnostic positif et la distinction entre les formes ACTH-dépendantes et les formes ACTH-indépendantes ne posent le plus souvent que peu de problèmes, le diagnostic étiologique des formes ACTH-dépendantes (tumeurs antehypophysaires et sécrétion ectopique d'ACTH) est souvent plus difficile. L'ACTH dérive d'un précurseur de haut poids moléculaire, la proopiomélanocortine (POMC), dont dérivent aussi les endorphines, les mélanotropines (MSH) et les lipotropines (LPH). La maturation de la POMC se fait différemment dans l'antehypophyse et dans les autres tissus capables d'exprimer le gène de la POMC. Dans ces derniers l'ACTH est clivée en alpha-MSH et corticotropin-like-intermediary lobe-peptide (CLIP), ce qui n'est pas le cas dans l'antehypophyse. Nous avons mis au point une technique de séparation dans le plasma humain du CLIP et de l'ACTH par chromatographie liquide haute performance en phase inverse, couplée à une reconnaissance par dosage radio-immunologique. Cette technique permet de distinguer de façon fiable et reproductible les patients présentant un syndrome de Cushing par tumeur hypophysaire et ceux présentant une hypersécrétion d'ACTH d'origine ectopique.

Mots clés

- Cushing (syndrome de)
- hormone corticotrope
- plasma humain
- proopiomélanocortine
- chromatographie liquide à haute performance en phase inverse