



Caractérisation morphologique et fonctionnelle des tumeurs corticotropes du chien et du chat

Ghita Benchekroun

► To cite this version:

Ghita Benchekroun. Caractérisation morphologique et fonctionnelle des tumeurs corticotropes du chien et du chat. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2016. Français. NNT : 2016PESC0070 . tel-01556631

HAL Id: tel-01556631

<https://theses.hal.science/tel-01556631>

Submitted on 5 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS EST



Sciences de la Vie et de la Santé

Mention Pathologie et Recherche Clinique

Présentée par

Ghita Benchekroun

Sujet de la thèse :

**CARACTERISATION FONCTIONNELLE ET PHENOTYPAGE DES TUMEURS
CORTICOTROPES DU CHIEN ET DU CHAT**

Soutenue le 15 décembre 2016

Devant le jury composé de :

M. Jimmy Saunders	Rapporteur
M. Lionnel Groussin Rouiller	Rapporteur
M. Jean-Luc Cadoré	Examineur
M. Dan Rosenberg	Directeur de thèse
M. Laurent Tiret	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury :

M Dan Rosenberg ; qui a dirigé ce travail et qui a accepté de superviser cette étape finale malgré ses nouvelles fonctions. Sincères remerciements pour son temps et sa disponibilité.

M Laurent Tiret ; qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire. Sincères remerciements pour la lecture attentive de ce travail malgré un emploi du temps particulièrement chargé.

M Jimmy Saunders et M Lionnel Groussin Rouiller, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail. Sincères remerciements.

M Jean Luc Cadoré, qui a accepté, à l'improviste, de participer à ce jury. Sincères remerciements.

Je tiens également à remercier très chaleureusement tous les membres actuels et passés de l'unité de médecine de l'EnvA : Christelle Maurey, Miguel Campos, Valérie Freiche, Stéphane Blot, Morgane Canonne-Guibert, Virginie Fabres et Maud Ménard. Sincères remerciements pour votre soutien et compréhension tout au long de ces dernières années.

Ce travail est le fruit d'une collaboration entre plusieurs intervenants tous autant passionnés les uns que les autres. En particulier, un grand merci à Pauline de Fornel-Thibaud et à Isabel Rodrigues Pineiro. Merci également à tous ceux qui ont contribué à ce travail et à ma formation: Mike Herrtage, Nicolas Granger, Loic Desquilbet, Dominique Begon, Fouzia Stambouli, Patrick Deveauchelle, Françoise Delisle, Sylvie Daminet, Frederico Fracassi, Olivier Dossin, Benoit Rannou et François Garnier.

Caractérisation fonctionnelle et phénotypage des tumeurs corticotropes du chien et du chat.

La maladie de Cushing résulte du développement de tumeurs hypophysaires corticotropes d'agressivité variable. Cette forme d'hypercorticisme dépendante de l'ACTH se distingue des formes indépendantes de l'ACTH, souvent consécutives à une tumeur surrénalienne. Les outils de distinction entre ces deux formes ainsi que les marqueurs d'agressivité des tumeurs hypophysaires ont été peu documentés ; ils seraient pourtant précieux pour les cliniciens. Un premier objectif, atteint, de notre travail a visé à identifier sur des cohortes cliniquement caractérisées de chiens atteints de syndrome de Cushing, des marqueurs sanguins et morphologiques qui soient distinctifs des deux formes de syndromes de Cushing (concentration plasmatique en ACTH, échographie et examen tomodensitométrique des glandes surrénales). Un second objectif de notre travail a visé à identifier des paramètres cliniques et biologiques susceptibles de refléter l'agressivité des tumeurs corticotropes. Nous avons ainsi montré chez le chien qu'une hypothermie ou une bradycardie peut signer une tumeur de grande taille. Chez le chat, atteint d'adénomes corticotropes généralement agressifs, nous avons démontré que le dosage de la POMC plasmatique est pertinent pour diagnostiquer la maladie de Cushing. La valeur élevée de la concentration plasmatique en POMC chez l'homme, le chien et le chat, a suggéré que ces tumeurs induisent un défaut de maturation de la POMC. L'analyse par western-blot des acteurs protéiques de cette maturation chez le chien a en effet révélé une diminution de la quantité d'enzyme pro-convertase 1/3 au sein des tumeurs corticotropes de grande taille.

Mots clefs : Axe corticotrope, tumeur, endocrinologie, pro-opiomelanocortin, hormone corticotrope ACTH, pro-convertase 1/3

Functional characterization and phenotyping of corticotropic tumors in dogs and cats.

Cushing's disease or hyperadrenocorticism (HAC) is one of the most frequent endocrine diseases in dogs. Most cases are ACTH-dependent HAC and are associated with pituitary tumors of variable aggressiveness. The other form of HAC is known as ACTH-independent. The present work was carried out on cohort of dogs and cats presented with HAC. The first objective of this work was to assess the accuracy of diagnostic investigations (such as adrenal glands ultrasonography, computed tomodensitometry scan of adrenal glands and pituitary gland and basal ACTH measurement) in a large cohort of dogs with HAC and to identify the best thresholds that allow a correct classification of HAC (ACTH dependent vs ACTH independent). The second objective was to demonstrate that some clinical information such as bradycardia or hypothermia reflect the aggressiveness of the pituitary tumor. We also demonstrated that plasma proopiomelanocortin (POMC) concentration was elevated in cats with Cushing's disease. This observation, previously reported in dogs and humans, suggests a physiopathological implication of ACTH loss of maturation in aggressive pituitary tumour. We investigated if proconvertase 1/3 (PC1/3) could be involved in this alteration through western blot detection of POMC, pro-ACTH, ACTH and PC1/3 in corticotropic tumors. This work showed a difference in PC1/3 protein levels between large and small corticotroph tumours, PC1/3 signal being weak to undetectable in large pituitary tumours.

Keywords : Corticotropic, tumor, Endocrinology, Proopiomelanocortin, ACTH, proconvertase 1/3

Laboratoire d'accueil

Groupe de Génétique médicale comparée animé par Laurent Tiret, équipe 10 "Biologie du système neuromusculaire" de l'IMRB, U955 UPEC-EnvA-INSERM-EFS, dirigée par Frédéric Relaix.

Université Paris Est, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex, France.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE MANUSCRIT

ACTH :	<i>AdrenoCorticoTropic Hormone</i> , hormone corticotrope, corticotropine
ADH :	<i>AntiDiuretic Hormone</i> , hormone antidiurétique
ALAT :	ALanine Amino-Transférase
AMP _c :	Adénosine 5' MonoPhosphate cyclique
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger
CYP11A1 :	Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol
CYP11B1 :	11 β -Hydroxylase
CYP11B2 :	Aldostérone synthase
CYP17 :	17 α -Hydroxylase/17,20-lyase
CYP21A2 :	21-Hydroxylase
CRH :	Corticotropin Releasing Hormone, corticolibérine
3 β -HSD :	3 β -Hydroxysteroid Dehydrogénase
EDTA :	acide Ethylène DiamineTétraAcétique
GIP :	Gastric Inhibitory Polypeptide (polypeptide inhibiteur gastrique)
GNAS :	Gène de la sous unité Alpha de la protéine Stimulatrice G
α -MSH :	α -Melanocyte stimulating hormone (hormone mélanotrope)

MC2R : MelanoCortin 2 Receptor

O,p'-DDD: dichloro-1,1(chloro-2 phényl)-2(chloro-4 phényl)-2 éthane, Mitotane

PAL : Phosphatase ALcaline

PC1 : Prohormone convertase 1/3

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (réaction en chaîne par polymérase ou amplification en chaîne par polymérisation)

POMC : Pro-OpioMélanoCortine

PRKAR1A : sous unité régulatrice alpha de la protéine kinase A

Protéines G : Protéines liant le guanosine triphosphate

PTH : ParaTHormone

RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR (PCR inverse)

StAR : Steroidogenic Acute Regulatory protein

T4 : Thyroxine, tetra-iodothyronine

TSH : *Thyroid Stimulating Hormone*, hormone thyroestimulante

USP8 : Ubiquitin-Specific Protease 8

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
----------------------------	----------

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE MANUSCRIT	6
---	----------

TABLE DES MATIERES	8
---------------------------------	----------

TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
--------------------------------------	-----------

INTRODUCTION GENERALE	12
------------------------------------	-----------

1. L'adénohypophyse chez le chien	14
--	-----------

1.1. Anatomie et relations topographiques avec les structures adjacentes	14
--	----

1.2. Origine embryologique et organisation histologique de l'adénohypophyse	16
---	----

1.3. Physiologie des cellules corticotropes de l'adénohypophyse	18
---	----

1.4. Physiopathologie tumorale des cellules corticotropes hypophysaires	26
---	----

2. La glande corticosurrénale chez le chien.....	34
---	-----------

2.1. Structure générale et fonctions de la glande corticosurrénale	34
--	----

2.2. Physiologie des glandes corticosurrénales	36
--	----

2.3. Pathogénie tumorale des cellules du cortex surrénalien	43
---	----

3. Hypercorticisme spontané ou syndrome de Cushing chez le chien.....	46
--	-----------

3.1. Classification des différentes formes d'hypercorticisme chez le chien	48
--	----

3.2. Epidémiologie et manifestations cliniques de l'hypercorticisme	50
---	----

3.3. Diagnostic de l'hypercorticisme et de son origine	59
--	----

3.4.	Traitement de l'hypercorticisme	80
4.	Hypercorticisme spontané chez le chat.....	90
4.1.	Classification des différentes formes d'hypercorticisme chez le chat	90
4.2.	Epidémiologie et manifestations cliniques de l'hypercorticisme spontané chez le chat ____	91
4.3.	Diagnostic de l'hypercorticisme et de son origine	93
4.4.	Traitement de l'hypercorticisme	98
OBJECTIFS DU TRAVAIL		100
RESULTATS		103
1.	Différenciation des deux formes de syndrome de Cushing décrites chez le chien par des critères biologiques et morphologiques	103
1.1.	Introduction	103
1.2.	Critère biologique : dosage de l'ACTH plasmatique	103
1.3.	Critères morphologiques : examens d'imagerie des glandes surrénales	111
2.	Analyse prédictive de l'agressivité des tumeurs hypophysaires lors de syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH	134
2.1.	Introduction	134
2.2.	Utilité diagnostique de la température corporelle et de la fréquence cardiaque pour la différenciation des formes agressives de tumeur hypophysaire chez le chien	134
2.3.	Intérêt du dosage plasmatique des précurseurs de l'ACTH pour la détection des adénomes hypophysaires de grande taille chez le chien et chez le chat	154
2.4.	Etude de la maturation de l'ACTH lors des tumeurs corticotropes chez le chien	164

DISCUSSION GENERALE	184
1. Optimisation du diagnostic étiologique de l'hypercorticisme par des examens d'imagerie médicale et biologiques	184
1.1. Optimisation du diagnostic étiologique par des outils biologiques	184
1.2. Optimisation du diagnostic étiologique par examens d'imagerie	186
2. Validation chez le chat d'un dosage de précurseurs de l'ACTH : intérêt et implication	190
3. Mécanisme pathologique des tumeurs corticotropes agressives et maturation de la POMC : un rôle de la proconvertase 1/3 ?	192
CONCLUSION	195

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Représentation schématique d'une section sagittale médiale de l'hypophyse.

Figure 2 : Intervention des facteurs de transcription au cours de l'organogenèse hypophysaire chez la souris.

Figure 3 : Contrôle de l'axe corticotrope.

Figure 4 : Maturation de la pro-opiomelanocortine.

Figure 5 : Maturation de la POMC par l'action des proconvertases 1 et 2. Les chiffres 1 à 7 indiquent l'ordre des différents clivages.

Figure 6 : Représentation schématique d'une glande surrénale.

Figure 7 : Voies de synthèse des hormones stéroïdiennes par le cortex surrénalien chez le chien.

Figure 8 : Représentation schématique de l'axe corticotrope en situation saine ou pathologique.

Figure 9 : Représentation de la concentration en POMC/pro-ACTH en fonction de la taille de l'hypophyse.

INTRODUCTION GENERALE

En 1932, le Dr Harvey Cushing décrivit les signes cliniques collectés auprès de 12 patients atteints d'un « basophilisme pituitaire » (1). Ces patients présentaient des adénomes hypophysaires et des manifestations cliniques d'hypercorticisme.

La constellation des manifestations cliniques et biologiques résultant d'un excès en glucocorticoïdes est décrite par le terme de **Syndrome de Cushing**. Le terme "maladie" de Cushing est réservé aux seuls cas d'excès de glucocorticoïdes (i.e. hypercortisolisme) secondaires à une sécrétion excessive et non contrôlée par l'hypophyse d'hormone corticotrope (ACTH), telle qu'initialement décrite par Harvey Cushing. Depuis, d'autres causes d'hypercorticisme ont été identifiées et incluent :

- la sécrétion autonome de glucocorticoïdes par une tumeur surrénale (adénome ou adénocarcinome),
- la conséquence d'un excès exogène en glucocorticoïdes (hypercorticisme iatrogène),
- la sécrétion ectopique d'ACTH (2-4),
- la sécrétion de cortisol modulée par l'alimentation (5),
- l'hyperplasie hypophysaire secondaire à un excès de corticolibérine (CRH) d'origine ectopique, cette dernière cause étant rarement décrite chez l'homme (6) et jamais encore décrite chez le chien ou le chat.

De nombreuses espèces animales peuvent développer un syndrome de Cushing (chat, furet, cheval...) mais c'est le chien qui sans nul doute et de très loin, est le plus représenté (des cas ont été répertoriés dès 1939) (7).

L'introduction de ce manuscrit aborde la physiologie et la physiopathologie d'une part de l'adénohypophyse, en particulier celles des cellules corticotropes et d'autre part, celles du cortex surrénalien. Puis, l'état des connaissances actuelles sur l'hypercorticisme spontané des carnivores domestiques est synthétisé, d'abord chez le chien puis chez le chat.

1. L'adénohypophyse chez le chien

L'adénohypophyse, ou hypophyse antérieure, est une structure endocrine complexe qui intervient dans des fonctions très diverses par le biais de sept hormones qu'elle synthétise et excrète. Elle agit en particulier sur les glandes surrénales, la glande thyroïde, les gonades, le foie, la peau et le tissu mammaire.

1.1. Anatomie et relations topographiques avec les structures adjacentes

L'hypophyse se trouve dans le prolongement de la face ventrale du diencephale. Elle occupe une gouttière transversale creusée dans la partie postérieure de la face crâniale de l'os basisphénoïde appelée selle turcique ou encore fosse sphénoïdale. Sa taille est très variable d'une race à l'autre mais également d'un individu à l'autre au sein d'une même race (8).

La glande hypophysaire est divisée en deux protubérances : l'adénohypophyse et la neurohypophyse. L'adénohypophyse, composée d'un parenchyme glandulaire largement vascularisé, apparaît rougeâtre en comparaison avec la neurohypophyse. En coupe médiane, le complexe hypothalamo-hypophysaire apparaît subdivisé (Figure 1). L'hypophyse est suspendue à l'hypothalamus par la tige pituitaire, prolongement de l'éminence médiane appelé *infundibulum* (8). Cette structure constitue la partie proximale de la neurohypophyse. Ainsi, dorsalement, la glande hypophysaire est recouverte par l'hypothalamus qui est lui-même divisée en deux régions, une rostrale contenant les noyaux paraventriculaires et supraoptiques et l'autre intermédiaire contenant les noyaux du tuber.

Ventro-latéralement, l'adénohypophyse repose sur la neurohypophyse et comprend trois parties. La *pars proximalis* (ou *tuberalis*) s'enroule autour de l'éminence médiane. La *pars*

intermedia juxtapose la neurohypophyse. La *pars distalis* est la partie la plus volumineuse (Figure 1).

L'hypophyse est largement vascularisée. Elle est entourée par les sinus caverneux latéralement et caudalement par le sinus intercaverneux. Rostralement, se trouve le sinus sphénoïde qui est virtuel chez le chien et qui est remplacé par de l'os spongieux.

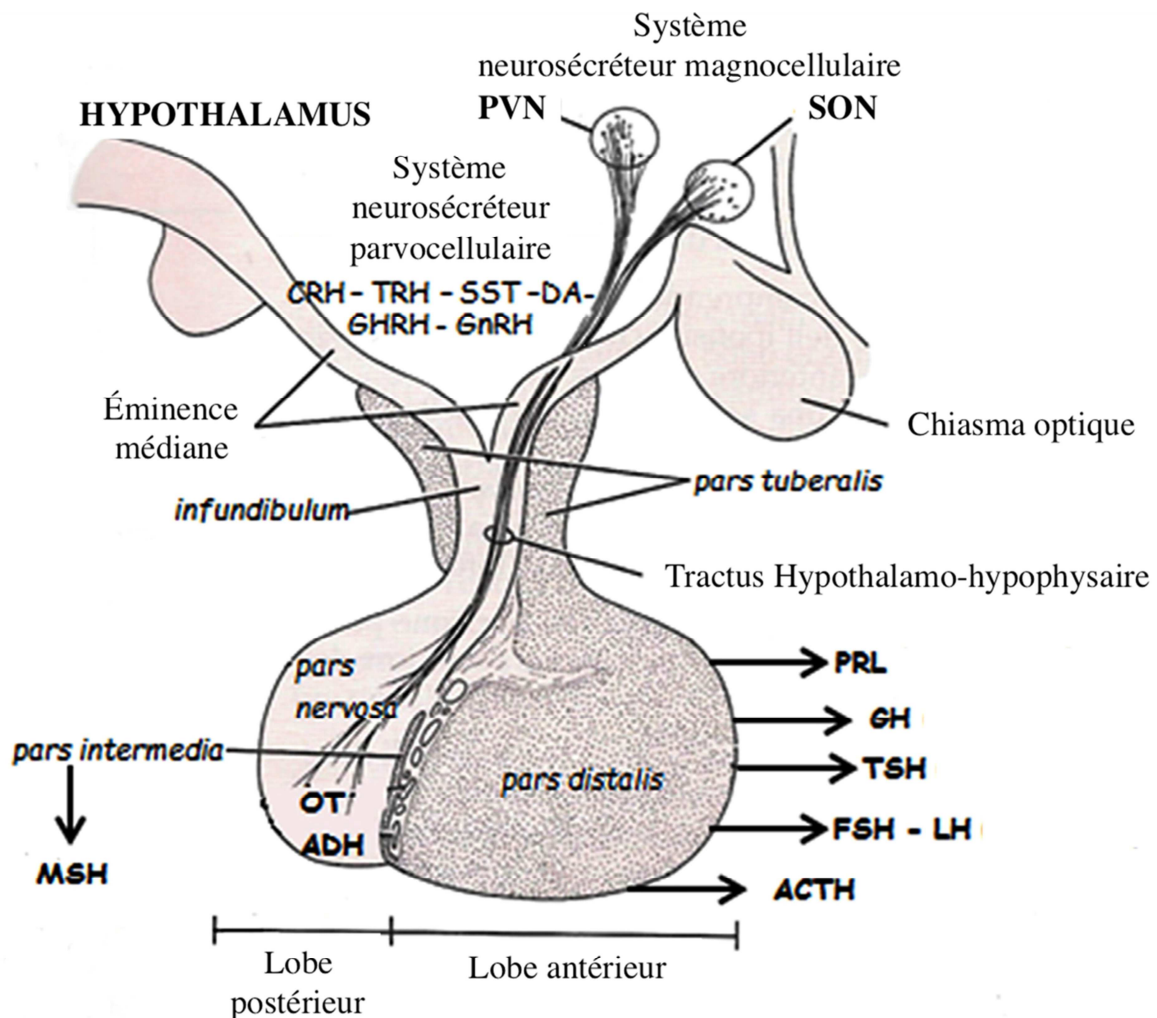


Figure 1 : Représentation schématique d'une section sagittale médiale de l'hypophyse. On note les différentes parties (adénohypophyse divisée en *pars proximalis*, *pars distalis* et *pars intermedia* et neurohypophyse) ainsi que l'extension des fibres nerveuses issues des corps

cellulaires des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus au sein de la neurohypophyse (d'après (9)).

1.2. Origine embryologique et organisation histologique de l'adénohypophyse

L'hypophyse possède une origine embryologique double. L'adénohypophyse dérive de la poche de Rathke (structure ectodermique de la cavité buccale) alors que la neurohypophyse dérive du diencéphale (origine neuro-ectodermique) (8). La poche de Rathke s'étend caudalement et forme une poche détachée des structures buccales qui forme ensuite la partie antérieure de l'hypophyse. La partie antérieure de la crête neurale donne naissance aux lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse. L'hypothalamus et le lobe postérieur de l'hypophyse se développent à partir de la plaque neurale adjacente.

Au cours de l'embryogenèse, cinq types cellulaires adénohypophysaires se différencient : les cellules dites à POMC (corticotropes et mélanotropes), les cellules thyroïdiques, les cellules somatotropes, les cellules lactotropes et les cellules gonadotropes. Chaque type cellulaire est singulier, en particulier avec une fonction de sécrétion qui lui est propre. Ces cinq types sont représentés au sein la *pars distalis* de l'adénohypophyse alors que la *pars intermedia* est composé de cellules mélanotropes (cellules A) et corticotropes (cellules B) (10).

Les mécanismes de différenciation des types cellulaires sont contrôlés par des gènes codant pour des facteurs de transcription dont l'expression au cours de l'embryogenèse permet in fine d'aboutir aux cinq types de cellules spécialisées. Ces facteurs de transcription interviennent de manière progressive au cours de la différenciation cellulaire. D'après des études sur l'organogenèse hypophysaire de la souris, les plus précocement exprimés incluent les

homéogènes *Pitx1,2* et *Lhx3,4*, relayés au cours de l'embryogenèse par d'autres facteurs de transcription ou morphogènes qui interviennent en cascade (*Isl1*, *Prop1*, *Shh*, *BMP*, *Pit1*, *Tbx19*, *SF-1*, *Hex-1*, *Six*, *Pax6*...). Leur action séquentielle et combinée aboutit au développement de l'ensemble des cellules antéhypophysaires (figure 2) (9; 11-13).

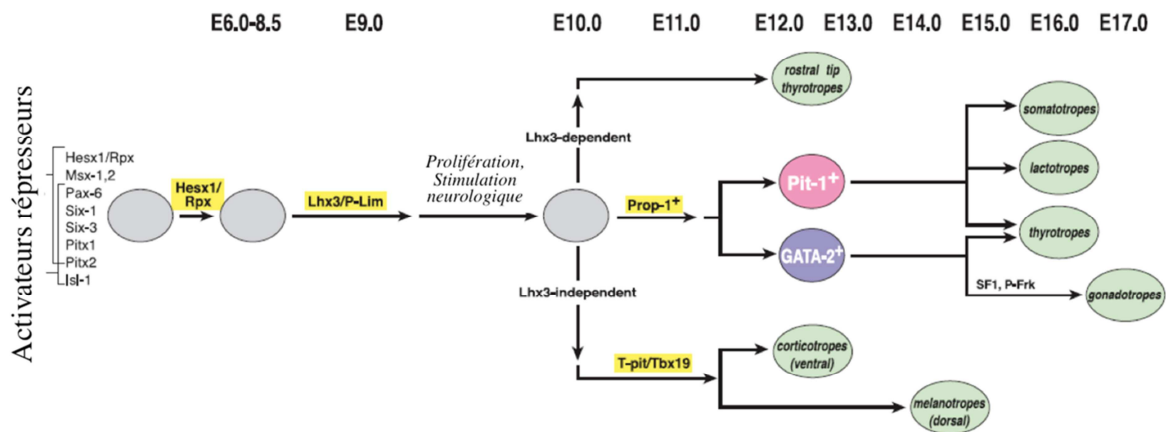


Figure 2 : Intervention des facteurs de transcription au cours de l'organogenèse hypophysaire chez la souris. L'âge embryonnaire est indiqué en jours embryonnaires (E6-E8.5 à E17). De nombreux facteurs de transcription et cofacteurs régulent l'engagement des cellules progénitrices vers les lignées cellulaires spécifiques et leur différenciation terminale (d'après (9; 13)).

Les cinq types cellulaires décrits précédemment peuvent être identifiés lors de l'examen histologique de l'hypophyse. En fonction de leur coloration, ces cellules sont réparties en trois groupes : les cellules chromophobes (ne fixant pas la coloration, sans activité sécrétrice), les cellules chromophiles acidophiles (fixant les colorants acides, composées des cellules somatotropes et lactotropes) et les cellules chromophiles basophiles (fixant les colorants basiques, composées des cellules corticotropes, mélanotropes, thyrotropes et gonadotropes). Ces trois types de cellules sont représentés dans la *pars distalis* alors que la *pars intermedia*

comporte des cellules chromophobes et basophiles et que la *pars proximalis* (ou *tuberalis*) ne comporte que des cellules chromophobes.

1.3. Physiologie des cellules corticotropes de l'adénohypophyse

1.3.1. Présentation de l'axe corticotrope

Schématiquement, l'axe corticotrope correspond à l'association des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, des cellules corticotropes du lobe antérieur (*pars distalis*) de l'adénohypophyse et du cortex surrénalien. Cependant, chez le chien, un autre axe mettant en jeu la partie intermédiaire (*pars intermedia*) de l'adénohypophyse doit être pris en considération (14). (Figure 3).

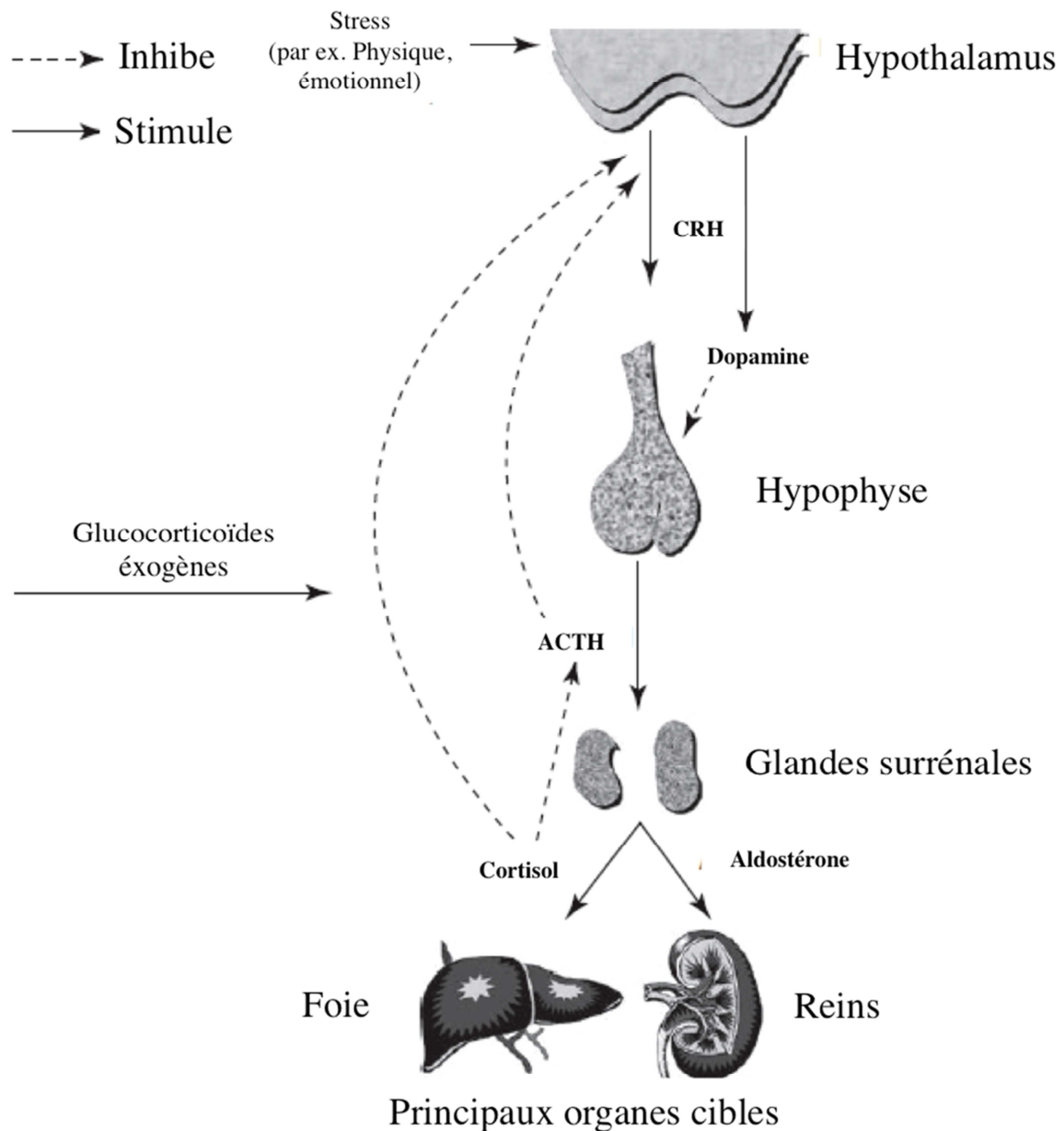


Figure 3 : Contrôle de l'axe corticotrope. De manière schématique, les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus libèrent la CRH (Corticotropin Releasing Hormone, corticolibérine). La CRH stimule la synthèse et la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes de l'hypophyse antérieure alors que la dopamine inhibe la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes du lobe intermédiaire. Les principales cibles de l'ACTH sont les zones fasciculée et réticulée des glandes surréaliennes qui sécrètent principalement le

cortisol parmi de nombreux autres stéroïdes. A son tour, le cortisol exerce un rétrocontrôle négatif renforcé sur la sécrétion de CRH et de l'ACTH ; d'après (15).

L'hypothalamus et la sécrétion de corticolibérine (CRH)

Les corps cellulaires des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus synthétisent la corticolibérine (ou CRH). Elle est transportée par les neurones sécréteurs vers le premier réseau capillaire du système porte hypophysaire où elle est excrétée. Les veines portes hypophysaires transportent la CRH vers le second réseau capillaire du système porte hypophysaire qui assure son transport jusqu'aux cellules corticotropes du lobe antérieur de l'adénohypophyse qu'elle stimule après fixation à des récepteurs membranaires spécifiques, les CRHRs. La CRH est un polypeptide de 41 acides aminés dont la durée de demi-vie plasmatique est d'environ 60 minutes.

Chez l'homme, la sécrétion d'ACTH est également stimulée par la vasopressine (ADH, hormone antidiurétique) tandis qu'elle est inhibée par l'ocytocine et les efférences en provenance de l'hippocampe (16). Chez le chien, une action conservée de l'ADH, de l'angiotensine II et de l'ocytocine sur le contrôle de l'axe corticotrope n'a pas été démontrée (17).

Les noyaux arqués de l'hypothalamus contiennent également les corps cellulaires de neurones qui se projettent vers le lobe intermédiaire et sécrètent la dopamine, une catécholamine dont les récepteurs D2 sont exprimés chez l'homme par les cellules corticotropes (18). La dopamine inhibe la synthèse et la sécrétion d'ACTH, ainsi que celle de la prolactine (19; 20). Chez le chien, la sécrétion de CRH stimule également la sécrétion d'ACTH par le lobe intermédiaire (14).

L'hypophyse et la sécrétion de corticotropine (ACTH)

L'ACTH est un polypeptide composé de 39 acides aminés. Cette hormone est une des hormones dérivées de la protéine POMC (pro-opiomélanocortine), aux fonctions pléiotropes. En réponse à la stimulation par la CRH, les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'adénohypophyse sécrètent l'ACTH par clivage de la POMC (*cf.* partie 1.3.2).

La glande hypophysaire du chien a la particularité d'avoir un lobe intermédiaire très développé : il possède deux types de cellules, les cellules A (prédominantes) et les cellules B qui expriment toutes deux la POMC (21). La POMC est transformée majoritairement en α -MSH (α -Mélanocyte Stimulating Hormone) par les cellules A et en ACTH par les cellules B.

Les cellules B du lobe intermédiaire possèdent les particularités suivantes :

- Elles sont les seules à être stimulées par la CRH (22).
- Leur capacité de sécréter l'ACTH est inhibée par la dopamine hypothalamique (22; 23).
- Leur capacité de sécréter l'ACTH n'est pas influencée par les glucocorticoïdes (22).

La CRH stimule la synthèse et la libération d'ACTH de manière pulsatile. Chez l'homme, la sécrétion de cortisol est soumise à un rythme circadien spontané. La valeur maximale des pics de sécrétion pulsatile est atteinte en fin de période nocturne, produisant un pic circulant au petit matin. Chez le chien, des données contradictoires s'opposent. La plupart des auteurs rejette tout rythme circadien (24). Une étude récente rapporte une concentration plasmatique en ACTH plus élevée l'après-midi en comparaison avec le milieu de matinée (25). La

sécrétion d'ACTH est avant tout épisodique et pulsatile chez les chiens sains ou atteints d'hypercorticisme (20; 24). La sécrétion d'ACTH est stimulée par le repas, la douleur, le stress, les traumatismes, l'hypoxie, l'hypoglycémie, le froid et toute maladie chronique... Ces stimulations passent par l'intermédiaire de la stimulation de la CRH et de la vasopressine et elles sont à l'origine de variations importantes de l'ACTH et donc du cortisol sanguin au cours de la journée (15).

Enfin, la sécrétion d'ACTH est contrôlée par plusieurs rétrocontrôles. Un rétrocontrôle négatif est exercé par le cortisol lui-même par l'intermédiaire de récepteurs aux glucocorticoïdes exprimés par les neurones des noyaux paraventriculaires et les cellules corticotropes. La fixation du cortisol à ces récepteurs agit de manière rapide, intermédiaire et retardée en entraînant une diminution de la transcription des gènes exprimant la CRH et l'ACTH. De plus, l'ACTH exercerait un rétrocontrôle négatif sur sa propre production en inhibant la sécrétion de CRH (rétrocontrôle court) (16). Enfin, le cortisol exercerait un rétrocontrôle sur les neurones de l'hippocampe *via* son récepteur membranaire (26; 27).

1.3.2. Maturation de la pro-opiomélanocortine (POMC) et synthèse d'ACTH

Le gène de la POMC est principalement exprimé au sein des lobes antérieurs et intermédiaires de l'hypophyse. Cependant, l'ARNm a également été détecté au sein d'autres organes tels que le cerveau, les nœuds lymphatiques, la peau, le placenta ou la glande thyroïde. Après traduction, la maturation de la POMC est spécifique de chaque tissu concerné (28). Nous nous intéresserons principalement à la maturation de la POMC dans les cellules hypophysaires.

La POMC est exprimée au sein des lobes antérieurs et intermédiaires. C'est un peptide de 267 acides aminés chez l'homme et 265 acides aminés chez le chien. Dans le lobe antérieur, elle est produite par les cellules corticotropes et dans le lobe intermédiaire par les cellules mélanotropes. Au sein des cellules hypophysaires corticotropes qui sécrètent l'ACTH, la POMC est synthétisée et clivée en fragments plus petits et biologiquement actifs : l'ACTH, la β -lipotropin (β -LPH) et le fragment N-terminal (Figure 4). Une partie de l'ACTH est dégradée en peptides plus petits : la α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), et le CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide). Une partie de la β -LPH est, elle, clivée en β -endorphine.

Au sein des cellules mélanotropes du lobe intermédiaire, l'ACTH est clivé en α -MSH et CLIP alors que toute la β -LPH produite est clivée en β -endorphine et γ -LPH ; cette dernière pouvant être clivée en β -MSH (28).

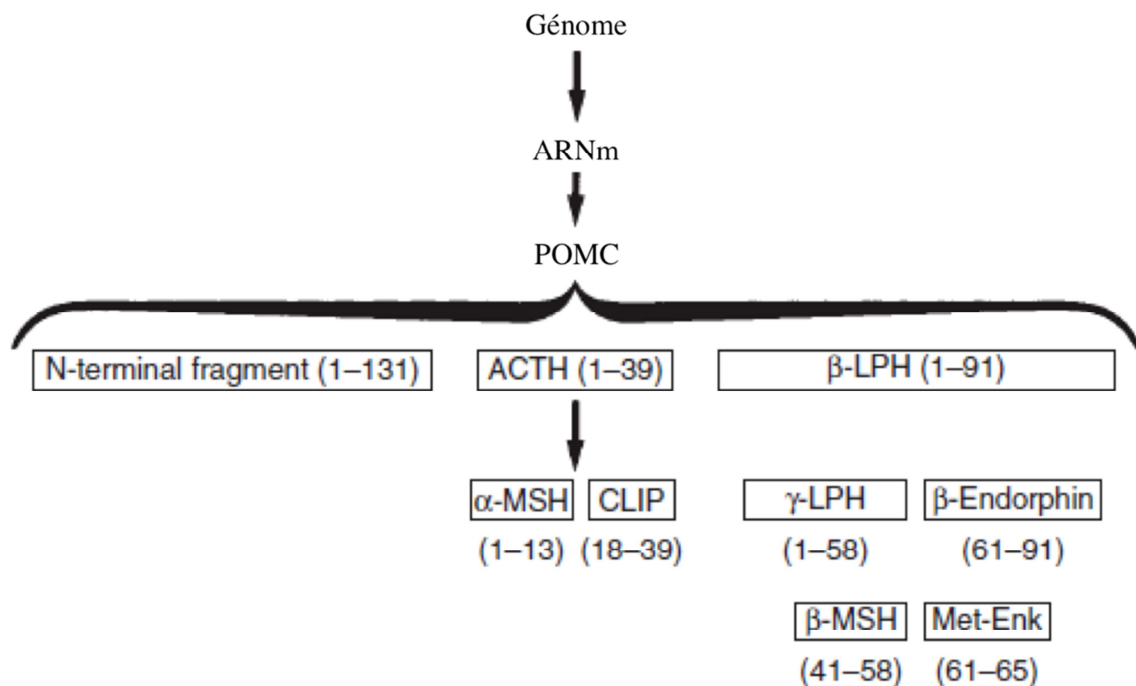


Figure 4 : Maturation de la pro-opiomelanocortine. Le clivage de la POMC libère des hormones biologiquement actives (ACTH, lipotropin (LPH), melanocyte stimulating hormone (MSH), CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide).

Ces différentes étapes de maturation sont assurées par deux enzymes appartenant à la famille des protéases. Les deux protéases concernées sont les proconvertases 1 (PC1) et 2 (PC2) (Figure 5). PC1 est majoritairement exprimée dans le lobe antérieur. Son activité protéolytique limitée conduit à la production d'ACTH majoritairement. Au sein du lobe intermédiaire, PC1 et PC2 sont présentes et leurs actions conduisent à la formation des peptides de plus petite taille.

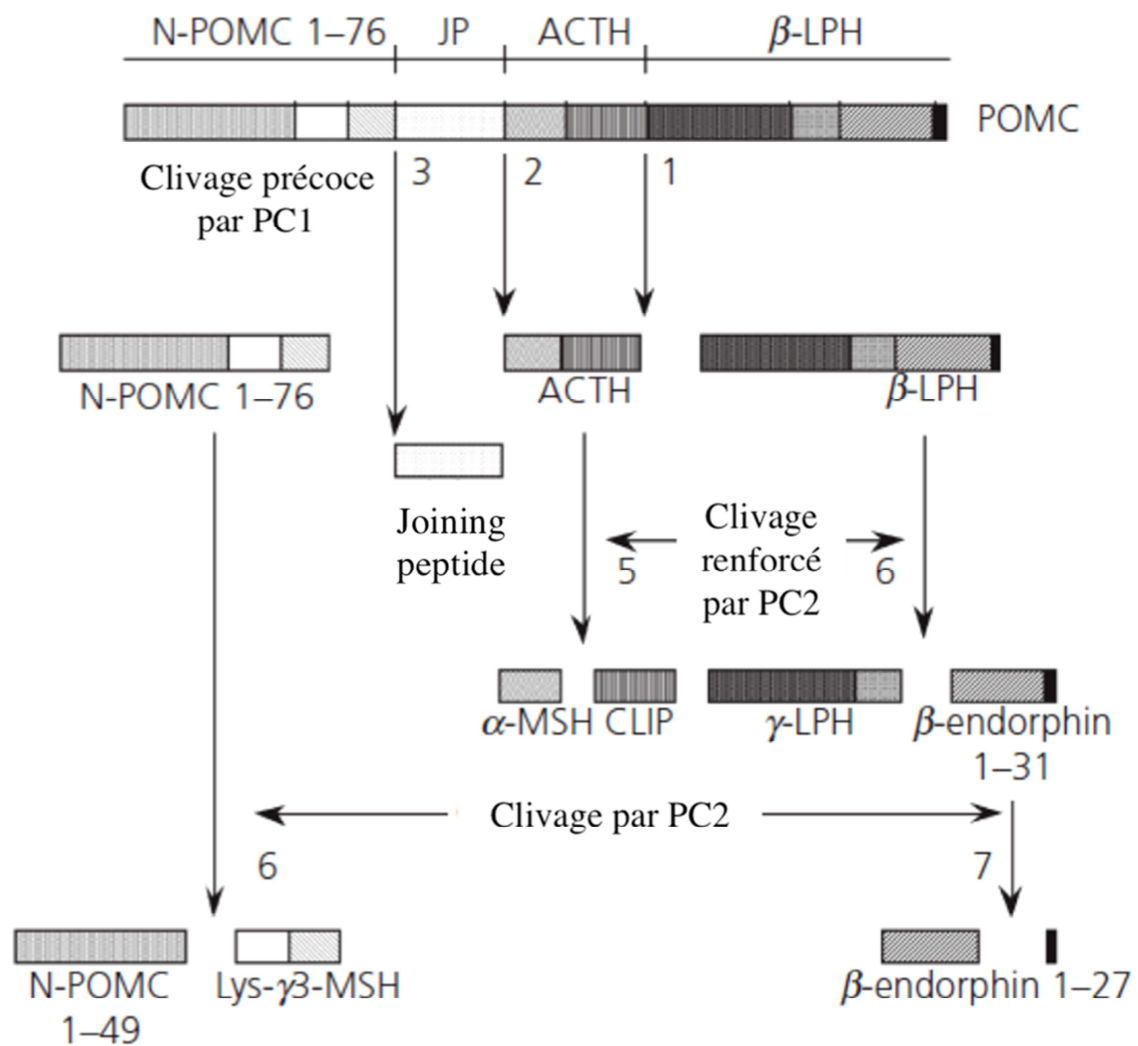


Figure 5 : Maturation de la POMC par l'action des proconvertases 1 et 2. Les chiffres 1 à 7 indiquent l'ordre des différents clivages.

1.3.3. Effets biologiques de l'hormone corticotrope (ACTH)

L'ACTH est un peptide de 39 acides aminés dont la partie amino-terminale (acides aminés 1 à 18) est responsable de son activité biologique. La fonction principale de l'ACTH est de

stimuler la sécrétion de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien, son action sur les sécrétions d'aldostérone et de stéroïdes sexuels est minime. Sa demi-vie plasmatique est courte, d'environ 10 minutes.

1.4. Physiopathologie tumorale des cellules corticotropes hypophysaires

1.4.1. Lésions adénohypophysaires associées à la maladie de Cushing chez le Chien

Chez le chien atteint de maladie de Cushing, l'hypersécrétion anormale d'ACTH est à l'origine d'un excès de sécrétion de cortisol et d'une hyperplasie corticosurrénalienne. Dans ce cas, le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur la sécrétion d'ACTH n'est pas effectif. Quatre-vingt à 85% des cas d'hypercorticisme dans l'espèce canine ont pour origine les cellules corticotropes de l'hypophyse, siège d'un processus tumoral ou hyperplasique (15; 29). Selon certains auteurs, la grande majorité des cas seraient dus à des tumeurs hypophysaires bénignes (15) alors que l'hyperplasie hypophysaire ou les carcinomes hypophysaires sécrétants seraient rares (30). Chez le chien, les tumeurs hypophysaires à l'origine d'un hypercorticisme peuvent se développer dans le lobe antérieur (*pars distalis*, 80%) ou dans le lobe intermédiaire (*pars intermedia*, 20%) (14; 31). Trois types cellulaires peuvent être touchés : les cellules hypophysaires du lobe antérieur, les cellules A du lobe intermédiaire ou les cellules B du lobe intermédiaire. Cette distinction n'a cependant aucun impact sur les manifestations cliniques de la maladie.

Plus précisément, les adénomes hypophysaires peuvent être de petite taille (microadénome hypophysaire). Il s'agit du cas le plus fréquent (80 à 85 % des tumeurs hypophysaires). Le

terme macroadénome (10 à 15% des tumeurs hypophysaires) est réservé aux tumeurs de grande taille. Chez le chien, les critères de distinction sont variables. Si le seuil de un cm (utilisé chez l'homme) a longtemps été utilisé, ce critère est remis en cause du fait de la variabilité de taille de l'encéphale d'une race à l'autre et de la possibilité de signes nerveux lors de tumeur hypophysaire de taille comprise entre cinq et 10 mm (32). Le rapport de la hauteur de la glande hypophysaire sur l'aire de l'encéphale est alternativement utilisé (33-36; 36).

1.4.2. Proposition d'un modèle de tumorigenèse des cellules corticotropes

L'étiologie de l'hypercorticisme spontané d'origine hypophysaire reste imprécise et deux principaux mécanismes sont classiquement proposés de manière purement théorique. L'un, le plus solide, met en jeu un phénomène d'induction tumorale hypophysaire (théorie monoclonale, i.e. mutation somatique d'une unique cellule corticotrope hypophysaire entraînant son expansion clonale) et l'autre impliquerait un dysfonctionnement hypothalamique (théorie polyclonale, i.e. excès de CRH entraînant une hyperplasie hypophysaire corticotrope) (37).

L'observation, dans quelques cas, d'une double atteinte hypophysaire (lobe antérieur et intermédiaire) suggère une origine hypothalamique à l'origine d'une sécrétion excessive de CRH et diminuée de la dopamine (14).

Malgré ces arguments, force est de constater que chez l'homme, la résection chirurgicale d'une tumeur hypophysaire corticotrope entraîne une normalisation des sécrétions d'ACTH et de cortisol et montre même un déficit transitoire de ces hormones. Cette observation va à

l'encontre de l'existence d'une origine hypothalamique. En effet, le développement d'une tumeur hypophysaire semble plutôt primaire et non pas secondaire à un excès de CRH ou à un déficit en dopamine (38). En effet, la plupart des tumeurs hypophysaires sont monoclonales chez l'homme (39). De plus, la concentration en CRH mesurée dans le liquide cérébro-spinal de chiens atteints de maladie de Cushing était significativement plus basse que celle mesurée chez des chiens sains laissant supposer un rétrocontrôle court efficace, par l'ACTH mais également par excès de cortisol (40). Enfin, 77% des chiens ne présentent pas de rechute suite à l'exérèse chirurgicale de l'adénome hypophysaire (41).

Chez l'homme, des oncogènes ainsi que des gènes suppresseurs de tumeur ont été identifiés comme participant à la tumorigenèse hypophysaire mais la pathogenèse exacte n'a pas été identifiée. Cependant, des études récentes ont montré que le gène Ubiquitin Specific Protease 8 (USP8) était fréquemment muté dans les adénomes corticotropes (42; 43). Ce gène code pour une protéine avec une activité deubiquitinase qui inhibe la dégradation lysosomale du récepteur au facteur de croissance épithéliale (EGFR). La mutation du gène USP8 entraîne une augmentation de la stabilité du récepteur EGFR, promouvant ainsi la transcription de POMC induite par EGFR et donc la sécrétion d'ACTH (43). Chez le chien, la tumorigenèse des tumeurs corticotropes a été peu analysée (44; 45).

Certaines données cliniques sont en faveur d'un lien entre l'agressivité de la tumeur et la baisse de la sensibilité des cellules corticotropes au rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes. Ainsi, Kooistra et ses collaborateurs ont montré que plus la tumeur est agressive (i.e. de grande taille), moins le freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone est efficace (35). Les mêmes observations ont été décrites en 2002 (46) et les auteurs ont conclu que la diminution de la perte de sensibilité des cellules corticotropes au rétrocontrôle négatif

exercé par les glucocorticoïdes jouerait un rôle fondamental dans la croissance des adénomes hypophysaires. Selon eux, la concentration en précurseurs de l'ACTH serait corrélée à la taille de l'adénome hypophysaire. Cette donnée a été confirmée en 2005 par l'équipe de Dan Rosenberg (34). Dans ce travail, 36 chiens étaient inclus dont quatorze qui présentaient une tumeur hypophysaire de grande taille alors que 22 présentaient une tumeur hypophysaire de petite taille. Avec un seuil de concentration sanguine des précurseurs de l'ACTH (POMC/Pro-ACTH) établi à 35 pmol/l, la sensibilité et la spécificité de ce dosage étaient respectivement de 93% et 86% dans la détection d'une tumeur de grande taille.

Plus récemment, les mécanismes moléculaires de la tumorigenèse hypophysaire ont été étudiés au sein de tumeurs corticotropes canines.

Dans une première étude, l'expression des gènes relatifs à la production de l'ACTH, à sa sécrétion et au rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur la sécrétion d'ACTH par l'adénohypophyse a été étudiée (47). L'expression des transcrits des gènes codant la POMC, le récepteur 1 à la CRH (CRHR1), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) et la 11 β -hydroxysteroid déshydrogenase de types 1 et 2 a été analysée et comparée au sein de 10 adénomes hypophysaires et de cellules corticotropes saines. Les cellules corticotropes saines ont été obtenues suite à la microdissection de l'hypophyse antérieure après immunomarquage des cellules corticotropes par l'ACTH. En comparaison avec des cellules corticotropes saines, la quantité d'ARNm des gènes *POMC*, *CRHR1* et *11HSD2* était augmentée de façon significative d'un facteur quatre à cinq dans les cellules corticotropes adénomateuses, tandis qu'elle ne variait pas pour le *GR* et était réduite pour *MR* et *11HSD1*. Outre que ces modifications d'expression pourraient induire la croissance de l'adénome hypophysaire corticotrope, elles pourraient également aider à

comprendre la moindre réponse chez le chien des adénomes hypophysaires au rétrocontrôle négatif exercée par les glucocorticoïdes et la sécrétion continue d'ACTH qui en découle malgré ce rétrocontrôle. En effet, la 11HSD2 transforme le cortisol actif en cortisone inactive tandis que la 11HSD1 induit la transformation inverse. Ainsi, une concentration intracellulaire élevée de la 11HSD2 concomitante d'une baisse de la 11HSD1 favoriserait l'inactivation du cortisol au sein des cellules tumorales.

Chez l'homme, les mécanismes de la résistance des adénomes hypophysaires corticotropes aux glucocorticoïdes sont étudiés (48). Dans 50% des adénomes, l'arrêt de l'expression nucléaire de 2 protéines (BRG1 Brahma Related Gene 1 et HDAC 2 Histone Deacetylase 2) jouant un rôle essentiel de transrepression du récepteur au glucocorticoïde, a été mis en évidence. La perte d'expression de BRG1 s'associe à une surexpression de la cycline E et à une perte de p27^{kip1}, protéine de régulation du cycle cellulaire. Il a déjà été observé que la surexpression de la cycline E ainsi que la perte de p27^{kip1} ont un effet synergique sur le modèle murin entraînant la croissance d'adénome plus gros et plus agressif plus rapidement. Un autre régulateur de p27^{kip1}, Cables1, a récemment été mis en évidence comme dépendant des glucocorticoïdes et perdu dans 55% des adénomes corticotropes lors de maladie de Cushing. Cables 1 semble être un régulateur essentiel de la prolifération corticotrope inactif lors de maladie de Cushing et faisant le lien entre prolifération et résistance aux glucocorticoïdes (49).

Une deuxième étude, chez le chien, s'est intéressée au facteur de transcription T-PIT (TBX19) qui est un marqueur des cellules corticotropes et mélanotropes, nécessaire à l'expression du gène *POMC*. Ce facteur est exprimé au sein des cellules normales et tumorales de l'adénohypophyse. Une recherche de mutation dans la phase codante de ce gène candidat dans

14 adénomes hypophysaires canins a été infructueuse (50), ce qui ne l'exclut pas définitivement de la liste des gènes candidats dans d'autres tumeurs ou dans ces tumeurs via des mutations non recherchées dans les séquences régulatrices.

Dans une autre étude (51), les auteurs se sont intéressés au rôle de la cytokine la plus pléiotrope de la famille de l'interleukine 6 (IL6), le *Leukemia inhibitory factor* (LIF), ainsi qu'à son récepteur (LIFR). Comme son nom l'indique, cette cytokine a été initialement identifiée pour son action de frein sur l'évolution des leucémies mais son action est également connue, entre autres, pour stimuler la croissance de nombreux néoplasmes ou de cellules souches (52). Chez l'homme, le LIF est exprimé au sein du tissu hypophysaire normal et tumoral. Dans le tissu sain, il promeut la différenciation sélective des cellules corticotropes aux dépens des autres types de cellules antéhypophysaires et induit, en synergie avec le CRH, la transcription de *POMC* et la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes (52). Surexprimé, il induit une hyperplasie corticotrope. Le but de cette étude était donc d'évaluer par quantification des transcrits et par immunolocalisation l'expression du LIF et de son récepteur LIFR dans l'hypophyse saine et dans les adénomes corticotropes, éventuellement connectée à la présence de mutations génomiques causales de la séquence codante du *LIFR*. Sans distinction entre les cellules corticotropes saines ou tumorales, le LIF était faiblement exprimé ; au contraire, le LIFR était fortement exprimé. De plus, LIFR colocalisait avec l'ACTH, en particulier au sein des tumeurs corticotropes. Dans ces tumeurs, l'immunoréactivité du LIFR était déviée de la région cytoplasmique aux régions nucléaire ou périnucléaire dans les cellules saines adjacentes aux cellules tumorales, suggérant au bilan qu'une activation ou délocalisation du LIFR pourrait accompagner la formation des tumeurs hypophysaires corticotropes. Aucune mutation n'a cependant été identifiée dans la séquence codante du gène *LIFR*.

L'étude de Fukuoka *et al* (53) s'est intéressée à l'expression dans les tumeurs hypophysaires du récepteur EGFR. Ce récepteur est impliqué dans de nombreux cancers chez l'homme et le facteur de croissance épithéliale (EGF) est un facteur de croissance des cellules hypophysaires. Les auteurs ont montré que sur des tumeurs hypophysaires chez l'homme et chez le chien, l'inhibition de ce récepteur, EGFR, par un inhibiteur des tyrosines kinases (le gefitinib) atténuait l'expression de la POMC, inhibait la prolifération des cellules corticotropes et induisait leur apoptose. Sur des souris transgéniques dont les cellules corticotropes hypophysaires exprimaient l'EGFR, la stimulation de ce récepteur entraînait une augmentation de l'expression de POMC et de la sécrétion d'ACTH. Enfin, sur des modèles murins nus *in vivo*, la surexpression de l'EGFR par transfection entraîne un hypercortisolisme alors que l'inhibition du récepteur par le gefitinib permet une diminution de taille de la tumeur hypophysaire et de la cortisolémie. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'EGFR représente une opportunité de traitement de la maladie de Cushing.

Une autre étude s'est intéressée à l'expression de marqueurs de proliférations : KI-67 et proliferating cell nuclear antigen (PCNA) et d'un inhibiteur du cycle cellulaire, p27KIP1, au sein des tumeurs hypophysaires corticotropes de taille variable (54). Chez l'homme, ces marqueurs prédisent le comportement de la tumeur hypophysaire et le pronostic postopératoire. L'expression des trois protéines a été étudiée par immunohistochimie sur 17 adénomes hypophysaires de chiens atteints de maladie de Cushing. Aucune différence significative n'a été observée entre les tumeurs de grande taille et les tumeurs de petite taille, même si une tendance à la baisse était observée pour p27KIP1.

La variabilité de l'expression de KI-67 en fonction de la taille de la tumeur hypophysaire a été étudiée par une autre équipe (55). Dans cette étude, un autre marqueur de prolifération a

également été étudié, le *minichromosome maintenance-7* (MCM7). L'expression de ces marqueurs a été étudiée par immunohistochimie sur des coupes histologiques d'hypophyses de 15 chiens atteints de maladie de Cushing. Contrairement à l'étude précédente, l'expression de KI-67 et de MCM7 était augmentée ($p < 0,01$) dans les tumeurs de grande taille. Une corrélation positive entre les deux marqueurs mais aussi entre chaque marqueur et la taille de la tumeur (estimée par le rapport de hauteur de la tumeur sur la surface de l'encéphale) a été mise en évidence. Enfin, l'expression de MCM7 était significativement plus élevée que KI-67, le positionnant donc comme un marqueur pertinent de la prolifération des tumeurs hypophysaires.

Ainsi, plusieurs études se sont intéressées à l'étiologie ou aux mécanismes accompagnant le développement des tumeurs hypophysaires corticotropes chez le chien, via des anomalies qualitatives ou quantitatives de l'expression d'oncogènes, de suppresseurs de tumeurs, de facteurs de croissance ou de marqueurs de prolifération. Des corrélations ont été établies en particulier avec la grande taille des tumeurs analysées. Il semble que la sécrétion excessive de précurseurs de l'ACTH soit associée à la prolifération des cellules corticotropes et à leur agressivité. L'étude du contrôle de l'expression du gène *ACTH* par le facteur de transcription TPIT, par la voie de la cytokine LIF, du facteur de croissance EGF et de son récepteur EGFR a donc été initiée, avec des pistes suggérant leur implication. Cependant, aucune mutation causale n'a été identifiée. Par ailleurs, le déterminisme de l'augmentation de sécrétion de la POMC par des tumeurs corticotropes agressives, en particulier via l'amplification de la maturation de la POMC au sein de tumeurs corticotropes d'agressivité variable, n'a été étudié.

2. La glande corticosurrénale chez le chien

Chez les mammifères, les glandes surrénales sont deux petites glandes endocrines situées à proximité des reins (8). Chacune est constituée de la réunion de deux tissus dont l'origine embryologique mixte produit une glande aux fonctions diversifiées. La glande corticosurrénale périphérique provient de dérivés mésodermiques tandis que la glande médulosurrénale centrale est colonisée par des cellules ectodermiques dérivées de la crête neurale. Une capsule entoure ces deux régions concentriques (Figure 6).

Dans ce manuscrit, nous nous limiterons à l'étude de la glande corticosurrénale.

2.1. Structure générale et fonctions de la glande corticosurrénale

La corticosurrénale est un organe encapsulé. Sa structure histologique est celle d'un épithélium glandulaire richement vascularisé. Ses cellules glandulaires possèdent les organites caractéristiques des cellules endocrines élaborant les hormones stéroïdes : abondance du réticulum endoplasmique lisse, de mitochondries à crêtes tubulaires et enclaves lipidiques (56).

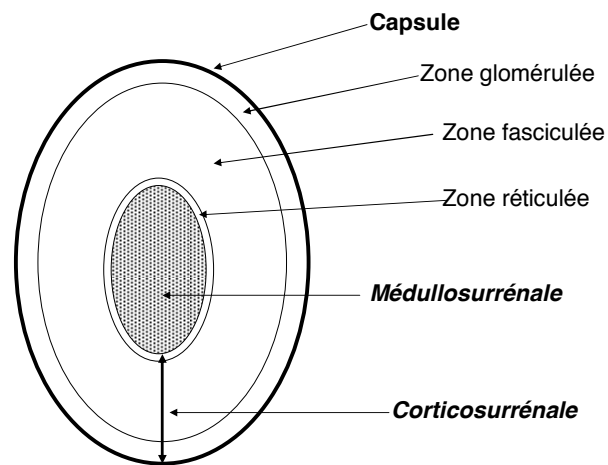


Figure 6 : Représentation schématique d'une glande surrénale.

Son examen microscopique associée à des critères fonctionnels révèle son organisation en trois zones concentriques (56; 57) :

- La zone **glomérulée** représente 15% du tissu corticosurrénalien. Elle sécrète des minéralocorticoïdes, essentiellement l'aldostérone. Cette hormone stéroïde agit en particulier sur les cellules épithéliales du tube contourné distal du rein en se fixant sur son récepteur nucléaire et favorise :
 - la réabsorption active du sodium et du chlore,
 - l'excrétion du potassium et des protons.

La rétention sodée conduit à la réabsorption passive d'eau par le rein. Elle participe ainsi à la régulation de la natrémie et de la volémie. Le contrôle de sa sécrétion dépend du système rénine-angiotensine et de la concentration sérique en potassium.

- La zone **fasciculée** représente la plus grande partie (80%) de la corticosurrénale. Elle sécrète des glucocorticoïdes, le cortisol principalement.
- La zone **réticulée** représente 5% de la corticosurrénale. Sa structure est semblable à celle de la zone fasciculée, elle sécrète des stéroïdes sexuels dont la déhydroépiandrostérone. La sécrétion de stéroïdes sexuels est minime par rapport à la sécrétion par les gonades.

2.2. Physiologie des glandes corticosurrénales

2.2.1. *Synthèse par la corticosurrénale des hormones stéroïdes*

Le système du cytochrome P450

Le précurseur commun aux hormones stéroïdes est le cholestérol. Les réactions d'hydroxylation jouent un rôle très important dans sa transformation conduisant à la synthèse des hormones stéroïdes. Elles requièrent l'activation de l'oxygène. Cette activation est réalisée par les enzymes de la famille des cytochromes P450 (56). Le cytochrome P450 est le composant terminal d'une chaîne de transport des électrons dont le rôle est l'hydroxylation ; il a été découvert dans les mitochondries de la corticosurrénale et dans les microsomes (réticulum endoplasmique lisse) hépatiques au sein desquels il intervient dans la détoxification des xénobiotiques.

Les enzymes P450 des mammifères sont codées par 10 familles de gènes et leur nom commence par CYP (CYtochrome P₄₅₀). Elles agissent sur une large gamme de substrats.

Certaines de ces enzymes sont exprimées par la corticosurrénale ; leur combinaison dirige alors la synthèse des hormones stéroïdes.

Biosynthèse des hormones stéroïdes

Les hormones stéroïdes (minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes et stéroïdes sexuels) dérivent du cholestérol. Jusqu'à très récemment, la stéroïdogénèse chez le chien était calquée à celle connue chez l'homme. Ces réactions sont catalysées par un faible nombre d'enzymes spécifiques. Les enzymes CYP11A1 (enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol), CYP11B1 (11 β -Hydroxylase) et CYP11B2 (Aldostérone synthase) sont intégrées à la membrane interne de la mitochondrie tandis que les enzymes CYP17 (17 α -Hydroxylase), CYP21A2 (21 β -Hydroxylase) et 3 β -HSD (3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase) sont enchâssées dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse (58).

La voie de départ est commune à tous les types hormonaux, elle correspond à la transformation du cholestérol en pregnénolone (56; 57). Les lipoprotéines de basse densité (LDL) représentent environ 80% du cholestérol délivrés aux glandes surrénales, sous sa forme estérifiée de stockage ; du cholestérol libre, hydrolysé, est néanmoins disponible en permanence au sein du parenchyme surrénalien pour une réponse rapide à la stimulation. L'expression spécifique à chaque zone d'enzymes clés dans l'aiguillage moléculaire de la biosynthèse explique la spécialisation du cortex dans la production des stéroïdes fonctionnels. Chez l'homme, le rat et la souris, les dernières étapes de la synthèse de l'aldostérone ou du cortisol sont ainsi respectivement catalysées par la CYP11B2 exprimée par les seules cellules de la zone glomérulée, ou par la CYP11B1 exprimée par les seules cellules des zones fasciculée et réticulée (Figure 7) (59). A l'inverse, chez les bovins, ovins, porcs, oiseaux et amphibiens, la CYP11B1 catalyse la formation des deux hormones cortisol et aldostérone

(60). Chez le chien, il semble qu'une seule enzyme, la CYP11B, soit exprimée (60). Dans ce cas, la spécificité de sécrétion de chacune des zones du cortex surrénalien dépendrait alors de l'expression spécifique à la zone fasciculée de la CYP17. Les résultats de cette étude ont permis de proposer pour le chien les voies de synthèse probables des hormones stéroïdiennes par le cortex surrénalien (Figure 7).

Aucune étude similaire n'a été réalisée chez le chat. Les voies de synthèse des hormones stéroïdiennes dans cette espèce ne sont donc pas précisément connues à l'heure actuelle.

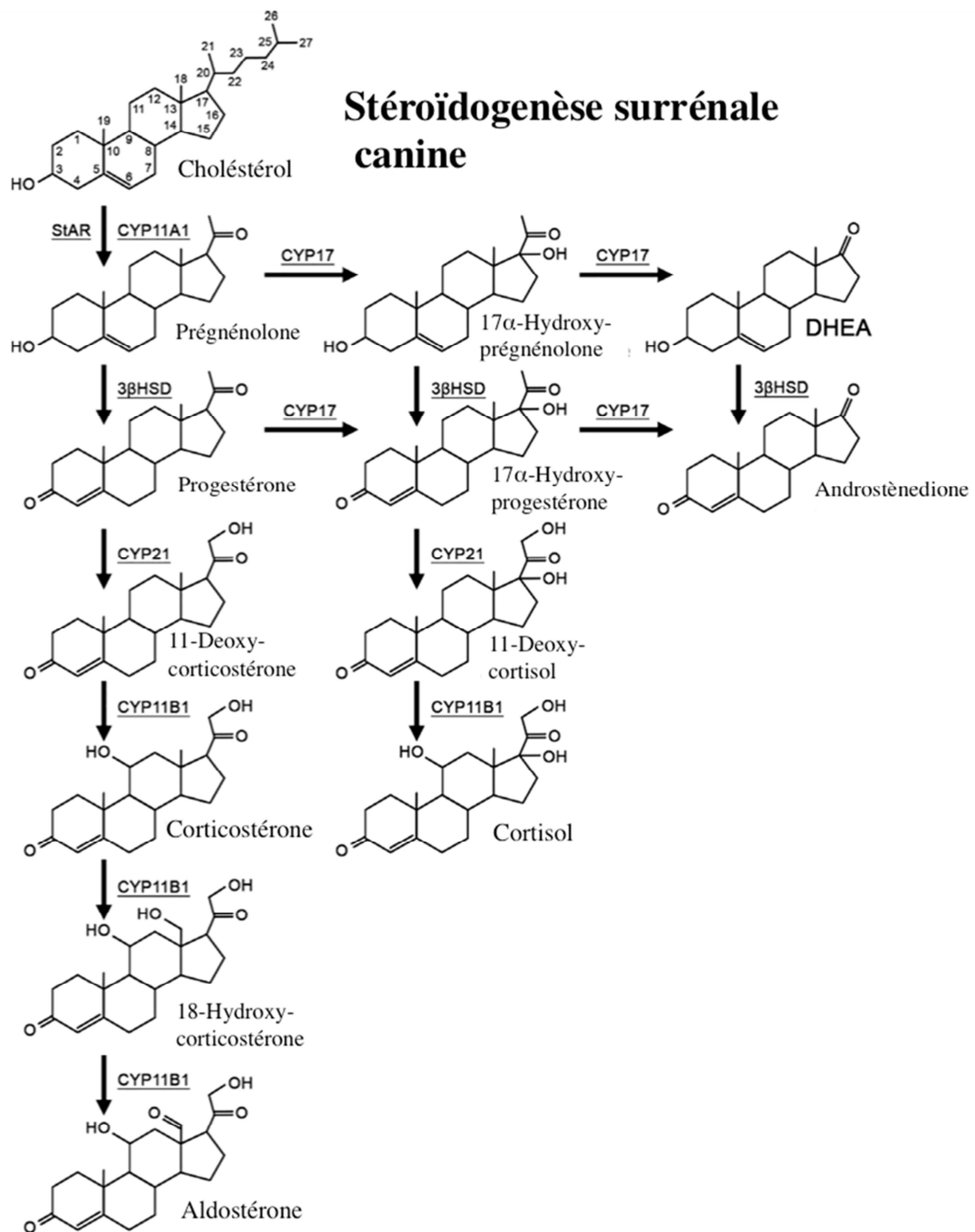


Figure 7 : Voies de synthèse des hormones stéroïdiennes par le cortex surrénalien chez le chien. Schéma établi d'après (60).

StAR : steroidogenic acute regulatory protein ; CYP11A1 : Enzyme de clivage de la chaîne latérale du cholestérol ; 3 β -HSD : 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase ; CYP17 : 17 α -Hydroxylase/17,20-lyase ; CYP21 : 21-Hydroxylase.

2.2.2. Contrôle de la synthèse et de la sécrétion des hormones stéroïdes surrénaliennes

Seules les zones réticulées et fasciculées nous intéresseront dans la suite de ce manuscrit. Le principal acteur du contrôle de leur fonction est la corticotropine (ACTH).

L'étude de ce contrôle repose sur celle de l'axe corticotrope (*cf.* partie 1.3.1).

Les principales cibles de l'ACTH sont les cellules des zones fasciculées et réticulées de la corticosurrénale (Figure 3). Le récepteur à l'ACTH appartient à la famille des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G, liant le guanosine triphosphate ; il est fortement exprimé par ces cellules. La liaison de l'ACTH à son récepteur stimule très rapidement, en quelques minutes, la synthèse et la production d'hormones stéroïdes, essentiellement les glucocorticoïdes. Son rôle est également trophique pour les cellules surrénaliennes : son excès induit une hypertrophie de la corticosurrénale alors que sa privation induit leur atrophie.

Le couplage de l'ACTH à son récepteur active la voie de l'AMP_c (adénosine 5' monophosphate cyclique) dont l'une des principales cibles est la protéine kinase A. En réponse à l'activation de cette protéine, l'augmentation de la synthèse stéroïdienne s'effectue selon deux étapes : une réponse immédiate qui consiste en un afflux de cholestérol libre vers la membrane mitochondriale interne où il est transformé en pregnénolone et une réponse tardive qui nécessite l'activation de la transcription des gènes de la stéroïdogénèse. Les étapes

suivantes, décrites dans le paragraphe 2.2.1, se déroulent dans les mitochondries et dans le réticulum endoplasmique lisse (15).

Les glucocorticoïdes sécrétés se lient aux protéines de transport transcortine et albumine assurant leur solubilisation dans le sang qui les achemine vers leurs cibles cellulaires distantes.

Les glucocorticoïdes exercent un rétrocontrôle négatif sur leur synthèse via l'inhibition de la sécrétion de la CRH et de la vasopressine par les noyaux paraventriculaires et supraoptiques de l'hypothalamus et l'inhibition de l'expression de la POMC et de la sécrétion d'ACTH par les cellules corticotropes du lobe antérieur de l'adénohypophyse. En revanche, ils ne semblent pas exercer de rétrocontrôle négatif sur la sécrétion d'ACTH par les cellules B du lobe intermédiaire (22).

2.2.3. Actions physiologiques des glucocorticoïdes

Les principales actions physiologiques des glucocorticoïdes sont :

- une augmentation de la glycémie : ils renforcent la résistance à l'insuline, diminuent l'utilisation périphérique du glucose et stimulent la néoglucogenèse ;
- une augmentation du catabolisme protéique incluant une fonte musculaire, un amincissement du tissu cutané, une fragilisation des structures ligamentaires et de la matrice protéique osseuse ;
- une inhibition de la croissance de certains types cellulaires dont les fibroblastes ;
- une diminution de la réponse immunitaire spécifique et non spécifique ;
- une redistribution des lipides avec une lipolyse accentuée dans le tissu adipeux de certaines régions, en parallèle d'un dépôt accentué de tissu adipeux dans d'autres

régions. Chez l'homme, on décrit une nuque épaissie par dépôt adipeux (bosse de bison) ; chez toutes les espèces dans lesquelles le syndrome de Cushing est décrit, incluant le chien, une augmentation de la masse graisseuse en région abdominale ;

- un effet minéralocorticoïde (rétention de sodium et sécrétion de potassium), néanmoins plus faible que celui de l'aldostérone ;
- une augmentation de la diurèse par stimulation de la filtration glomérulaire ;
- une diminution de l'absorption intestinale du calcium et une augmentation de la résorption osseuse à l'origine d'une augmentation de la calciurèse ;
- une action sur l'hématopoïèse et sur la lymphopoïèse avec :
 - érythrocytose,
 - toxicité directe sur les lymphocytes et lymphopénie,
 - séquestration médullaire des éosinophiles et éosinopénie,
 - démargination des neutrophiles et neutrophilie,
 - thrombocytose ;
- un effet psychotonique ;
- un effet asthénique.

La connaissance de ces effets est essentielle à la compréhension des signes cliniques décrits lors de syndrome de Cushing chez l'animal.

2.3.Pathogénie tumorale des cellules du cortex surrénalien

2.3.1. *Lésions surrénaliennes associées au syndrome de Cushing chez le chien*

Parmi les lésions surrénaliennes pouvant induire un syndrome de Cushing, les tumeurs surrénaliennes cortico-sécrétantes prédominent. Elles peuvent être bénignes, on parle alors d'adénomes ou malignes et on parle alors de carcinomes. La prévalence des deux types tumoraux est à peu près similaire. La sécrétion du cortisol et parfois des stéroïdes des étapes préalables de sa biosynthèse est alors autonome, c'est-à-dire indépendante du contrôle hypophysaire. Le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sécrétés en excès entraîne un effondrement des sécrétions de CRH, d'ACTH et de POMC (61). L'effondrement de la sécrétion d'ACTH est à l'origine d'une atrophie du cortex surrénalien controlatéral et adjacent à la tumeur. Les autres lésions possibles, plus rares, sont une hyperplasie surrénalienne dépendante de l'alimentation.

Les tumeurs unilatérales sont les plus fréquentes. Les adénomes sont composés de cellules bien différenciées ressemblant aux cellules des zones fasciculées ou réticulées. Les carcinomes sont composés de cellules pléomorphes, de grande taille avec un nucléole proéminent et un cytoplasme vacuolisé et dense. Dans certains cas, la distinction entre adénome et adénocarcinome est difficile à établir. Quand ils ont été analysés, les critères morphologiques associés aux carcinomes ont permis de les distinguer des adénomes ; leur taille était supérieure à 2 cm, ils étaient caractérisés par une fibrose périphérique, une invasion de la capsule surrénalienne et la présence de foyers hémorragiques et nécrotiques (62; 63).

Dans de rares cas, l'hypercorticisme spontané a été associé à des tumeurs bilatérales (64-69).

2.3.2. Pathogenèse des tumeurs surrénaliennes corticosécrétantes chez le chien

L'étiologie de l'hypercorticisme spontané d'origine surrénalienne reste peu connue. Pour rappel, la stéroïdogénèse est initiée par la liaison de l'ACTH à son récepteur (melanocortin 2 receptor, MC2R), membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, fortement exprimé à la surface des cellules adrénocorticales. Parmi les acteurs de la voie de signalisation, on note le gène de la sous-unité alpha de la protéine stimulatrice G (GNAS), l'adenylyl cyclase, l'AMPC et la protéine kinase A, hétérotétramère comportant 2 sous unités régulatrices (dont la sous-unité régulatrice alpha de la protéine kinase A (PRKAR1A)) et 2 sous unités catalytiques. En réponse à l'activation de la protéine kinase A, l'augmentation de la synthèse stéroïdienne s'effectue selon deux étapes successives, l'une immédiate et la seconde différée. La réponse immédiate consiste en un afflux de cholestérol libre vers la membrane mitochondriale interne, pris en charge par la CYP11A1 qui catalyse la conversion du cholestérol en prégnénolone, point de départ de la synthèse de toutes les hormones stéroïdiennes. Cette étape est en partie contrôlée par la protéine StAR (steroidogenic acute regulatory protein).

L'hypothèse de mutations génomiques induisant dans les tumeurs surrénaliennes une altération dans l'expression des gènes codant ces protéines a été posée. L'expression des gènes codant pour le récepteur à l'ACTH, pour la StAR et pour diverses enzymes de la stéroïdogénèse (CYP11A, CYP17, HSD3B2, CYP21, CYP11B1) a été évaluée au sein de tumeurs corticosurrénaliennes bénignes et malignes, comparées à du tissu sain. Aucune différence entre les deux types de tumeurs n'a été identifiée. En revanche, une expression abaissée du récepteur à l'ACTH a été quantifiée, significativement plus basse que celle du

tissu surrénalien sain (70). Une seconde étude portant sur 44 tumeurs surrénaliennes (14 adénomes et 30 carcinomes) a prolongé la recherche de mutations dans les gènes *GNAS*, *PRKARIA* et *MC2R* ; une mutation activatrice de *GNAS* a été retrouvée dans un tiers des tumeurs (4 adénomes et 10 carcinomes). Ainsi, une activation de la voie de l'AMPc pourrait dans certains cas jouer un rôle dans la tumorigenèse surrénalienne et dans la production de cortisol indépendante de l'ACTH (71).

Enfin, le niveau d'expression des récepteurs à la LH, au GIP (gastric inhibitory polypeptide) et à la vasopressine (V1a, V1b et V2) a été évalué dans 23 tumeurs corticosurrénaliennes sécrétantes (14 carcinomes et 9 adénomes). Les récepteurs au GIP et à la vasopressine (V2), non détectables dans la zone fasciculée des surrénales saines, ont été identifiés dans cette même zone dans 50% des tumeurs analysées (72). L'expression ectopique ou augmentée de ces récepteurs au sein des cellules néoplasiques de la zone fasciculée des tumeurs surrénaliennes permet de poser l'hypothèse d'un rôle pathogène de cette anomalie conduisant au développement de tumeurs surrénales sécrétantes. L'éventuel lien de causalité doit en revanche être encore approfondi.

3. Hypercorticisme spontané ou syndrome de Cushing chez le chien

L'hypercorticisme correspond par définition à un excès de stéroïdes surrénaliens circulants et l'hypercortisolisme à un excès de glucocorticoïdes circulants.

Le syndrome de Cushing correspond à l'ensemble des manifestations cliniques et biologiques secondaires à un excès de stéroïdes surrénaliens dans le sang. Cet excès peut être d'origine endogène et constitue l'**hypercorticisme spontané** ou d'origine exogène et on parle alors de syndrome de Cushing iatrogène.

Les différentes causes de l'hypercorticisme spontané rapportées chez le chien sont classées en formes dépendantes de l'ACTH et en formes indépendantes de l'ACTH (15) (Figure 8).

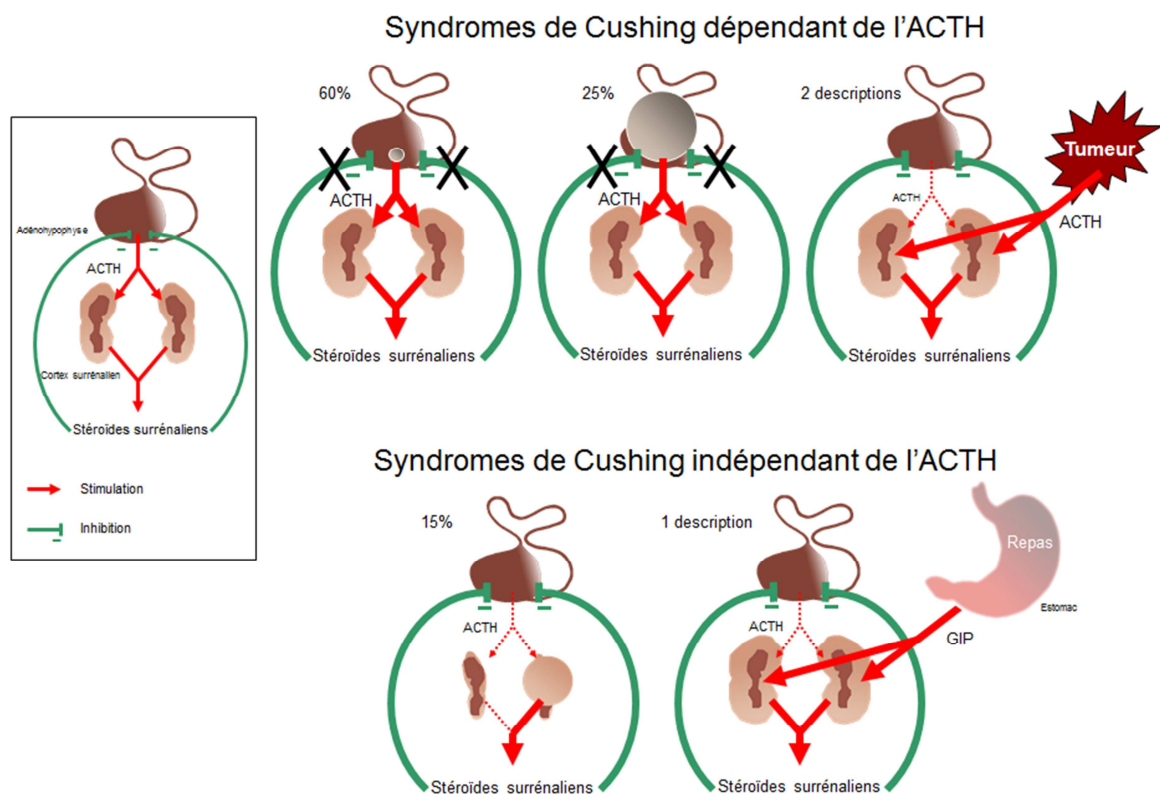


Figure 8 : représentation schématique de l'axe corticotrope en situation saine ou pathologique. L'axe est représenté lors d'un fonctionnement normal (encadré à gauche), d'un syndrome de Cushing dépendant (en haut) ou indépendant (en bas) de l'ACTH.

La maladie de Cushing désigne l'affection responsable d'un hypercortisolisme dont l'origine est un **adénome** (ou un foyer d'hyperplasie) **hypophysaire corticotrope**. Il s'agit de la forme la plus courante de syndrome de Cushing chez le chien et la majorité des autres espèces ; elle représente près de 85% des cas chez le chien.

3.1. Classification des différentes formes d'hypercorticisme chez le chien

3.1.1. *Hypercorticisme dépendant de l'ACTH*

Syndrome de Cushing hypophysaire ou maladie de Cushing : cette forme causée par la présence d'une tumeur hypophysaire représente 85% des cas décrits. La quasi-totalité des tumeurs hypophysaires corticotropes responsables d'une maladie de Cushing sont des adénomes. La majorité de ces tumeurs corticotropes sont de petites tailles (microadénomes) ; vingt à trente pour cent sont des macrotumeurs (des macroadénomes dans la majorité des cas, quelques macrocarcinomes), appelées ainsi en raison de leur volume élevé, possiblement responsable de signes cliniques évocateurs d'anomalies fonctionnelles secondaires du système nerveux central. La perte du rétrocontrôle exercé par le cortisol sur la sécrétion de l'ACTH est à l'origine d'un hypercortisolisme et d'une hypertrophie surrénalienne bilatérale (15; 73).

Hypercorticisme secondaire à une sécrétion ectopique d'ACTH : ce phénomène paranéoplasique, rare, a été décrit chez l'homme dans plusieurs types de cancers, essentiellement les tumeurs broncho-pulmonaires anaplasiques à petites cellules mais également les tumeurs pancréatiques, les tumeurs carcinoïdes et le phéochromocytome. Il a été suspecté à trois reprises chez le chien (2-4), notamment lors d'une tumeur hépatique carcinoïde (3) ou d'une tumeur pancréatique (2). La description par Galac (2) et ses collaborateurs est la plus convaincante, elle concerne un berger allemand mâle entier de huit ans présentant les signes cliniques et paramètres biologiques évocateurs d'une maladie de Cushing, résistante à la dexaméthasone. Les signes cliniques du chien ont persisté après l'hypophysectomie et l'analyse histologique de l'hypophyse n'a révélé aucune lésion tumorale ou hyperplasique. Une tumeur pancréatique d'origine neuroendocrine avec métastases

hépatiques a finalement été diagnostiquée, probablement à l'origine d'une sécrétion ectopique d'ACTH. Aucun immunomarquage pour l'ACTH n'a cependant été réalisé sur les biopsies supports du diagnostic.

3.1.2. Hypercorticisme ACTH-indépendant

Syndrome de Cushing surrénalien : les cas de syndrome de Cushing d'origine surrénalienne, ou syndrome de Cushing périphérique, représentent environ 15% des cas d'hypercorticisme. Ils sont la conséquence d'une tumeur du cortex surrénalien (adénome ou adénocarcinome, représentant respectivement 40% et 60% des cas) à l'origine d'une sécrétion excessive de glucocorticoïdes, indépendante du contrôle intégré normalement assuré par les étages hypothalamo-hypophysaires.

Syndrome de Cushing surrénalien par expression aberrante de récepteurs membranaires : ces cas sont rares, ils se manifestent chez l'homme par une hyperplasie nodulaire bilatérale des glandes corticosurrénales indépendante de l'ACTH, ou parfois par un adénome corticosurrénalien unique. Ces nodules sont formés de cellules surrénaliennes dont la caractéristique est d'exprimer de façon anormale et ectopique des protéines, en particulier de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires, tels que le récepteur au GIP (syndrome de Cushing dépendant de l'alimentation), les récepteurs V1 à la vasopressine, les récepteurs bêta-adrénergiques, les récepteurs à la LH, à la sérotonine ou à l'angiotensine I (56). Chez le chien, un cas apparenté à ce type a été décrit, dans un contexte clinique évocateur d'hypercorticisme avec valeur effondrée de la concentration sanguine en ACTH en absence de tumeur surrénalienne (5). L'augmentation du rapport cortisol sur créatinine urinaire (RCCU) suite à l'administration d'un repas a été démontrée à deux reprises ; cette augmentation n'a en revanche pas été observée après administration d'un repas et

d'octréotide, un octapeptide analogue de la somatostatine inhibant différentes sécrétions hormonales comme par exemple l'hormone de croissance. Dans ce cas, la mesure effondrée d'ACTH concomitante d'une adrénomégalie bilatérale a été l'élément de suspicion de cette forme d'hypercorticisme dépendante de l'alimentation, dont le mécanisme pathogénique précis resterait à démontrer.

3.2.Epidémiologie et manifestations cliniques de l'hypercorticisme

3.2.1. Epidémiologie

Une étude récente estime la prévalence du syndrome de Cushing chez le chien au Royaume Uni à trois cas pour mille chiens (0,28%), ce qui en fait une affection peu fréquente mais pas rare (74). Les animaux atteints de syndrome de Cushing sont des animaux d'âge moyen ou avancé, supérieur à six ans dans 92% des cas (75). Trois cas sur quatre (77%) sont des chiens de plus de neuf ans et la médiane de l'âge des chiens atteints est de 10 ans (76-79).

Les cas de maladie de Cushing sont observés de manière équilibrée entre mâles et femelle alors qu'il existe une prédominance des femelles lors des syndromes de Cushing d'origine surrénalienne (75% des cas) (66; 77; 78).

L'hypercorticisme est observé chez toutes races de chiens (80). Il existe une prédisposition des caniches, de différentes races de terriers, des teckels et des boxers pour développer un syndrome de Cushing, quelle que soit son origine. Les maladies de Cushing sont observées préférentiellement chez les chiens de petits formats (50% des chiens pèsent moins de 10 kg et 75% moins de 20 kg). A l'opposé, 50% des chiens atteints de syndrome de Cushing d'origine surrénalienne ont un poids supérieur à 20 kg (77; 78; 81).

3.2.2. Manifestations cliniques

Les signes cliniques accompagnant le syndrome de Cushing apparaissent progressivement et n'alertent généralement pas les propriétaires dans un premier temps. Ils sont multiples et variés, pouvant inclure une polyphagie, une polyuro-polydipsie, une distension abdominale, une léthargie ou des troubles cutanés, mais ne sont pas tous présents chez un même patient initialement. Ces signes cliniques sont les conséquences des actions physiologiques des glucocorticoïdes (lipolyse, catabolisme protéique, glucogénèse, effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur, *cf.* paragraphe 2.2.3).

Le tableau clinique ou son évolution ne permettent pas, dans la plupart des cas, de distinguer la cause du syndrome de Cushing.

Les signes associés au syndrome de Cushing peuvent être regroupés en trois catégories :

- les signes « omniprésents » lors de syndrome de Cushing ; ces signes ne présentent pour la plupart aucune spécificité ;
- les signes cliniques peu fréquents lors de syndrome de Cushing, mais dont la spécificité en fait de bons signes d'appel ;
- les complications du syndrome de Cushing qui peuvent également, de par leur spécificité, constituer de très bons signes d'appel (73).

La majorité des études décrivant les signes cliniques de l'hypercorticisme ont plus de 10 ans. Dans les dernières années, le diagnostic du syndrome de Cushing est de plus en plus précoce, face à des présentations cliniques plus subtiles (82). Il est donc probable que la prévalence actuelle des signes cliniques soit plus faible que celle présentée dans ce manuscrit.

Signes cliniques omniprésents

Sont définis comme signes cliniques omniprésents des signes cliniques retrouvés chez plus de 75% des animaux atteints de syndrome de Cushing dans la majorité des études réalisées, c'est-à-dire au moins aussi souvent que les signes cliniques cutanés.

Les **signes cutanés** sont présents chez plus de 80% des chiens atteints de syndrome de Cushing (83). Ils comprennent :

- des anomalies du poil et de ses annexes : les modifications du pelage sont fréquentes, qu'il s'agisse d'une modification de texture (poil terne et emmêlé pour les races à poil laineux), d'une modification de couleur (éclaircissement de l'ensemble ou de l'extrémité de la tige pileuse), d'une raréfaction, d'une disparition des poils (alopécie), ou d'un retard de repousse des poils. L'alopécie est le plus souvent symétrique et non prurigineuse en l'absence d'infection, localisée préférentiellement sur l'abdomen, les flancs et la queue. Cependant, d'autres formes d'alopécie touchant, par exemple, préférentiellement les extrémités peuvent être observées (84). Un *squamosis* peut être associé à l'alopécie. Il est également fréquent d'observer un nombre accru de comédons localisés préférentiellement autour des mamelles et sur la ligne du dos mais leur présence n'est pas très spécifique. Enfin, l'atrophie des follicules pileux compromet la repousse des poils en cas de tonte (15).
- Des anomalies du derme et de l'épiderme peuvent également être observées : il peut s'agir de modifications vasculaires telles que la télangiectasie, la phlébectasie (relativement spécifique), les hématomes ou des modifications physiques de type hypotonie et finesse cutanée, retard de cicatrisation et élargissement des cicatrices, vergetures. Un signe cutané moins fréquent que les précédents mais plus spécifique est la présence d'une calcinose. Ces

plaques cutanées ou sous-cutanées, de consistance assez dure, correspondant à des dépôts de calcium et sont localisées autour de la tête, sur la ligne du dos, sur le ventre et les régions inguinales.

Associée à la léthargie observée chez les sujets atteints, l'atrophie cutanée peut occasionner des ulcères de décubitus. La fragilisation de la peau et l'effet immuno-suppresseur des corticoïdes favorisent les infections cutanées. Par exemple, la mise en évidence d'une gale folliculaire ou démodécie (infection des follicules pileux par un acarien *Demodex canis*) chez un animal adulte est évocatrice d'une maladie interne sous-jacente et tout particulièrement d'un syndrome de Cushing (83). La pyodermite est à l'origine d'un prurit (15).

Presque systématique (80 à 90% des cas), la **polyphagie** est notée, probablement liée à un effet direct central des glucocorticoïdes. De nombreux propriétaires semblent peu préoccupés par ce changement de comportement alimentaire qu'ils considèrent comme un signe de bonne santé chez un animal âgé (15) ; il est pourtant souvent relativement caractéristique du syndrome de Cushing. Un appétit diminué, voire une anorexie, peuvent être rarement observés lors d'hypercorticisme. Le plus souvent, leur présence signent un macroadénome hypophysaire ou une maladie concomitante.

La **polyuro-polydipsie** (PUPD) est également un signe très fréquemment décrit, dans 80 à 85% des cas. Il s'agit d'une singularité propre au chien. Elle constitue le principal motif de consultation car elle est à l'origine d'une « incontinence » urinaire nocturne. La prise de boisson excède de deux à 10 fois le volume normal. La densité urinaire est généralement inférieure à 1.015 en l'absence de diabète sucré associé (85).

L'origine de la PUPD chez le chien reste inconnue mais plusieurs explications ont été proposées :

- interférence du cortisol avec la sécrétion de l'ADH à l'origine d'un diabète insipide central (déficit en hormone ADH) (86).
- interférence du cortisol avec les récepteurs de l'ADH (AntiDiuretic Hormone) au niveau du tube collecteur rénal à l'origine d'un effet antiADH (diabète insipide néphrogénique),
- augmentation de la filtration glomérulaire,
- augmentation du facteur atrial natriurétique,

La première hypothèse est soutenue par l'amélioration clinique observée lors de l'administration exogène d'ADH chez des chiens atteints et semble donc pertinente (15; 86; 87).

La léthargie, la faiblesse musculaire et la fatigabilité sont des signes cliniques rarement décrits par les propriétaires qui les associent à l'âge de l'animal. La faiblesse musculaire se traduit par l'incapacité des chiens à réaliser certains efforts, par exemple avec une difficulté à monter les escaliers ou à sauter. Une amyotrophie est souvent objectivée. Chez les races de chiens présentant des massifs temporaux développés, l'amyotrophie temporale peut constituer un bon signe d'appel du syndrome. La fatigabilité se traduit par une moindre tolérance à l'effort. Elle est à mettre en relation avec la distension abdominale et la faiblesse musculaire. La léthargie est imputable à la faiblesse musculaire et à une fatigabilité accrue. Elle peut, dans certains cas, se traduire par des ulcères cutanés témoins d'un décubitus prolongé. Enfin, ces signes peuvent être aggravés par des affections ostéo-articulaires secondaires à l'hypercorticisme : rupture du ligament croisé antérieur, luxation de la rotule et plus rarement

fracture. En revanche, avant la mise en place du traitement de la maladie de Cushing, l'effet anti-inflammatoire des corticoïdes peut masquer les signes cliniques d'arthrose et les propriétaires doivent être prévenus de l'éventualité de leur apparition après la mise en place du traitement (15).

La **distension abdominale** est décrite chez 90 à 95% des chiens atteints. Elle est due à la redistribution des graisses vers l'abdomen et au relâchement de la sangle abdominale. L'hépatomégalie par action directe du cortisol et la réplétion vésicale par augmentation de la diurèse, accentuent la description d'un abdomen pendulaire (15).

Signes cliniques occasionnels

Bien que plus rarement observés, dans moins de la moitié des cas, les signes cliniques dits occasionnels peuvent constituer, en les confrontant à d'autres signes cliniques, de bons signes d'appel.

Des **difficultés respiratoires** sont décrites chez les animaux atteints de syndrome de Cushing. Elles sont secondaires à la faiblesse musculaire, au dépôt de graisse autour du thorax et à l'hépatomégalie qui augmente la pression exercée sur le diaphragme ; elles peuvent également être induites par la présence de minéralisations interstitielles ou bronchiques ou de thromboembolie pulmonaire (15; 88).

L'hypercortisolémie a pour conséquence un « aplatissement de l'axe gonadotrope » à l'origine de **signes cliniques génitaux**. Chez le mâle, la baisse de sécrétion des hormones gonadotropes est à l'origine d'une atrophie testiculaire, d'une baisse de la libido et d'une diminution du taux de testotérone circulant. Cet hypogonadisme n'est pas totalement

compensé par l'hypersécrétion surrénale d'androgènes communément observée lors de syndrome de Cushing.

Chez la femelle, l'hypersécrétion surrénale d'androgènes, souvent associée à un anœstrus prolongé, peut parfois aboutir à des signes cliniques de virilisation (89). Quelques chiennes présentent une hypertrophie du clitoris. Un cas d'adénome des glandes hépatoïdes, affection habituellement réservée aux mâles (androgéno-dépendante), a été décrit (89).

Complications

Hors du derme (calcinose), les **calcifications ectopiques** peuvent concerner les anneaux trachéaux, les parois bronchiques, les reins et plus rarement les vaisseaux (15).

La **myotonie** est une myopathie qui touche les chiens atteints d'hypercorticisme. Très rare outre-Atlantique, probablement plus fréquente en France, elle est caractérisée par une persistance de la contraction musculaire après un effort volontaire. Elle produit une raideur excessive des postérieurs, parfois associée à celle des antérieurs ; à l'examen des membres, les massifs musculaires proximaux sont en général très hypertrophiés. Cette affection peut être très handicapante ; elle peut parfois constituer le seul motif de consultation du propriétaire. La pathogénie de la myotonie est inconnue. On l'observe préférentiellement chez les caniches de robe abricot, même si des individus présentant une autre robe, ou issus d'autres races peuvent être également touchés. L'impact d'un fond génétique sur le développement de cette maladie semble évident : elle est en effet relativement souvent observée dans notre expérience alors que les observations s'y rapportant outre-Atlantique, même chez les caniches, sont extrêmement rares (15). Il est crucial de pouvoir la reconnaître, dans la mesure où le traitement du syndrome de Cushing ne permet pas la disparition de la

pseudomyotonie, au mieux sa stabilisation. L'examen électromyographique montre des décharges musculaires à haute fréquence. L'examen histologique montre une dégénérescence non inflammatoire des fibres musculaires (15).

En fonction des études, 30 à plus de 80% des chiens atteints de maladie de Cushing présentent une **hypertension artérielle** (15). Son origine est inconnue et semble multifactorielle. Parmi les mécanismes proposés, sont citées une diminution des facteurs vasodilatateurs tels que les prostaglandines et une augmentation des facteurs vasoconstricteurs tels que les catécholamines, associée à une sensibilisation accrue de la média vasculaire à l'action des catécholamines (90; 91). Les conséquences de cette hypertension sont rarement délétères mais peuvent inclure une hémorragie intraoculaire, une cardiomyopathie hypertrophique ou une glomérulopathie. Elle régresse généralement lors de la mise en place d'un traitement adapté de l'hypercorticisme ; cependant, les lésions d'artériosclérose qu'elle entraîne pourrait expliquer l'observation ponctuelle d'une persistance de l'hypertension artérielle systémique malgré la résolution de l'hypercorticisme (90; 92).

Les **infections du tractus urinaire** sont des complications fréquentes du syndrome de Cushing. Plusieurs explications peuvent être avancées. D'une part, la baisse de la densité urinaire constitue un milieu favorable au développement bactérien et d'autre part, l'effet des glucocorticoïdes affaiblit les défenses immunitaires. Ces explications restent cependant spéculatives, des tentatives de modélisation de ces infections par administration chronique de cortisol ayant été infructueuses (93).

Les glucocorticoïdes augmentent la calciurèse ce qui, conjugué aux infections urinaires, favorise la formation des **calculs** de phosphate de calcium ou d'oxalate de calcium (15).

Certaines études mettent en évidence une **protéinurie** avec une augmentation du ratio protéines urinaires sur créatinine urinaire dans près de 50% des cas, valeur à comparer à celle chez l'animal sain, typiquement inférieure à 5 (90; 92; 94). Cette protéinurie est rarement à l'origine de l'expression clinique d'un syndrome néphrotique au sens strict. Son origine est mal déterminée et les lésions histologiques décrites montrent des types de glomérulopathies variables. Le traitement de l'hypercorticisme améliore la protéinurie dans 60 à 80% des cas (90; 92).

L'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie sont des facteurs prédisposant à l'apparition d'une **pancréatite** (95).

Les glucocorticoïdes sont à l'origine d'une insulino-résistance. L'existence d'un **diabète sucré** peut être consécutive à l'hypercorticisme dans 10% des cas (96). Il est important de noter que de nombreux animaux diabétiques, en dehors de tout syndrome de Cushing, présentent une hyperactivité de l'axe corticotrope (97). Ainsi, le diagnostic d'un syndrome de Cushing chez les chiens diabétiques est difficile. La recherche d'un syndrome de Cushing chez un individu diabétique doit donc exclusivement s'effectuer dans le cadre de l'exploration d'une insulino-résistance ou chez un individu présentant par ailleurs des signes ne pouvant pas être expliqués par la simple présence d'un diabète sucré (15).

Si les embolies sont relativement rares chez le chien, on les observe plus fréquemment chez des patients atteints d'un syndrome de Cushing (98-100). Chez l'homme, le risque de **thromboembolie** peut être quatre fois plus élevé chez un patient atteint de syndrome de Cushing (101). La plupart des études portant sur le risque d'embolie lors de syndrome de Cushing chez le chien sont en faveur d'une hypercoagulabilité. Son origine semble être

multifactorielle (101-105). On décrit surtout les embolies pulmonaires, mais des formes systémiques peuvent également exister, en particulier une thrombose aortique (106).

Les macroadénomes hypophysaires peuvent entraîner des **signes nerveux** du fait de la compression de l'hypothalamus, de l'invagination de la tige hypophysaire ou de la dilatation du troisième ventricule. Ces signes cliniques sont très variables et incluent anorexie, apathie, désorientation, stupeur, ataxie, tétraparésie, nystagmus, cécité, anisocorie (15; 32; 79; 107). Une amputation du champ visuel, liée à la compression du chiasma optique semble moins fréquente que chez l'homme. Les signes nerveux peuvent être présents dès le diagnostic ou apparaître après la mise en place d'un traitement hypocortisolémiant. En marge de ces troubles neurologiques, la compression du reste du tissu hypophysaire et de l'hypothalamus peut entraîner un diabète insipide central sans lien avec l'hypercortisolisme. Parmi les autres signes nerveux décrits, les chiens avec un hypercorticisme semblent développer de manière préférentielle une paralysie faciale uni- ou bilatérale.

Enfin, une dernière complication rapportée est la formation d'une **mucocèle biliaire**. Plusieurs études décrivent la présence d'un hypercorticisme chez environ 20-25% des chiens présentant une mucocèle (108; 109). Une étude récente rapporte une association entre la présence d'un mucocèle et la prise d'un traitement du syndrome de Cushing (quel qu'il soit) avec un risque relatif de 3,6 (110).

3.3.Diagnostic de l'hypercorticisme et de son origine

3.3.1. Diagnostic de l'hypercorticisme

La démarche diagnostique est basée avant tout sur l'affirmation ou l'infirmité de la présence d'un syndrome de Cushing, puis sur la caractérisation étiologique de ce syndrome.

L'expression clinique associée au syndrome de Cushing est multiple, parfois subtile et la sensibilité et spécificité des examens complémentaires employés lors de son diagnostic sont imparfaites, quels que soient les examens considérés (15; 82). La diversité et le manque de spécificité des signes cliniques et les imperfections des examens complémentaires obligent le clinicien à redoubler de vigilance lors de leur interprétation et doivent donc le conduire à avoir préalablement défini avec précision son niveau de suspicion de syndrome de Cushing pour deux raisons :

- beaucoup des erreurs diagnostiques observées s'expliquent par un manque de critique des résultats obtenus au cours de premières explorations : résultats en défaveur d'un syndrome de Cushing dans le cadre d'une suspicion extrêmement forte avec probabilité élevée que le résultat soit faussement négatif, ou au contraire résultats en faveur d'un syndrome de Cushing dans le cadre d'une démarche d'exclusion d'un syndrome de Cushing avec probabilité élevée que le résultat soit faussement positif ;
- les examens complémentaires disponibles présentent des caractéristiques variables justifiant de choisir celui qui semble le plus adapté en fonction de la situation clinique (choix d'un test sensible avant tout lors de démarche d'exclusion, choix d'un test aussi spécifique que possible lors de démarche de confirmation)(73).

Examens d'orientation

Quelques examens d'orientation peuvent parfois renforcer la suspicion clinique de syndrome de Cushing.

Modifications biochimiques sanguines non spécifiques

Les glucocorticoïdes ont un effet hyperglycémiant chez les patients atteints de syndrome de Cushing mais dans la majorité des cas, l'insulinorésistance est compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline (15). Une hyperglycémie modérée peut parfois être observée alors que la survenue d'un diabète sucré ne concerne qu'un faible nombre de cas.

L'activité sérique des phosphatases alcalines (PAL) est élevée dans 80 à 95% des cas, elle est souvent supérieure à 1000 UI/l (15; 111). Chez le Chien, les glucocorticoïdes induisent la synthèse hépatique d'une iso-enzyme des phosphatases alcalines à l'origine de cette augmentation (112). La présence d'une hépatopathie vacuolaire participe certainement à cette augmentation. L'activité sérique de l'alanine amino-transférase (ALAT) est souvent également modérément augmentée, cette augmentation est généralement due à une hépatopathie vacuolaire cortico-induite.

La cholestérolémie et la triglycéridémie sont élevées dans 95% des cas suite à la stimulation de la lipolyse.

L'urémie est souvent diminuée, son excrétion étant augmentée par l'effet diurétique des glucocorticoïdes chez le chien (82; 111). Dans le cas d'une insuffisance rénale chronique, ses signes cliniques sont généralement masqués par ceux de l'hypercorticisme.

Une hypophosphatémie est présente chez un tiers des chiens, elle est potentiellement secondaire à l'augmentation de la sécrétion urinaire de phosphate (113). Cependant, dans une étude plus récente, une hyperphosphatémie était observée chez la majorité des chiens, peut-être de manière artéfactuelle et plutôt consécutive à l'hyperlipémie (15).

L'exploration de la fonction thyroïdienne met en évidence une baisse de la concentration en T4 (Thyroxine) basale (113), elle est le plus souvent due au rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur la sécrétion hypophysaire de TSH (Thyroid Stimulating Hormone, hormone thyroïdienne). Cette « hypothyroïdie » est considérée comme fonctionnelle et ne doit généralement donc pas être traitée.

Hémogramme

Les modifications constatées sont essentiellement une lymphopénie par lympholyse cortico-induite, une éosinopénie par séquestration, une neutrophilie par démargination capillaire et une monocytose ; plus rarement une discrète érythrocytose et thrombocytose (111).

Examen radiographique

La radiographie abdominale est un examen désuet par bien des aspects. Elle peut cependant dans quelques cas constituer un élément d'orientation diagnostique du syndrome de Cushing (114) :

- Le dépôt de tissu adipeux en région abdominale améliore le contraste radiographique.
- 80 à 90% des chiens présentent une hépatomégalie.
- La distension vésicale est souvent observée par atonie vésicale et augmentation de la diurèse.
- La visualisation d'une tumeur surrénalienne peut être possible lorsque celle-ci est calcifiée, ce qui est le cas pour 50% des tumeurs.
- Une diminution de la densité osseuse des vertèbres lombaires est visible dans 15% des cas ; elle est secondaire à l'ostéoporose induite par les glucocorticoïdes, via

l'augmentation de la résorption osseuse, de l'excrétion urinaire de calcium et la diminution de l'absorption intestinale du calcium (114).

- Des sites de calcifications ectopiques sont visibles dans moins de 10% des cas ; ils touchent principalement le bassinet, le foie, la muqueuse gastrique et les ramifications de l'aorte abdominale.

Les radiographies thoraciques montrent essentiellement une calcification des anneaux trachéaux et des parois bronchiques (114). Elles peuvent également mettre en évidence une dissémination métastatique d'un adénocarcinome surrénalien ou des signes de thromboembolie pulmonaire.

Examens diagnostiques de l'hypercorticisme spontané

En raison des variations importantes de la cortisolémie plasmatique chez l'animal sain ou malade, l'interprétation de sa valeur s'effectue toujours dans le cadre d'une exploration dynamique ou via l'appréciation de la sécrétion de cortisol sur une longue durée, approchée par mesure de la cortisolurie. Le cortisol est une hormone stable, la conservation et l'envoi des prélèvements sanguins ne requièrent donc pas de précaution particulière. Les prélèvements sont dans la plupart des cas réalisés sur des tubes secs ou héparinés, ils peuvent être conservés deux semaines à +4 °C et un an à -20 °C. Les techniques de dosage (dosages radio-immunologique, enzymo-immunologique et chimiluminescence) ont été développées pour un usage humain, les laboratoires utilisés doivent donc disposer d'une technique de dosage assez précise sur une grande échelle de cortisolémie (15). Certains corticoïdes de synthèse (hydrocortisone, (méthyl)predniso(lo)ne) peuvent interférer avec le dosage du cortisol sanguin et leur administration doit être proscrite 12 à 24 h avant le dosage du cortisol pour les formes d'action brève.

- Exclusion du syndrome de Cushing

Lorsque le tableau clinique ou les examens d'orientation sont peu évocateurs d'un syndrome de Cushing, les tests utilisés sont des tests sensibles avec une bonne valeur prédictive négative.

Le calcul du **rapport cortisol urinaire (mol/l) sur la créatinine urinaire (mol/l)** RCCU permet d'apprécier la cortisulurie sur un unique échantillon urinaire. Ce rapport reflète la quantité de cortisol libre sécrétée par l'organisme pendant la période de production de l'urine prélevée. En effet, le cortisol libre, biologiquement actif, est intégralement filtré sans réabsorption par le rein et la cortisulurie est normalisée par la créatininurie, témoin de la filtration rénale. De préférence, l'urine doit être prélevée lors de la première miction de la journée par le propriétaire. Ceci permet en effet d'appréhender une longue période de production de cortisol, entre la dernière miction de la nuit et la première miction de la matinée, hors de tout stress inhabituel c'est-à-dire au moins 48 h après une visite chez le vétérinaire. Ce prélèvement doit être conservé réfrigéré jusqu'à l'analyse.

Le RCCU est doté d'une haute sensibilité (proche de 100% dans la majorité des études). Ainsi, un résultat inférieur à $10 \cdot 10^{-6}$ (seuil variable en fonction du laboratoire utilisé) exclut un syndrome de Cushing (115; 116). Une étude a cependant rapporté une sensibilité de 75% (97) ce qui invite à poursuivre la démarche diagnostique, en fonction du contexte clinique, malgré un RCCU négatif. Ces variations de caractéristiques intrinsèques sont sans doute influencées en grande partie par la spécificité analytique du dosage de cortisol. Paradoxalement, il est probable que des dosages peu spécifiques, croisant avec d'autres stéroïdes, permettent une appréciation plus juste des animaux imprégnés en stéroïdes et donc une meilleure discrimination. De même, les valeurs publiées de spécificité diagnostique du test sont très

variables d'une étude à l'autre, avec là encore probablement un impact fort des trousse de dosages employées (117). Certaines études rapportent une spécificité faible (97; 115) alors qu'une autre étude (116) décrit une spécificité de 77%.

- Confirmation du syndrome de Cushing

Lorsque le tableau clinique et les résultats des examens d'orientation sont évocateurs d'un syndrome de Cushing, le choix du clinicien se tourne de préférence vers des tests spécifiques.

Le test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH est l'examen le plus utilisé par de nombreux cliniciens pour le diagnostic du syndrome de Cushing. Il est plus particulièrement considéré comme l'examen de choix lors du suivi thérapeutique.

Lors de syndrome de Cushing causé par un hypercorticisme spontané, quelle que soit son origine, on observe souvent, mais pas systématiquement, une augmentation excessive de la cortisolémie en réponse à une injection par voie intramusculaire ou intraveineuse d'ACTH. Cette augmentation est plus marquée que chez le chien sain (118). Une valeur poststimulation supérieure à 500 ou 700 nmol/l selon les laboratoires est en faveur d'un hypercorticisme. La sensibilité de cette exploration est donc correcte avec plus de 80% des cas détectés pour la plupart des études, sans être parfaite ; des résultats conformes aux valeurs usuelles peuvent être parfois observés lors de syndrome de Cushing, tout particulièrement lors de syndrome de Cushing d'origine surrénale (97; 119; 120). Ainsi, l'absence de résultats en faveur d'un hypercorticisme ne permet pas de conclure en présence d'un tableau clinique très évocateur. En particulier, lors de tumeur surrénalienne, compte tenu du manque de sensibilité du test, un résultat négatif doit conduire au recours à un autre examen plus sensible : le test de freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose faible.

La spécificité du test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH est bonne, supérieure à 85 % pour la plupart des études sans être, là encore, parfaite ; une réponse excessive à l'ACTH, traduisant une hyperactivité de l'axe corticotrope, peut être observée dans d'autres contextes physiologiques ou pathologiques que le syndrome de Cushing (97; 121-125).

D'autres stéroïdes synthétisés par les surrénales peuvent être également dosés pendant cette exploration fonctionnelle. Plusieurs publications se sont focalisées sur l'utilisation du dosage d'un précurseur commun à l'ensemble des voies de la stéroïdogenèse : la 17-hydroxy progestérone, abrégée 17-OH progestérone (126-129). Les caractéristiques intrinsèques de ce test de stimulation de la 17-OH progestéronémie par l'ACTH semblent similaires au test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH (130). Ainsi, cette exploration fonctionnelle ne présente un intérêt que dans les rares cas pour lesquelles, malgré une forte suspicion clinique, ni la stimulation de la cortisolémie par l'ACTH, ni le freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose faible, n'ont produit des résultats en faveur d'un syndrome de Cushing (82).

Extrêmement sensible et assez spécifique, le test de freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose faible permet souvent de confirmer ou d'infirmer l'existence d'un syndrome de Cushing en première intention ou lorsque d'autres examens complémentaires n'ont pas permis de conclure. Pour de nombreux cliniciens, il constitue l'examen de première intention sous réserve d'une non utilisation préalable de corticoïde (131). Le test de freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose faible n'est indiqué que dans le cadre du diagnostic d'un hypercorticisme spontané. Lorsqu'il existe une possibilité pour que les signes cliniques observés soient liés à une administration de corticoïdes ou de progestatifs, il est

opportun de lui préférer en première intention le test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH.

L'injection de 0,01 mg/kg de dexaméthasone (sous forme de phosphate sodique) par voie intraveineuse chez l'individu atteint d'un syndrome de Cushing n'entraîne pas de freinage de l'axe corticotrope (contrairement à l'individu sain). Les prélèvements sanguins sont effectués au moment de l'injection (T_0), 4 h après ($T_0 + 3$ ou 4 h) et 8h après ($T_0 + 8$ h) et sur chaque prélèvement le cortisol est dosé. Chez l'individu sain, la cortisolémie est alors effondrée (< 30 à 50 nmol/l selon les laboratoires) huit heures après l'injection alors que chez un chien atteint d'hypercorticisme, l'injection de la même dose n'entraîne pas un effondrement de la cortisolémie. La cortisolémie est alors dans les limites des valeurs usuelles, voire augmentée huit heures après l'injection.

La sensibilité de cette exploration est très élevée avec une absence de réponse au freinage chez quasiment 100 % des individus atteints de syndrome de Cushing. Sa spécificité est proche, quoique probablement légèrement inférieure, de celle du test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH (120).

Le diagnostic de l'hypercorticisme est confirmé lorsque :

- la valeur du cortisol à T_0 est normale ou élevée,
- la valeur du cortisol à $T_0 + 8$ h est supérieure à 40 ou 50 nmol/l selon les laboratoires.

Lors de tumeur hypophysaire, la valeur obtenue à $T_0 + 3$ ou 4 h peut mettre en évidence un freinage relatif de l'axe corticotrope (dans 60% des cas de tumeur hypophysaire), ce test

constitue alors un élément du diagnostic de l'origine hypophysaire de l'hypercorticisme (132).

Il repose sur l'obtention d'une valeur de cortisol :

- à $T_0 + 8$ h supérieure à 40 ou 50 nmol/l (diagnostic de l'hypercorticisme) et
- à $T_0 + 4$ h inférieure à la moitié de celle à T_0 , ou
- à $T_0 + 8$ h inférieure à la moitié de celle à T_0 , ou
- à $T_0 + 4$ h inférieure à 40 nmol/l.

Toutes ces explorations fonctionnelles ne doivent jamais être interprétées seules, elles ne sont que des outils de confirmation de la **suspicion clinique**. Face à toutes valeurs biologiques, c'est la présentation clinique et l'anamnèse qui priment.

3.3.2. Diagnostic de l'origine de l'hypercorticisme

Le syndrome de Cushing est majoritairement d'origine hypophysaire chez le chien. Face à cette situation, de nombreux cliniciens entreprennent un traitement hypocortisolémiant, avant tout adapté à la maladie de Cushing en l'absence d'origine étiologique certaine. Cependant, l'existence d'adénocarcinomes surrénaliens sécrétants doit encourager au diagnostic étiologique afin de proposer lorsqu'elle est indiquée et acceptée la surrénalectomie, traitement de choix dans cette indication. De la même manière, la distinction entre microadénome et macroadénome hypophysaire est fondamentale tant la présence d'un macroadénome influence la stratégie thérapeutique et conduit à un pronostic réservé. Ainsi, la présence d'un macroadénome doit encourager à la prise en charge de la tumeur hypophysaire par radiothérapie ou hypophysectomie.

Deux catégories d'examens complémentaires existent : les examens biologiques et les examens d'imagerie. Chaque clinicien, selon ses habitudes, choisit l'un des examens en

première intention. Cependant, il n'est pas rare que les résultats de ces tests soient équivoques et ne produisent pas les réponses souhaitées ; ils doivent alors être complétés par d'autres examens.

Explorations biologiques

L'épreuve de freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose forte

Le freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose forte est utilisé uniquement dans le cadre du diagnostic étiologique d'un syndrome de Cushing et suppose donc le diagnostic de syndrome de Cushing établi. Son principe est basé sur l'observation, lors de syndrome de Cushing d'origine hypophysaire, d'un "aplanissement" de l'axe corticotrope suite à l'injection intraveineuse de dexaméthasone à 0,1 mg/kg 4 ou 8 heures après l'injection (freinage). Les prélèvements sanguins sont effectués au moment de l'injection (T_0), 3 à 4 h après ($T_0 + 3$ ou 4 h) et 8 h après ($T_0 + 8$ h) et sur chaque prélèvement le cortisol est dosé. Le freinage est affirmé pour toute cortisolémie soit inférieure à la moitié de celle évaluée à T_0 pour les temps $T_0 + 3$ h, 4 h ou 8 h, soit inférieure à un seuil généralement proche de 40 à 50 nmol/l. Lors de syndrome de Cushing d'origine surrénale, l'injection intraveineuse de dexaméthasone à dose forte ne provoque pas un tel aplanissement. Cet aplanissement n'est cependant pas enregistré non plus pour tous les adénomes hypophysaires responsables d'une maladie de Cushing : vingt-cinq pour cent d'entre eux restent insensibles à la dexaméthasone (132; 133). L'épreuve est donc dotée d'une très bonne spécificité de détection des syndromes de Cushing d'origine hypophysaire c'est-à-dire qu'un aplanissement ne s'observe quasiment que lors de maladie de Cushing. L'autonomie des tumeurs surrénales rend tout de même possible une interprétation erronée de freinage explicable par une baisse liée au hasard des sécrétions tumorales à T_0+4 h ou 8 h ; ce type d'erreur est extrêmement rare (119).

A l'opposé, une absence de freinage ne permet pas de déterminer l'origine du syndrome de Cushing. Elle peut être en effet observée dans tous les cas de tumeurs d'origine surrénale et dans les 25% des cas de maladie de Cushing insensibles à l'épreuve. Cette insensibilité est particulièrement présente parmi les adénomes hypophysaires de grande taille. Ainsi, la caractérisation d'une maladie de Cushing chez un chien ne répondant pas à cette épreuve rend encore plus nécessaire la caractérisation de l'extension suprasellaire de l'adénome (35).

La mesure de la concentration plasmatique en ACTH endogène

La mesure basale de concentration plasmatique en ACTH est une technique encore relativement peu développée en médecine vétérinaire. Tout comme le freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à dose forte, le recours au dosage de l'ACTH suppose le diagnostic de syndrome de Cushing établi. Son principe est simple : lors de syndrome de Cushing d'origine surrénale, le rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol entraîne une chute de la synthèse et de la sécrétion d'ACTH. Les mesures d'ACTH plasmatique effectuées sont donc en général indétectables ou inférieures à un seuil variable d'un laboratoire à l'autre (en général proche de la limite inférieure de son intervalle de référence, soit 10 pg/ml environ pour la plupart des laboratoires. Au contraire, lors de syndrome de Cushing d'origine hypophysaire il existe une résistance au rétrocontrôle négatif du cortisol sur les cellules tumorales hypophysaires : les concentrations plasmatiques sont en conséquence non effondrées, comprises ou supérieures à l'intervalle de référence.

Le dosage de l'ACTH peut être fait avec la plupart des trousse de dosage humaines, par dosage radio-immunologique ou par chemiluminescence. Toutefois, son extrême fragilité impose de disposer d'un matériel spécifique et de suivre une procédure de prélèvement et

d'acheminement rigoureuse sous peine d'obtenir un résultat artéfactuellement effondré si ces conditions ne sont pas respectées.

Le moment du prélèvement doit idéalement être celui du prélèvement initial du test de confirmation de l'hypercorticisme, à savoir le test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH ou le freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone. A défaut, le prélèvement doit être réalisé à distance de ces tests en raison de leur interférence avec la valeur de l'ACTH basal (134).

Le sang doit être prélevé sur un tube EDTA (acide éthylènediamnetétraacétique) et centrifugé immédiatement à froid. En l'absence d'une centrifugeuse réfrigérée, le sang doit être prélevé sur un tube EDTA et aprotinine et centrifugé immédiatement à température ambiante (135). Cependant, l'utilisation de l'aprotinine n'est pas recommandée avec les méthodes de dosage par Immulite, car elle induit une diminution artéfactuelle de l'ACTH (136). Le plasma est ensuite congelé et acheminé au laboratoire sans rupture de la chaîne du froid (137).

Cette exigence préanalytique limite donc l'utilisation du dosage basal de l'ACTH plasmatique malgré la grande valeur de cet outil diagnostique. Lors d'incertitude concernant les conditions de centrifugation, stockage et acheminement du prélèvement, une valeur effondrée peut signer la présence d'une tumeur surrénale ou une dégradation de l'ACTH avant dosage (137).

Ainsi, en théorie et lorsque les conditions préanalytiques sont bien respectées, ce dosage devrait être à la fois spécifique et sensible et conduire à très peu de recouvrement entre les valeurs obtenues en cas de tumeurs hypophysaire ou surrénale. Cependant, peu d'études ont étudiées la précision diagnostique de l'ACTH dans la détermination de la cause de l'hypercorticisme (29; 136; 137). Dans ces études, certains cas sont faussement classés par le

dosage de l'ACTH. Elles ont pour la plupart utilisé d'anciennes trousse de dosage moins performantes que celles disponibles aujourd'hui, ce qui rend leur interprétation délicate.

Dans les cas difficiles, la confrontation d'un test d'exploration fonctionnelle avec un examen d'imagerie facilite souvent le diagnostic étiologique du syndrome de Cushing. En particulier, la combinaison de l'échographie et du dosage d'ACTH endogène offre une sensibilité et une spécificité très élevées (137). En revanche, ces deux examens ne permettent pas de différencier un macroadénome d'un microadénome hypophysaire.

Dosage des précurseurs de l'ACTH

L'ACTH est une hormone produite par les cellules corticotropes par clivages successifs de précurseurs de plus haut poids moléculaire. Des valeurs élevées de la concentration plasmatique de ces précurseurs ont été récemment détectées sur de petites cohortes de chiens atteint de maladie de Cushing lors de tumeur hypophysaire de grande taille (34; 46). Le dosage des précurseurs de l'ACTH constitue donc une exploration fonctionnelle susceptible de permettre un dépistage sensible des macrotumeurs corticotropes renforçant, lors de valeurs élevées, la pertinence d'un examen complémentaire d'imagerie. Son principal défaut est son manque de disponibilité à l'heure actuelle. En particulier, la trousse de dosage OCTEIA POMC n'est plus commercialisée.

Examens d'imagerie

Les explorations fonctionnelles peuvent ainsi présenter des réponses équivoques, par exemple lors d'absence de freinage de la corticolémie par la dexaméthasone à dose forte ; elles ne

permettent pas non plus de répondre à certaines questions, notamment sur le bilan d'extension et la nature d'une tumeur surrénale, ou sur la taille d'une tumeur hypophysaire.

Ainsi, l'utilisation de différentes techniques d'imagerie au sein de la démarche diagnostique associée au syndrome de Cushing s'avère nécessaire et complémentaire aux explorations fonctionnelles.

L'échographie

L'échographie est une technique relativement simple et disponible, non traumatique, permettant de visualiser les deux surrénales et les structures qui leur sont adjacentes. Cependant la visualisation des surrénales à l'échographie est étroitement liée à l'expérience du manipulateur, à la qualité du matériel utilisé et à la coopération du patient. Quatre-vingt-cinq à quatre-vingt-quinze pour cent des surrénales chez des chiens sains sont visibles à l'échographie. La surrénale gauche, plus caudale, est plus aisément visualisée. Une discrète asymétrie ne doit pas être interprétée comme anormale, en effet, les deux surrénales n'ont ni la même forme ni la même taille (138).

L'utilisation de l'échographie revêt plusieurs avantages :

- Elle permet une exploration de la cavité abdominale et la détection de masses abdominales ou de calculs urinaires.
- Elle permet de déterminer la cause du syndrome de Cushing : la visualisation des deux surrénales symétriques de taille normale ou augmentée est en faveur d'une origine hypophysaire alors que la visualisation de surrénales asymétriques ou d'une masse surrénalienne est en faveur d'une origine surrénalienne.

- Elle permet d'effectuer un bilan d'extension quand une tumeur surrénalienne est identifiée, notamment en recherchant des métastases hépatiques ou une embolisation métastatique dans la veine cave.

La taille des surrénales est déterminée en mesurant leur épaisseur, ce qui revient à mesurer une longueur suivant l'axe dorso-ventral sur une coupe sagittale (138). La limite normale supérieure de cette mesure est établie à 7,5 mm (139). L'intérêt de cette mesure, notamment par rapport à celle de la longueur de la glande en coupe longitudinale, est son absence de relation avec la taille du chien (139). D'autres mesures peuvent être effectuées lors de l'examen, en particulier la longueur sur une coupe longitudinale et la largeur maximale et minimale sur une coupe transversale ; l'obtention de plusieurs mesures augmente la sensibilité et la spécificité de l'examen échographique.

La morphométrie par échographie permet de déterminer l'origine du syndrome de Cushing de manière univoque dans les situations suivantes :

- lors de masse surrénale, avec ou sans envahissement vasculaire local, associé à une atrophie controlatérale. Ceci permet de conclure à un syndrome de Cushing d'origine surrénale avec mise au repos du reste de l'axe corticotrope ;
- lors d'un aspect normal des surrénales, résultant d'une forme normale, d'une taille symétrique et d'une échostructure normale. Ceci permet de conclure à une maladie de Cushing sans hyperplasie surrénale majeure associée, sous réserve bien évidemment de l'exactitude du diagnostic préalable de syndrome de Cushing ;
- lors d'hypertrophie symétrique et homogène des deux surrénales avec maintien de la forme générale de la glande et hypertrophie, affirmée lorsque le plus grand diamètre

de la glande est supérieur à 7-8 mm environ. Ceci permet de conclure à une maladie de Cushing associée à une hyperplasie surrénale (139; 140).

La sensibilité et la spécificité de l'échographie pour déterminer l'origine surrénale ou hypophysaire d'un syndrome de Cushing sont très élevées, probablement très proches de celles du dosage de l'ACTH plasmatique (137). Cette technique d'imagerie présente cependant dans cette indication étiologique certaines limites :

- l'interprétation des images n'est possible que lors de visualisation certaine et exhaustive des deux glandes ; elle dépend donc des qualités à la fois du manipulateur et du matériel employé. Cette visualisation est presque systématique entre des mains expertes disposant d'un matériel récent (15). Dans les rares cas où au moins une des deux surrénales n'est pas convenablement visualisée, aucun diagnostic ne doit être établi et l'échographie doit être réitérée. A défaut, un autre examen complémentaire à finalité étiologique doit être mis en œuvre.
- Les lésions surrénales peuvent parfois être équivoques rendant impossible la caractérisation d'un syndrome de Cushing, par exemple :
 - lors de masse surrénale sans atrophie controlatérale, pouvant traduire tout autant la présence :
 - d'une origine surrénale sans atrophie controlatérale,
 - d'une maladie de Cushing associée à une hyperplasie nodulaire asymétrique,
 - d'une double origine (surrénale et hypophysaire) du syndrome de Cushing,
 - d'une tumeur non corticosurrénale (ou corticosurrénale non sécrétante) présente de manière concomitante à une maladie de Cushing ;
 - lors de masses surrénales bilatérales, pouvant traduire tout autant la présence :

- d'une double origine surrénale,
- d'une maladie de Cushing associée à une hyperplasie nodulaire bilatérale,
- d'une simple origine surrénale associée à un autre processus à l'origine d'une masse controlatérale,
- d'une maladie de Cushing associée à une ou plusieurs tumeurs surrénales.

Dans tous ces cas de figure, l'emploi de l'échographie doit être complété par celui d'explorations fonctionnelles. En particulier, dès lors que l'échographie des glandes surrénales n'est pas univoque (adrénomégalie bilatérale ou tumeur surrénalienne présentant des critères de malignité), la découverte d'une asymétrie surrénalienne est difficile à interpréter en raison de l'absence de seuil permettant de définir une atrophie surrénalienne, attendue lors de tumeur surrénalienne sécrétante.

Outre ses capacités à permettre un diagnostic étiologique de syndrome de Cushing, l'échographie permet de réaliser de manière sensible un bilan d'extension local et régional des tumeurs surrénales, au moment du diagnostic étiologique, lorsque celui-ci est basé sur l'emploi de l'échographie ou suite à une exploration fonctionnelle en faveur d'une origine surrénale. En revanche, elle ne permet pas de distinguer formellement une tumeur maligne d'une tumeur bénigne. Il semble qu'une taille supérieure à 4 cm soit en faveur d'une tumeur maligne (76). De plus, contrairement à la tomодensitométrie et à l'imagerie par résonance magnétique, l'échographie ne permet pas la caractérisation de l'extension et la taille des tumeurs hypophysaires.

L'examen tomodensitométrie

Le scanner est une technique permettant d'imager les glandes surrénales ou l'hypophyse et parfois, c'est une originalité, les deux glandes surrénales et l'hypophyse au cours du même examen. Cette dernière possibilité est séduisante mais rarement pratiquée ; jusqu'à récemment, elle n'avait pas fait l'objet d'évaluation de performance diagnostique. Isolément, l'examen de l'encéphale permet de visualiser la région hypophysaire et de mettre en évidence 50% des tumeurs hypophysaires, sous réserve que leur taille soit compatible avec le seuil de détection des appareils. Une technique de scanner dynamique améliore la sensibilité de détection des microadénomes hypophysaires bien que celle-ci n'atteint pas 100% (141).

L'examen des glandes surrénales a fait l'objet d'études anciennes portant sur de petites populations (142-146).

En théorie, l'emploi de la tomodensitométrie permet de déterminer l'origine du syndrome de Cushing dans un grand nombre de cas, en particulier dans les situations suivantes :

- lors de masse surrénale avec ou sans envahissement vasculaire local et associé à une atrophie controlatérale. Ceci permet de conclure à un syndrome de Cushing d'origine surrénale ;
- lors d'aspect normal ou symétriquement hypertrophiées des surrénales. Ceci permet de conclure à une maladie de Cushing, même sans visualisation d'une tumeur hypophysaire ;
- lors de visualisation d'une tumeur hypophysaire associée à des surrénales modérément asymétriques. Ceci permet de conclure à une maladie de Cushing.

La visualisation des surrénales est quasiment systématique lors d'examen tomодensitométrique et l'appréciation de leur symétrie et de leur éventuelle hypertrophie est aisée ; en effet, le diamètre des surrénales est normalement inférieur au diamètre de l'aorte sur la même coupe. L'ajout d'une information concernant la présence d'une tumeur hypophysaire est un plus en comparaison avec l'échographie, sous réserve de disposer d'outils d'appréciation objectifs de la symétrie surrénale. Il faut reconnaître au scanner des limites pour des situations équivoques comme par exemple :

- une masse surrénale sans atrophie controlatérale, surtout en l'absence de visualisation d'une tumeur hypophysaire ;
- des masses surrénales bilatérales, quelque soient les images hypophysaires.

Dans ces situations équivoques, l'emploi du scanner doit être articulé avec celui d'explorations fonctionnelles en seconde intention.

Les principales limites à l'emploi du scanner sont le coût élevé (environ 300 euros), la nécessité d'avoir recours à une anesthésie générale et l'absence de critères fiables et objectifs pour la discrimination entre les formes dépendantes et indépendantes de l'ACTH. Son bénéfice est de permettre de dresser un bilan d'extension local et régional d'une masse surrénale, bénéfice partagé avec l'échographie abdominale, mais il permet de plus un bilan d'extension thoracique plus précis qu'une radiographie. Lors d'origine hypophysaire, il permet de caractériser une extension suprasellaire d'un adénome hypophysaire et permet donc au clinicien de détecter des tumeurs hypophysaires de grande taille nécessitant un traitement spécifique par radiothérapie, même en l'absence de signes nerveux.

L'imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique, examen de choix pour l'encéphale, est hautement pertinente pour observer l'hypophyse. En comparaison avec le scanner, elle permet une caractérisation plus précise des tumeurs hypophysaires car elle permet d'observer les adénomes intrasellaires invisibles au scanner qui ne pénètre pas dans la selle turcique, structure osseuse dans laquelle est enchâssée l'hypophyse (141). Lorsque la question posée par le clinicien concerne soit la caractérisation d'un adénome hypophysaire connu, en vue d'une hypophysectomie lors de microadénome ou d'une radiothérapie en cas de macroadénome, soit l'évaluation du parenchyme cérébral environnant lors de thromboembolie suspectée par exemple, l'IRM est préférable. Pour les autres situations, la capacité de l'IRM pour la caractérisation de la taille d'une tumeur hypophysaire par estimation du rapport de la hauteur de l'hypophyse sur l'aire de l'encéphale n'excède pas celle du scanner (33).

Ainsi, plusieurs tests fonctionnels et examens d'imagerie sont disponibles pour faciliter la discrimination des formes de syndrome de Cushing dépendantes et indépendantes de l'ACTH. Les examens d'imagerie, échographie et examen tomodensitométrique, sont généralement utilisés dans ce but en première intention. Il existe des situations équivoques en échographie surrénalienne découlant de la difficulté de déterminer un seuil pour l'atrophie de la glande surrénale ; dans ces cas, la discrimination entre une tumeur sécrétante (forme indépendante de l'ACTH) et une hyperplasie nodulaire (forme dépendante de l'ACTH) sera difficile. Dans ces cas équivoques, les explorations fonctionnelles disponibles (freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone ou dosage de l'ACTH) seront utilisées afin de discriminer avec certitude les deux formes de syndrome de Cushing. Il est à noter que le freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone ne permet d'identifier que 75% des formes dépendantes de l'ACTH. Pour cette raison, le dosage de l'ACTH par la trousse Immulite n'a pas été pratiqué sur une large

population de chiens atteints d'hypercorticisme spontané, limitant la définition d'un seuil permettant une discrimination fiable de l'origine du syndrome de Cushing.

Lors de tumeurs hypophysaires, la taille de l'hypophyse peut être très variable. Lorsque la tumeur est de grande taille, le traitement doit être approprié et un pronostic défavorable en l'absence de prise en charge de la tumeur hypophysaire par radiothérapie ou hypophysectomie doit être annoncé au propriétaire. Malgré la présence d'une tumeur de grande taille, certains chiens présentent des signes cliniques frustes et seul un examen d'imagerie de l'encéphale permet la mise en évidence de cette tumeur. Des critères cliniques aideraient le clinicien à cibler les situations pour lesquelles un examen d'imagerie de l'hypophyse semblerait particulièrement indiqué.

3.4. Traitement de l'hypercorticisme

L'évaluation de la pertinence de la mise en œuvre d'un traitement lors de syndrome de Cushing est loin d'être anodine chez un animal âgé ; la majorité des traitements disponibles comporte des effets secondaires indésirables justifiant une évaluation précise pour chaque cas du ratio bénéfice–risque.

La présentation clinique des syndromes de Cushing est très diverse. L'intérêt de traiter un chien atteint de syndrome de Cushing ne fait aucun doute lorsque les signes cliniques sont caricaturaux et gênants pour l'animal ou son propriétaire. Lorsque les signes cliniques sont discrets, le bénéfice à retirer d'un traitement est limité, avec une probabilité d'erreur diagnostique plus importante qu'en présence d'expression clinique franche ; l'animal n'est donc peut-être pas atteint de l'affection ciblée et les traitements efficaces mis en œuvre pour le syndrome de Cushing peuvent induire des effets indésirables aux conséquences graves.

Une attention particulière doit être portée aux animaux atteints d'un syndrome de Cushing, quel qu'en soit l'origine et d'une autre affection concomitante. Par exemple, la coexistence d'une insuffisance rénale rend difficile l'évaluation de la part de chacune des deux affections dans la survenue de la PUPD ou de l'amyotrophie ; au contraire, l'hypercortisolémie de l'animal atteint de Cushing peut lui permettre de continuer à s'alimenter correctement et de garder un statut pondéral correct, masquant ainsi les conséquences habituelles d'une insuffisance rénale (15). De même, l'hypercortisolémie chronique exerce une action antalgique et immunomodulatrice qui peut soulager les animaux âgés atteints d'arthrose très douloureuse et améliorer l'état de ceux touchés par une maladie autoimmune. Dans toutes ces situations où la levée de l'hypercortisolémie peut défavorablement déséquilibrer la situation clinique fragile d'un animal, on optera pour un geste thérapeutique autant que possible rapidement réversible.

3.4.1. Traitement de la maladie de Cushing

L'essentiel des traitements disponibles pour contrer le développement morbide d'un animal atteint de maladie de Cushing ont une action directement surrénale, par inhibition de la production du cortisol. Ces traitements ne ciblent donc pas la cause de la maladie et la croissance de l'adénome hypophysaire ainsi que sa capacité de sécrétion ne sont pas endiguées. Les options médicales sont principalement le mitotane et le trilostane. Dans quelques centres européens et américains, l'hypophysectomie est pratiquée. D'autres traitements médicaux ont été ponctuellement décrits parmi lesquels on peut citer les traitements limitant la stéroïdogénèse (kétoconazole, métyrapone et aminoglutéthimide) et ceux inhibant, en théorie, la sécrétion d'ACTH (sélégiline, bromocriptine, cyproheptadine et

acide rétinoïque) (15). En raison de leur utilisation très limitée, ces traitements ne font pas l'objet d'une présentation dans ce manuscrit.

O,p'-DDD (dichloro-1,1(chloro-2 phényl)-2(chloro-4 phényl)-2 éthane, Mitotane)

L'O,p'-DDD est une molécule dérivée de l'insecticide DDT, relativement ancienne, développée immédiatement après la seconde guerre mondiale. Son emploi en France par les vétérinaires n'est actuellement plus possible compte tenu de son appartenance au régime de prescription restreinte et son absence de la liste comprise dans l'Arrêté du 29 octobre 2009 relatif aux médicaments à usage humain classés dans l'une des catégories de prescription restreinte pour l'application de l'article R. 5141-122 du code de la santé publique. Les effets cytotoxiques de l'O,p'-DDD sur le cortex surrénal des chiens sont connus depuis 1949 (147). Son emploi dans le cadre de la maladie de Cushing canine a été décrit dès 1973 (148). Le principe actif permet d'effondrer la cortisolémie en obtenant une nécrose sélective des zones réticulée et fasciculée du cortex surrénal, pour rappel les zones sécrétrices des glucocorticoïdes et des stéroïdes sexuels. Compte tenu de son ancienneté, il existe presque autant de protocoles d'emploi du mitotane que de praticiens (77; 148; 149). L'un des plus répandus est basé sur son administration quotidienne à la dose de 50 mg/kg pendant une période d'induction courte, suivie par une phase de maintenance caractérisée par une forte réduction de la dose hebdomadaire de mitotane administrée. L'objectif de ce protocole était d'atteindre un état d'eucortisolémie basse, c'est-à-dire une cortisolémie après stimulation par l'ACTH inférieure à 150 nmol/l. Il n'est plus disponible aujourd'hui.

Trilostane

Le trilostane est un inhibiteur de la stéroïdogénèse, par inhibition en particulier de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase ; non cytotoxique, ce traitement est totalement réversible et nécessite en général une administration quotidienne à vie. L'utilisation du trilostane en médecine vétérinaire est récente ; son emploi en médecine humaine dans cette indication est resté très marginal en raison de son manque d'efficacité (150-152). Les données concernant la pharmacocinétique du trilostane, le protocole idéal à employer et la toxicité du produit sont insuffisantes, quelques crises addisonniennes et quelques décès inexpliqués ont par exemple été rapportés (153). Initialement, la plupart des centres européens débutaient le traitement après un bilan de base comportant un test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH et utilisaient les schémas posologiques suivants : 30 mg/animal pesant moins de 5 kg, 60 mg/animal pesant entre 5 et 20 kg et 120 mg/animal pesant plus de 20 kg, administrés per os en une seule prise avec un repas tous les jours (154-156). Puis, les schémas posologiques recommandés ont évolué avec des doses réduites à très réduites, 1 mg/kg 2 fois par jour ou 2 mg/kg une fois par jour (157-159). Dans certains cas, une administration triquotidienne est nécessaire (160). Cette mise en œuvre du traitement est suivie par une évaluation clinique de l'animal après une semaine de traitement, complétée par un test de stimulation (prise du trilostane et test le matin même) ; une modulation de la dose est décidée jusqu'à combiner une amélioration des signes cliniques et une cortisolémie après stimulation par ACTH comprise entre 30 et 150 nmol/l. L'évaluation du traitement est par la suite mensuelle puis trimestrielle.

Le trilostane est un traitement plus récent que le mitotane mais les données recueillies à ce jour sont néanmoins en faveur d'une grande efficacité du produit, proche de celle du mitotane. Il est par ailleurs bien toléré et d'une grande simplicité d'utilisation, certainement supérieure à

celle du mitotane pour un clinicien peu expérimenté (154; 155; 157; 158; 161-163). Sa réversibilité rapide constitue un avantage précieux en comparaison au mitotane. En revanche, le traitement quotidien à vie peut en faire un traitement très onéreux.

Hypophysectomie

Un traitement étiologique par hypophysectomie transsphénoïdale a été développé à grande échelle à l'université d'Utrecht aux Pays-Bas. Les résultats publiés le plus récemment sont très encourageants, même si l'on peut regretter l'absence d'une étude randomisée comparative avec un traitement médical de référence. Cependant, les données publiées semblent comparables voir supérieures aux données publiées pour l'O,p'-DDD ou le trilostane, en particulier sur l'espérance de vie, la fréquence des complications et le taux de récurrence (36). Les chiens traités par cette approche nécessitent cependant une supplémentation thyroïdienne à vie ainsi qu'une supplémentation en hormone antidiurétique en général transitoire rendue nécessaire par l'exérèse de l'ensemble de l'hypophyse chez le chien, contrairement à l'homme où seule l'adénomectomie est pratiquée. Ce type d'acte reste réservé à des chirurgiens expérimentés : les résultats le concernant se sont nettement améliorés pendant que l'équipe qui développait l'hypophysectomie s'aguerrissait (164). Son manque de disponibilité reste donc actuellement son principal inconvénient.

Radiothérapie

L'indication de la radiothérapie concerne les volumineux adénomes hypophysaires caractérisés par un diamètre supérieur à un seuil compris entre 5 mm et 1 cm selon le format du chien et prédisposant aux atteintes fonctionnelles du système nerveux ou d'autres axes endocriniens, avérées ou attendues dans un avenir proche. Sans radiothérapie, ces tumeurs

condamnent l'animal à une rapide dégradation de la qualité de vie suivie d'une demande d'euthanasie ; l'espérance de vie de l'animal est en général très courte (165). Il est indispensable de comprendre que le traitement par radiothérapie ne garantit pas de normaliser la sécrétion d'ACTH et donc la cortisolémie ; cet objectif est inconstant, souvent non atteint et peut ne survenir que plusieurs mois après le protocole de radiothérapie (166). Il est donc indispensable de lui associer un traitement anticortisolémiant. Par contre, l'effet de la radiothérapie sur la croissance du macroadénome est patent dans l'extrême majorité des cas avec une stabilisation, voire une diminution de la taille de la tumeur hypophysaire (167-169).

La plupart des protocoles proposent des doses comprises entre 36 à 48 Gy au total, fractionnées en une douzaine de séances réparties sur quatre à six semaines (168-170). L'espérance de vie est allongée et la qualité de vie très correctes sous traitement, proches de celles enregistrées pour les maladies de Cushing sans distinction de la taille de l'adénome corticotrope. Les principales limites de cette approche thérapeutique restent, à l'heure actuelle, son coût relativement important et sa difficulté de mise en œuvre en raison d'un accès limité aux centres spécialisés en radiothérapie.

3.4.2. Traitement du syndrome de Cushing d'origine surrénale

Surrénalectomie

Malgré une mortalité périopératoire non négligeable, supérieure à 25% selon plusieurs études rétrospectives, la surrénalectomie demeure le traitement de choix lors de syndrome de Cushing (66; 67; 171-174). L'indication chirurgicale existe lorsqu'un bilan d'extension loco-régional et à distance est effectué et ne révèle pas d'extension tumorale majeure. Deux voies d'abord, paracostale et médiane, sont décrites ; leur choix dépend principalement des

habitudes du chirurgien et de la confiance affichée concernant le bilan d'extension préopératoire (visualisation des surrénales, des vaisseaux adjacents et du foie, site possible de métastases, plus complète pour la voie médiane) (175).

Outre les risques inhérents à toute chirurgie abdominale (hémorragie, infection, déhiscence de plaie, pancréatite) majorés dans ce cas précis, deux risques spécifiques à la réalisation de la surrénalectomie doivent être anticipés : le risque thrombo-embolique (98; 101) et le risque d'insuffisance surrénale. Seul le second peut réellement être prévenu efficacement, par exemple en administrant par voie sous-cutanée 0,1 mg de dexaméthasone toutes les 12 h, la première dose étant administrée au moment de l'anesthésie et les suivantes à moduler en fonction des tests de stimulation réalisés lors du suivi. Dès que l'animal peut se nourrir, un relais per os est possible par la prednisolone, à raison de 0,2 à 0,5 mg toutes les 12 h, à diminuer progressivement en fonction des tests de stimulation.

L'exérèse d'une tumeur surrénale à l'origine d'un syndrome de Cushing offre un gain d'espérance de vie avec une médiane supérieure à 2 ans, quelque soient les études rétrospectives concernant ce geste (66; 67) ; cette survie est très supérieure aux alternatives médicales évaluées jusqu'à présent et cela d'autant plus qu'il s'agit d'une survie associée à une guérison en cas d'exérèse d'une masse bénigne (40% des cas environ) ou à une rémission clinique de longue durée lors de carcinome (176-178).

Alternatives médicales à la surrénalectomie

Un traitement médical anticortisolémiant peut être envisagé lorsque le bilan d'extension est en défaveur d'un geste chirurgical ou que celui-ci est refusé par le propriétaire, ou lors de récurrence après chirurgie liée à la présence de métastases sécrétantes.

O,p'-DDD (Mitotane)

L'O,p'-DDD est le traitement de référence du carcinome surrénal non opérable chez l'homme (179); chez le chien, il bénéficie de plus de recul dans cette indication que les autres traitements médicaux disponibles (78). Il était employé à dose plus importante que lors de maladie de Cushing. La phase d'induction avait pour objectif un « effondrement de la cortisolémie » associée à une diminution de la croissance tumorale. On employait en général 50-75 mg/kg/jour en 2 prises pendant 10 à 14 jours en moyenne, à moduler en fonction de l'évolution du tableau clinique et de contrôles par tests de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH. Une supplémentation en glucocorticoïdes (exemple : prednisone : 0,2 mg/kg/jour) était systématiquement associée. Cette première étape était suivie par une phase de maintenance dont l'objectif était de contenir la cortisolémie à une valeur très faible et de ralentir la croissance tumorale. On employait en général 75-150 mg/kg/semaine (posologie moyenne fonction de l'efficacité de l'induction) répartis en deux à six prises hebdomadaires tout en maintenant la supplémentation en glucocorticoïdes.

Trilostane

L'emploi palliatif du trilostane dans cette indication offre une rémission partielle ou complète, avérée par l'augmentation de l'activité, la baisse de la prise de boisson et le retour vers un aspect normal de l'animal. Cette rémission longue, parfois de plusieurs années, est remarquable dans un contexte de tumeur maligne (176-178). Ces observations confirment par ailleurs la croissance lente de ces tumeurs, le trilostane n'exerçant aucune action antiproliférative connue.

3.4.3. Evolution

Peu de données concernant l'évolution clinique sans traitement de chiens atteints de syndrome de Cushing sont disponibles. Il est cependant probable que cette évolution puisse être longue, relativement proche de celle observée sous traitement. La plupart des décès observés imputables à la maladie ont pour origine une thrombo-embolie, complication possible qui ne concerne pas l'ensemble des chiens atteints de syndrome de Cushing. Chez les chiens non traités, on observe une lente aggravation des signes cliniques. Au contraire, l'ensemble des traitements de référence décrits précédemment (hypophysectomie, mitotane ou trilostane pour la maladie de Cushing, surrénalectomie pour les syndromes de Cushing d'origine surrénale) sont associés à des rémissions complètes, plus rarement partielles, avec une espérance de vie considérablement allongée, voire une guérison totale en cas d'exérèse d'un adénome surrénal par exemple. Cette qualité de vie distingue donc les chiens traités des chiens non traités, beaucoup plus que leur médiane de survie respective, comprise dans les 2 cas entre deux et trois ans.

Le syndrome de Cushing chez le chien recouvre une expression clinique extrêmement polymorphe. Son diagnostic nécessite une grande méthode ; il est basé sur l'emploi d'examens complémentaires offrant chacun des réponses singulières et dont le choix repose sur l'hypothèse privilégiée par le clinicien. La caractérisation précise d'un syndrome de Cushing incluant la détermination de son origine, l'évaluation des lésions hypophysaires ou surrénales impliquées et d'une éventuelle extension tumorale est déterminante pour effectuer le choix thérapeutique le plus pertinent. Cette caractérisation fine est compromise dans de rares cas de résultats équivoques des examens complémentaires ou lorsque les examens

d'imagerie coûteux ne peuvent être financés par le propriétaire. Elle est pourtant nécessaire à la réalisation d'un traitement optimal. Le traitement chirurgical des maladies de Cushing reste peu disponible et aucun traitement médical ne permet de traiter aujourd'hui efficacement la cause de cette maladie, à savoir une dérégulation de la sécrétion d'ACTH.

4. Hypercorticisme spontané chez le chat

Alors qu'il est bien décrit chez le chien, le syndrome de Cushing reste une dysendocrinie rarement décrite chez le chat. Le contexte clinique permettant de suspecter la maladie est différent de celui rencontré chez le chien. Ainsi chez le chat, une grande proportion d'animaux sera diagnostiquée dans un contexte d'un diabète sucré qui bien que secondaire à un syndrome de Cushing furtif, a constitué le motif initial de consultation. La difficulté d'équilibrer par la suite le diabète sucré constituera le point de départ d'une investigation poussée menant finalement au diagnostic du syndrome de Cushing princeps.

4.1. Classification des différentes formes d'hypercorticisme chez le chat

Le syndrome de Cushing félin est aussi le résultat d'un excès de sécrétion de glucocorticoïdes par les glandes surrénales.

L'origine la plus fréquemment rencontrée est centrale, secondaire à un adénome hypophysaire, dans 80 à 85% des cas (180-182). Les formes surrénaliennes sont rencontrées dans 15 à 20% des cas avec autant de formes bénignes (adénomes), que malignes (carcinomes). Certains carcinomes surrénaliens bien différenciés peuvent produire des hormones stéroïdiennes sexuelles et notamment de la progestérone (183; 184).

Concernant les formes hypophysaires, il est possible de rencontrer des macro et microadénomes. Chez le chat, il semblerait que l'incidence des macroadénomes (hauteur de l'hypophyse supérieure à 6 mm) soit plus élevée (environ 50% des tumeurs hypophysaires seraient des macroadénomes) en comparaison avec le chien (180; 185). Comme chez le chien, les cas de carcinome hypophysaire sont anecdotiques.

Une dizaine de cas de formes iatrogènes secondaires à l'administration de corticoïdes est également rapportée dans la littérature, secondairement à la prescription de corticoïdes longue action administrés par voie parentérale, orale ou topique, ou de progestagènes, en particulier d'acétate de mégestrol (186).

4.2. Epidémiologie et manifestations cliniques de l'hypercorticisme spontané chez le chat

4.2.1. *Epidémiologie*

Les chats atteints sont généralement âgés, avec une moyenne d'âge entre 10 à 13 ans selon les études (180-182). Aucune prédisposition raciale ou sexuelle n'a été démontrée. Environ 150 cas sont répertoriés dans la littérature à ce jour.

4.2.2. *Manifestations cliniques*

Signes cliniques

Les signes cliniques les plus fréquemment rencontrés sont une polyphagie, des signes cutanés ainsi qu'une fonte musculaire, rapportée dans 70% des cas. Les signes cutanés constituent un bon signe d'appel : présence d'une peau fine (70%), d'une alopecie (60%) et d'une fragilité cutanée pouvant aller jusqu'à la rupture (57%) ou d'un état séborrhéique (13%). Parmi ces signes cliniques, la fragilité cutanée est le signe le plus spécifique.

Une distension abdominale est observée dans 50% des cas. Enfin, dans moins de 50% des cas, un abattement, une perte de poids et une dysorexie peuvent être observés (180-182).

Une PUPD est également très fréquemment rencontrée. Elle accompagne la présence d'un diabète sucré qui est présent dans 80% des cas d'hypercorticisme chez le chat. En effet,

contrairement au chien, la PUPD n'est pas présente lors d'hypercorticisme spontané ou iatrogène isolé, c'est-à-dire sans diabète sucré ni diabète insipide central secondaire à un macroadénome hypophysaire (180-182).

Enfin, des troubles nerveux secondaires à un macroadénome hypophysaire sont également possibles tels qu'une cécité, une démarche compulsive, une marche en cercle et des vocalisations (185).

Complications

Le syndrome de Cushing chez le chat est très fréquemment associé à un **diabète sucré**. En effet, on estime qu'un diabète sucré est présent dans 80 à 90% des cas d'hypercorticisme félin (180; 182). Dans ce contexte, il est suspecté que l'hypercorticisme soit primaire, à l'origine d'un diabète sucré secondaire. Le délai moyen entre le diagnostic des deux maladies est estimé à quatre mois environ (variation de 0 à 24 mois). En l'absence de signes cliniques spécifiques de l'hypercorticisme, par exemple les signes cutanés, l'exploration de l'hypercorticisme se fait souvent dans le contexte d'un diabète sucré mal équilibré voire insulino-résistant.

Une **hypertension artérielle systémique** est rencontrée chez 19% des cas (180). La plupart du temps, cette hypertension n'a pas de conséquence sur les organes cibles que sont l'encéphale, les reins, la rétine et le myocarde. Toutefois, un cas d'hypertension artérielle grave avec décollement rétinien bilatéral a été décrit chez un chat présentant un hypercorticisme spontané (187).

4.3.Diagnostic de l'hypercorticisme et de son origine

4.3.1. Diagnostic de l'hypercorticisme

Examens d'orientation

Contrairement au chien, l'analyse urinaire ne montre une diminution de la densité urinaire que chez 37% des chats ; elle est très modérée, comprise entre 1,020 et 1,040 dans la majorité des cas. Par ailleurs, 75% des individus sont protéinuriques et 20% des chats présentent une bactériurie (182).

Chez les chiens atteints d'hypercorticisme, l'anomalie biochimique la plus fréquemment rencontrée (85 à 90% des cas) est une augmentation de l'activité des PAL. Chez le chat, cette augmentation est nettement moins fréquente et reflète plutôt une stéatose hépatique ou alors une cholestase secondaire à une pancréatite. Une augmentation modérée d'activité de l'ALAT (27% des cas), une hypertriglycémie (71% des cas) et dans une moindre mesure une hypercholestérolémie (25% des cas) peuvent également être rencontrées. Enfin, une hyperglycémie est présente chez les chats atteints qui développent un diabète sucré. L'hémogramme n'est que modérément modifié, avec éventuellement une formule leucocytaire de stress dans 50% des cas.

Confirmation du diagnostic d'hypercorticisme spontané chez le chat

Le diagnostic de syndrome de Cushing chez le chat s'effectue comme chez le chien en deux temps : diagnostic de l'hypercorticisme puis détermination de son origine. L'absence de technique de référence et le faible nombre de cas diagnostiqués ne permet pas une évaluation rigoureuse des caractéristiques intrinsèques des tests disponibles.

Le rapport cortisol/créatinine urinaire (RCCU)

Le rapport du cortisol urinaire sur la créatinine urinaire (RCCU) est un examen complémentaire intéressant, relativement sensible, mais peu spécifique. Le dosage doit être réalisé sur des urines émises le matin, au domicile de l'animal afin d'éviter tout stress pouvant potentiellement modifier le résultat. Bien que cet examen soit intéressant, et semble plus spécifique que chez le chien, un résultat élevé seul ne peut permettre de conclure. En effet, certaines situations telles que l'hyperthyroïdie sont associées à une augmentation du RCCU (188). La suspicion doit alors être confirmée par un autre test diagnostique, notamment un test de freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à faible dose.

Le test de freinage de la cortisolémie par la dexaméthasone à faible dose

Le test de freinage à la dexaméthasone à faible dose est considéré comme le test de choix pour diagnostiquer l'hypercorticisme félin. Néanmoins, son usage chez le chat doit se conformer à une procédure particulière.

Tout d'abord, la dose de dexaméthasone recommandée pour ce test chez le chat est 10 fois supérieure à celle du chien (0,1 mg/kg IV plutôt que 0,01 mg/kg). En effet, 20% des chats sains ou atteints de maladie non surrénalienne ne présentaient pas de freinage à la dose de 0,01 mg/kg (189).

Le diagnostic repose sur la valeur du cortisol 8 heures après (T_0+8 h) l'injection de dexaméthasone. Chez un animal sain, cette valeur est effondrée (<30 nmol/l, valeur variable en fonction du seuil établi par le laboratoire) alors que chez les chats atteints d'hypercorticisme, la concentration de cortisol à T_0+8 h post injection de dexaméthasone est supérieure à 40 nmol/l.

Le test de stimulation de la cortisolémie par l'ACTH

Dans l'espèce féline, la sensibilité du test de stimulation à l'ACTH (30% à 56% selon les études) est faible (182; 190). De ce fait, ce test n'est pas recommandé comme examen diagnostique chez le chat, sauf en cas de forte suspicion d'hypercorticisme iatrogène (186). Le protocole de ce test (dose injectée et temps de prélèvement sanguin) diffère selon les laboratoires. Un des protocoles recommandé consiste à l'injection de 125 μ g de tétracosactide et de collecter du sang avant l'injection puis 60, 90 120 et 180 minutes après.

Le dosage des hormones sexuelles (184; 190)

Chez le chat, quelques cas d'hypercorticismes atypiques ont été décrits. Dans ces cas, des hormones stéroïdiennes sexuelles sont sécrétées en excès entraînant un tableau clinique d'hypercorticisme alors que les tests diagnostiques, évaluant la cortisolémie, sont en défaveur d'un hypercorticisme. En cas de suspicion d'hypercorticisme atypique, il est donc recommandé de doser la progestérone, l'œstradiol et la testostérone avant et après stimulation à l'ACTH.

4.3.2. Diagnostic de l'origine de l'hypercorticisme

Quatre tests sont disponibles afin de déterminer l'origine de l'hypercorticisme du chat :

- Le dosage de l'ACTH endogène ;
- Le test de freinage de la cortisolémie à la dexaméthasone faible et forte dose ;

- Le test de freinage du RCCU après administration de dexaméthasone per os ;
- Les examens d'imagerie médicale (échographie abdominale, examen tomodensitométrique et examen d'imagerie par résonance magnétique).

Chez les chats atteints d'hypercorticisme hypophysaire, la concentration en ACTH endogène est normale à augmentée (≥ 80 pg/ml ou ≥ 18 pmol/l), tandis que chez les chats atteints de formes surrénalienne ou iatrogène, elle est basse à indétectable (≤ 20 pg/ml ou $\leq 4,4$ pmol/l) (190). Néanmoins, les conditions préanalytiques de ce dosage sont contraignantes (plasma EDTA congelé immédiatement ou plasma EDTA-aprotinine congelé après centrifugation).

Le test de freinage de la cortisolémie à la dexaméthasone forte dose est utilisé à des fins diagnostiques étiologiques. Administré à la dose de 1,0 mg/kg IV, la cortisolémie doit être évaluée à T_0 , T_0+4 h et T_0+8 h. Un freinage à 4 h ou à 8 h (défini comme une valeur de cortisol 4 h ou 8 h après l'injection inférieure à 40 nmol/l ou inférieure à la moitié de la valeur obtenue à T_0) est en faveur d'une origine hypophysaire. Néanmoins, une absence de freinage peut être observée lors d'origine hypophysaire et surrénalienne.

Comme chez le chien, les valeurs de cortisol obtenues à 4 h et 8 h lors de la réalisation d'un test de freinage de la cortisolémie à faible dose peuvent être utilisées à des fins diagnostiques étiologiques. En effet, si la valeur à 4 h est inférieure à 40 nmol/l ou si les valeurs à 4 h et à 8 h sont inférieures à la moitié de celle obtenue à T_0 , le résultat est en faveur d'une origine hypophysaire. Cependant, seulement 22% des chats atteints d'une forme hypophysaire présentent un freinage (180). Une alternative moins invasive - le test de freinage du RCCU après administration de dexaméthasone per os - est réalisable au domicile sur 3 jours, dont le principe est le suivant :

1. Recueil des urines le matin du jour 1 et le matin du jour 2 par le propriétaire au domicile ;
2. A partir du jour 2, administration de trois doses de dexaméthasone à 0,1 mg/kg à 8 heures d'intervalle à 8h00, 16h00 et minuit ;
3. Recueil d'un troisième échantillon d'urine le matin du jour 3. Un RCCU est réalisé sur ces trois échantillons.

La moyenne des deux premiers RCCU donne la "valeur de base", en faveur d'un hypercorticisme si cette valeur est supérieure à 36.10^{-6} . Le freinage est positif si la valeur du RCCU au jour 3 est inférieure à 50% de la valeur basale. Comme pour le protocole IV, les chats atteints d'hypercorticisme surrénalien ne freinent pas, alors que les chats atteints d'hypercorticisme hypophysaire peuvent ou non présenter un freinage.

Ce protocole est privilégié au précédent par certains cliniciens parce qu'il est facile à réaliser, à interpréter, donne des résultats plus fiables que le protocole IV, réduit le stress de l'animal et le risque d'ecchymoses après ponction veineuse.

Comme chez le chien, l'échographie abdominale et l'imagerie tomodensitométrique peuvent être utilisés pour différencier les formes hypophysaires des formes surrénaliennes. Une taille normale ou une augmentation de taille symétrique des surrénales sont évocatrices d'une forme hypophysaire. A contrario, une augmentation de taille unilatérale associée à une atrophie controlatérale est évocatrice d'une forme surrénalienne. Dans les mains d'un imageur expérimenté, la précision de l'échographie abdominale dans cette indication est de 93% (182).

Lors de maladie de Cushing, la grande fréquence des macroadénomes hypophysaires doit conduire à préconiser un examen d'imagerie de l'encéphale.

Lors de tumeur surrénales, un bilan d'extension loco-régional et pulmonaire doit être réalisé à l'aide d'une échographie abdominale et d'une radiographie ou examen tomodensitométrique du thorax ; un scanner thoraco-abdominal peut également être prescrit.

4.4. Traitement de l'hypercorticisme

4.4.1. Traitement des formes hypophysaires

En médecine humaine, le traitement de choix des formes hypophysaires est l'adénomectomie hypophysaire. En médecine vétérinaire, seule l'hypophysectomie est décrite et cette technique reste très peu disponible. Les risques per et postopératoires sont par ailleurs importants. En Europe, cette procédure chirurgicale est réalisée principalement aux Pays-Bas et en Angleterre. Dans les mains d'un chirurgien expérimenté, les résultats semblent très encourageants avec des rémissions allant de six à 46 mois, permettant dans certains cas une rémission des signes cliniques liés à l'hypercortisolisme ou au diabète sucré (191). Une adrénalectomie bilatérale a également été plus rarement citée afin de traiter les formes hypophysaires (180).

L'alternative au traitement chirurgical est médicale. Chez le chat, le choix thérapeutique est identique à celui du chien. Le mitotane a produit des résultats très décevants ; le trilostane en revanche semble être efficace avec peu d'effets secondaires, permettant une amélioration significative des signes cliniques. Il est recommandé d'administrer le trilostane à la dose initiale de 10-30 mg par animal une à deux fois par jour, au moment du repas (182; 192-194).

Le suivi du traitement est identique à celui du chien, avec des ionogrammes et tests réguliers de stimulation à l'ACTH, notamment 10 jours, puis 1 mois, puis 3 mois après la mise en place du traitement. Comme chez le chien, le test doit être réalisé 2 à 3 h après l'administration du

comprimé. Si l'animal présente un diabète sucré concomitant, le traitement médical ne permet que rarement de sevrer totalement l'animal en insuline. Il est toutefois rapporté une diminution de 35% des besoins en insuline chez 2/3 des chats traités au trilostane (194).

4.4.2. Traitement des formes surrénaliennes

Dans les cas de tumeur surrénalienne, le retrait de la glande surrénale atteinte est recommandé. Bien que l'exérèse chirurgicale soit un traitement efficace, les risques per et postopératoires ne sont pas négligeables : hémorragie, anorexie et léthargie (183), thromboembolie, crise Addisonienne, pancréatite, sepsis, pneumonie et déhiscence de plaie (195). Si la tumeur est retirée avec succès, l'hypercortisolisme et le diabète sucré peuvent rétrocéder, ou permettre à l'animal d'être mieux équilibré (180; 183; 195).

Le syndrome de Cushing chez le chat est une dysendocrinie rare bien que probablement sous-diagnostiquée. Sa présentation clinique, polymorphe, est moins caricaturale que dans l'espèce canine. Les examens complémentaires disponibles sont par ailleurs moins bien caractérisés mais semblent parfois manquer de spécificité. Ce manque de spécificité rend le diagnostic de l'hypercorticisme difficile chez le chat alors que les formes d'origine hypophysaire semblent être plus fréquemment agressives dans cette espèce.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

La maladie de Cushing est une forme de syndrome de Cushing (hypercorticisme) causée par le développement de tumeurs corticotropes d'agressivité variable, sécrétant de l'ACTH de manière non contrôlée. Elle est rare dans l'espèce humaine (0,2 à 5 cas/million d'habitants/an, prévalence de 39 à 76 par million) (196) mais elle est plus fréquente chez le chien avec une prévalence calculée au Royaume-Uni de trois cas pour mille chiens (0,28%) (74). Cette fréquence plus élevée confère à la maladie de Cushing canine un potentiel de modèle animal préclinique spontané, sous réserve qu'un recensement aussi exhaustif que possible des caractéristiques cliniques et pathologiques soit établi à des fins de comparaison avec l'affection humaine homologue. Cette caractérisation fine nécessite une validation parallèle d'outils diagnostiques précis.

La maladie de Cushing constitue la forme quasi unique des syndromes de Cushing dépendant de l'ACTH et s'oppose par son pronostic et les traitements de référence utilisés aux syndromes de Cushing indépendants de l'ACTH chez le chien et chez l'homme. Plusieurs outils sont employés pour discriminer l'origine du syndrome de Cushing chez le chien, sans avoir réellement fait l'objet de validation sur grandes séries. Des erreurs de détermination d'origine sont rapportées et probablement sous estimées, faute d'évaluation des caractéristiques intrinsèques des outils diagnostiques employés. Ces erreurs de phénotypage sont à la fois une limite à une prise en charge adéquate de certains syndromes de Cushing chez le chien et un frein à toute action de caractérisation poussée du modèle. Ce type d'erreur est particulièrement accru lorsque le diagnostic est basé sur l'imagerie des glandes surrénales ; l'asymétrie équivoque des surrénales est en effet notée lors de syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH et lors d'hyperplasie surrénale asymétrique dépendante de l'ACTH.

La distinction entre dépendance et indépendance à l'ACTH requiert de réaliser une mesure de la concentration plasmatique en ACTH mais la précision diagnostique de cette valeur reste mal cernée : par exemple, des cas jugés dépendants de l'ACTH ont parfois été décrits avec une valeur inférieure à la limite de détection, ce type d'observation pouvant être expliqués par une sensibilité analytique insuffisante des outils employés, une pulsatilité du système ou des erreurs de phénotypage (29; 76; 137). Chez le chat, le diagnostic de l'hypercorticisme est difficile notamment à cause du manque de spécificité des outils biologiques disponibles.

Dans le contexte d'une médecine comparée, l'objectif initial de notre travail de thèse a donc été d'apporter aux vétérinaires, médecins et scientifiques des critères fiables de classification de l'hypercorticisme chez le chien et de développer chez le chat des outils diagnostiques innovant pour la maladie de Cushing.

La première partie de notre travail a consisté à définir précisément les critères biologiques ou morphologiques de classification des deux formes de syndrome de Cushing, dépendante ou indépendante de l'ACTH. Dans cette partie, les valeurs de la concentration sanguine en ACTH, les mesures échographiques et l'examen tomодensitométrique des glandes surrénales ont été réalisés et analysés sur une large population de chiens dans le but d'obtenir des seuils fiables de classification des formes de syndrome de Cushing dépendants ou indépendants de l'ACTH.

La seconde partie a consisté à définir des critères cliniques et biologiques susceptibles de refléter l'agressivité des tumeurs corticotropes à l'origine de la maladie de Cushing. Dans cette partie, nous avons évalué une éventuelle corrélation entre la taille de la tumeur hypophysaire et des paramètres faciles à évaluer lors de l'examen clinique, tels que la température corporelle et la fréquence cardiaque. Nous avons également souhaité déterminer si chez le

chat, développant spontanément des formes de maladie de Cushing à prédominance agressive, le dosage des précurseurs de l'ACTH pouvait constituer une aide au diagnostic.

Enfin, la dernière partie de ce travail a consisté à étudier la maturation de la proopiomélanocortine au sein de tumeurs corticotropes extraites de chiens atteints de maladie de Cushing, avec pour objectif de rechercher une altération de cette maturation dans les tumeurs corticotropes les plus agressives.

RESULTATS

1. Différenciation des deux formes de syndrome de Cushing décrites chez le chien par des critères biologiques et morphologiques

1.1.Introduction

La caractérisation précise de la forme du syndrome de Cushing est importante aussi bien pour préciser le pronostic que pour prescrire une prise en charge thérapeutique optimale.

1.2.Critère biologique : dosage de l'ACTH plasmatique

Notre priorité a été de classer sans ambiguïté les cas de Cushing dépendants ou indépendants de l'ACTH chez le chien selon la valeur de la concentration plasmatique en ACTH. Le travail présenté dans l'article qui suit décrit ces mesures, à l'aide d'une trousse commerciale validée dans l'espèce canine, sur une cohorte de 109 chiens atteints de syndrome de Cushing spontané, allotés sans ambiguïté à l'aide de plusieurs critères stricts selon leur dépendance ou indépendance à l'ACTH. En utilisant un seuil de 5 pg/ml, nous avons conclu à l'absence de recouvrement des valeurs entre les deux groupes des chiens, démontrant ainsi la robustesse de ce dosage pour établir l'origine étiologique du syndrome de Cushing.

Accuracy of an ACTH immunoluminometric assay in differentiating ACTH-dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in dogs

M.I. Rodríguez Piñeiro*, **G. Benckroun***, P. de Fornel-Thibaud, C. Maurey-Guenec, F. Garnier, and D. Rosenberg.

J Vet Intern Med 2009, 23:850-855.

* copremière auteur

Accuracy of an Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) Immunoluminometric Assay for Differentiating ACTH-Dependent from ACTH-Independent Hyperadrenocorticism in Dogs

M.I. Rodríguez Piñeiro*, G. Benckekroun*, P. de Fornel-Thibaud, C. Maurey-Guenec, F. Garnier, and D. Rosenberg

Background: Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) determination has been used for 30 years to distinguish ACTH-dependent hyperadrenocorticism (ADHAC) from ACTH-independent hyperadrenocorticism (AIHAC) in dogs. However, the few studies that have evaluated its diagnostic accuracy, based in the majority of cases on older assays, have been associated with systematic, but highly variable proportions of misclassified or unclassified cases.

Objective: The purpose of the present study is to evaluate the accuracy of a validated ACTH immunoluminometric assay (ILMA) for differentiating between ADHAC and AIHAC.

Animals: One hundred and nine dogs with hyperadrenocorticism were included: 91 with ADHAC and 18 with AIHAC.

Methods: Retrospective study. Dogs displaying feedback inhibition after the dexamethasone suppression test, adrenal symmetry, or both were considered to have ADHAC. AIHAC was demonstrated by adrenal tumor histology. For each group, ACTH determination by ILMA was reviewed.

Results: In the ADHAC group, plasma ACTH measurements ranged between 6 and 1250 pg/mL (median, 30 pg/mL). In the AIHAC group, all ACTH concentrations were below the lower quantification limit of the assay (<5 pg/mL). The 95% confidence interval was 85–100% for sensitivity and 97–100% for specificity in AIHAC diagnosis.

Conclusion and Clinical Importance: No overlap in ACTH concentrations was observed between dogs with ADHAC and dogs with AIHAC. The use of a new technique with high analytical sensitivity made it possible to use a low threshold (5 pg/mL), avoiding the misclassification of some ADHAC cases with low, but quantifiable concentrations of ACTH. The assessment of ACTH concentrations by ILMA is an accurate tool for differentiating between ADHAC and AIHAC.

Key words: Adrenal gland; Adrenocortical tumors; Adrenocorticotrophic hormone; Endocrinology.

Hyperadrenocorticism (HAC), or Cushing's syndrome, is a commonly diagnosed endocrine disorder in dogs. Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-dependent hyperadrenocorticism (ADHAC) is the most common form of HAC.¹ Pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH) was for many years the only known form of ADHAC in dogs, but unusual cases of ectopic ACTH secretion recently have been described.^{2,3} In 10 to 15% of canine cases, HAC is ACTH-independent (AIHAC). The major form of AIHAC is triggered by a functional adrenocortical tumor (adenoma or carcinoma) and generally designated as adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH). A case of food-dependent HAC similar to that described in human medicine was recently described in a dog.⁴ This type of case, probably associated with ectopic adrenocortical

Abbreviations:

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ADH	adrenal-dependent hyperadrenocorticism
ADHAC	ACTH-dependent hyperadrenocorticism
AIHAC	ACTH-independent hyperadrenocorticism
BW	body weight
CT	computed tomography
HAC	hyperadrenocorticism
HDDST	high-dose dexamethasone suppression test
ILMA	immunoluminometric assay
IRMA	immunoradiometric assay
LDDST	low-dose dexamethasone suppression test
PDH	pituitary-dependent hyperadrenocorticism
RIA	radioimmunoassay

From the Internal Medicine Unit, National Veterinary School of Alfort, Maisons-Alfort, France (Rodríguez Piñeiro, Benckekroun, de Fornel-Thibaud, Maurey-Guenec, Rosenberg); the Department of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Faculty of Lugo, University Campus, Lugo, Spain (Rodríguez Piñeiro); the Veterinary Anticancer Center, Maisons-Alfort, France (de Fornel-Thibaud); and the Biochemistry Unit, National Veterinary School of Lyon, Marcy l'Étoile, France (Garnier). Part of this work was presented at the ECVIM-CA Congress, in Ghent (Belgium), in September 2008.

*Contributed equally to this work.

Corresponding author: Dan Rosenberg, DVM, PhD, Internal Medicine Unit of the National Veterinary School of Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France; e-mail: drosenberg@vet-alfort.fr

Submitted October 24, 2008; Revised March 23, 2009; Accepted April 9, 2009.

Copyright © 2009 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2009.0328.x

expression of the gastric inhibitor polypeptide receptor, represents a 2nd form of AIHAC.

Differentiation between ADHAC and AIHAC is crucial for prognosis and treatment. During the last 30 years, a number of imaging techniques and endocrine tests, including plasma ACTH measurement, have been developed for this purpose.^{5–14} Over this period, techniques used for ACTH measure have changed from radioimmunoassay (RIA)^{15–17} to immunoradiometric (IRMA)¹⁸ and immunoluminometric assays (ILMA),¹⁹ with concomitant improvements in the analytical sensitivity and specificity.

Despite its widespread use, few surveys have evaluated the diagnostic accuracy of ACTH determination for investigations of the cause of Cushing's syndrome.^{7,19–21} They have highlighted a number of misclassified or

unclassified cases, although the proportion of these cases differed considerably among studies. Because these studies were carried out with older assays or on small cohorts of dogs, it is difficult to interpret the data obtained with the earlier assays to the assays currently in use. Furthermore, surveys evaluating the characteristics of current assays are lacking.

The aim of this study was to evaluate the accuracy of a recently validated ACTH immunoluminometric assay (Immulite ACTH)^a for differentiating ADHAC and AIHAC using a large group of dogs with characterized HAC.

Materials and Methods

Clinical Cases

Medical records of dogs evaluated at the Internal Medicine Unit of the National Veterinary School of Alfort (France), between January 1, 2003 and September 31, 2008, were reviewed. Included were all dogs with:

- (1) A history and physical examination consistent with HAC.
- (2) At least 1 endocrine test result, ACTH stimulation test or low-dose dexamethasone suppression test (LDDST), confirming the diagnosis of HAC.
- (3) An unequivocal characterization of the origin of HAC: dogs were considered to have ADHAC if feedback inhibition was observed in response to dexamethasone suppression tests (low or high doses), if adrenal symmetry was identified with normal shape and echogenicity on ultrasound examination or with normal shape and attenuation on computed tomography scan (CT) of the 2 glands or if both criteria were present.^{10,11,22} AIHAC was demonstrated based on the histological characterization of a functional adrenocortical tumor, after the removal of the tumor during surgery or necropsy.
- (4) A determination of plasma ACTH concentration processed on an Immulite 2000 analyzer^b with appropriate preanalytical conditions.

Endocrine Tests and Hormone Assays

The ACTH stimulation test, based on intravenous (IV) administration of 0.25 mg of tetracosactide,^c the LDDST, based on IV administration of dexamethasone^d at a dose of 0.01 mg/kg of body weight (BW), and the high-dose dexamethasone suppression test (HDDST), based on IV administration of 0.1 mg/kg BW of dexamethasone, were performed as previously described.^{6,7,11,23–25} Spontaneous HAC was confirmed in all dogs, based on a marked increase in serum cortisol concentration (≥ 500 nmol/L) 1 hour after ACTH stimulation, an inadequate decrease in serum cortisol concentration (≥ 40 nmol/L) 8 hours after dexamethasone injection, or both. ADHAC was demonstrated by a LDDST or HDDST exhibiting feedback inhibition 4 or 8 hours after dexamethasone injection. For LDDST, feedback inhibition was defined as a 4-hour cortisol concentration < 40 nmol/L or $< 50\%$ of the basal concentration, or as a 8-hour cortisol concentration $< 50\%$ of the basal concentration but ≥ 40 nmol/L. In the case of HDDST, feedback inhibition response was defined as a 4-hour or 8-hour serum cortisol concentration < 40 nmol/L or $< 50\%$ of the basal concentration.¹¹ Plasma cortisol concentrations in dynamic endocrine tests were determined with a kit^c previously validated in dogs.²⁶

Blood samples for ACTH determination were collected from the jugular vein into EDTA-coated tubes. The samples were immediately centrifuged at 4°C, 500×g for 8 minutes, and plasma was immediately transferred into plastic tubes and stored at -80°C until

assay. Plasma ACTH concentrations were determined with Immulite ACTH, a 2-site solid-phase chemiluminescent immunometric assay, previously validated for dogs,¹⁹ run on an Immulite 2000 analyzer. Normal reference range in our laboratory was 6–58 pg/mL.²⁵ The intra-assay and interassay percent coefficients of variation calculated on 3 different concentrations ranged between 5.07 and 8.26%, and 6.73 and 7.92%, respectively. The dilution linearity of ACTH in the low range of measurements (between 43.7 and 5.5 pg/mL) was checked by diluting samples with an ACTH-free sample of canine serum 1:2, 1:4, and 1:8. A recovery range between 89 and 114% was observed. Manufacturer-supplied information indicated an analytical sensitivity for the assay of 5 pg/mL and a working range of 5–1250 pg/mL. Samples for which the apparent concentration was below the quantification limit of the assay were assigned a concentration equal to the quantification limit (5 pg/mL).

Imaging Procedures

Imaging procedures were performed by board-certified or equivalent-experienced examiners. Ultrasound examinations were carried out with a sectorial 5–8 MHz transducer.^f The shape and echogenicity of the 2 glands were described and the greatest dorsoventral thickness was measured, as previously described.²⁷ Adrenal symmetry was arbitrarily defined as a difference of $< 20\%$ between maximal gland thickness with respect to the mean.

For CT scans, food was withheld from the dogs for 12 hours before the examination. Anesthesia was induced by the IV administration of 6.5 mg/kg of propofol^g and was maintained with inhaled isoflurane^h and oxygen. A CT scan of the cranial abdomen was performed with a 4th-generation CT scanner,ⁱ before and after an IV bolus injection of 2 mL/kg of contrast medium.^j The shape (on reformatted images) and attenuation of the 2 glands were recorded and the largest diameter of each adrenal gland was determined on cross section.²⁸ Adrenal symmetry was arbitrarily defined as a difference of $< 20\%$ between the largest diameter with respect to the mean.

Histology

For histological examination, adrenocortical tumors removed surgically or during necropsy were fixed in 10% neutral buffered formalin and routinely embedded in paraffin. Sections were cut and stained with hematoxylin and eosin. Histological analyses were performed by board-certified pathologists. The tumors were classified as benign or malignant and their functional status (ie, atrophy of the nonneoplastic adrenocortical tissue next to the tumor) was assessed.

Data Analysis

Data were analyzed with commercially available software.^k Non-normally distributed data were reported as medians and ranges. The 95% confidence intervals (CI) for estimated sensitivity and specificity for AIHAC were determined with a freeware program.¹

Results

The criteria for inclusion in this study were met by 109 dogs. ACTH stimulation tests were performed in 67 dogs (12 AIHAC and 55 ADHAC) and hyperadrenocorticism was confirmed by abnormal response to ACTH stimulation in 64 dogs (9 AIHAC and 55 ADHAC). The LDDST was performed in 55 dogs (11 AIHAC and 44 ADHAC) and unsuppressed cortisol concentration 8 hours after dexamethasone injection was observed in 51 (9 AIHAC and 42 ADHAC). Eighteen dogs were classified in the adrenocortical tumor group (7 adenomas and

11 carcinomas, 5 with vascular emboli) and 91 dogs in the ADHAC group.

In the ADHAC group, 31 dogs exhibited feedback inhibition after LDDST (cortisol concentrations < 50% of the basal concentration at 4 and 8 hours in 11 dogs, at 4 hours only in 17 dogs, and at 8 hours only in 3 dogs; cortisol concentrations < 40 nmol/L at 4 hours in 16 dogs), the remaining 11 dogs did not exhibit feedback inhibition, and were confirmed using additional imaging studies. Seven dogs exhibited suppression after HDDST (cortisol concentrations < 50% of the basal concentration at 4 and 8 hours in 5 dogs, at 4 hours only in 1 dog, and at 8 hours only in 1 dog; cortisol concentrations < 40 nmol/L at 8 hours in 1 dog). Thirty-one dogs had adrenal gland symmetry with homogeneous echogenicity on ultrasound examination, 34 dogs had adrenal gland symmetry with homogenous attenuation on CT scan.

The male/female ratio was (43/48) for dogs with ADHAC and (7/11) for dogs with AIHAC. The median (range) of ages at the time of diagnosis was 11 (5–17) years for dogs with ADHAC and 10 (6–16) years for dogs with AIHAC. The ADHAC group included 20 poodles, 15 Yorkshire Terriers, 9 Bichons, 4 Pyrenean Shepherds, 2 Belgian Shepherds, 2 Boxers, 2 Coton de Tulear, 2 Cocker, 2 Dachshunds, 2 Golden Retrievers, 2 Great Danes, 2 Lhasa-Apsos, 2 Shetland Sheepdogs, and 2 Shih-Tzus. The remaining 23 dogs consisted of cross-breeds (11 dogs) and individuals of different breeds. The AIHAC group consisted of 3 Fox Terriers, 2 German Shepherds, 2 Labrador Retrievers, 2 Poodles, 5 cross-breeds, and 4 individuals of different breeds.

No overlap in plasma ACTH concentrations was observed between the AIHAC and ADHAC groups (Fig 1). All functional tumors were associated with unquantifiable plasma ACTH concentrations. In dogs with ADHAC, plasma ACTH measures ranged from 6 to 1250 pg/mL (median, 30 pg/mL).

Setting the threshold at 5 pg/mL, the estimated sensitivity and specificity of plasma ACTH measure to detect AIHAC were 100% with 95% CI ranging from 85 to 100% and 97 to 100%, respectively.

Discussion

This study evaluates the diagnostic accuracy of ACTH determination for differentiating between the 2 major types of HAC in 109 dogs enrolled at a single center. This differentiation is an essential step in the diagnosis of dogs with this syndrome, because the treatment protocols and the risks of individual patients depend strongly on this characterization.²⁹ In dogs, as in humans, forms of Cushing's syndrome other than PDH and ADH—which were the only forms known for decades—have recently been identified.^{2–4} This new situation justifies the use of the HAC classification generally used in studies of human patients, distinguishing between the ACTH-dependent and ACTH-independent forms of HAC.^{30,31} Indeed, in the dogs studied here, the observation on imaging of 2 symmetric adrenal glands with preserved shape was considered evidence of ACTH-dependent HAC. However, even if this dependence is probable, it does not guarantee

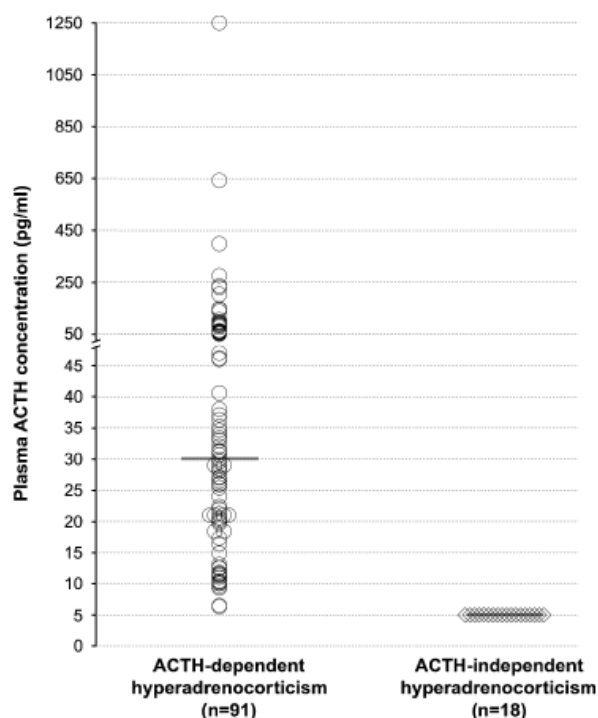


Fig 1. Plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) concentration in 91 dogs with ACTH-dependent hyperadrenocorticism (circles) and 18 dogs with ACTH-independent hyperadrenocorticism (diamonds). Medians are indicated by gray horizontal lines. Measurements below the lower limit of quantification of the assay are assigned a concentration of 5 pg/mL.

a pituitary origin of the syndrome, particularly if feedback inhibition in response to dexamethasone suppression tests is not identified.

ACTH determination is considered an essential, accurate tool for determining the etiology of HAC in humans.^{30,31} In dogs, none of the tests developed to date for determining the origin of canine HAC, including endocrine and imaging procedures, is currently considered perfect.^{10,11,13,19,20,28,32,33} Imaging techniques can sometimes fail to distinguish the cause of HAC, but are still essential for providing topographical information once a clear cause has been identified. Functional characterization of the corticotrophic axis by endocrine testing should provide an obvious distinction, but until this study, all endocrine tests evaluated have produced a proportion of misclassified cases.¹ In particular, the value of ACTH measurement, used relatively rarely by clinicians,³⁴ is controversial. Reference textbooks claim that this technique is critical for distinguishing between causes of HAC,^{1,29} but the accuracy of this tool for this indication has been assessed only rarely in dogs. With the exception of 1 study evaluating an old ACTH assay⁷ and a recent survey of a small cohort in which most cases were considered well classified by ACTH determination,²¹ published data have tended to suggest that this method is unreliable, with up to 30% of results unclassified for AIHAC and 15% unclassified for ADHAC.^{1,20} Hence, a gray zone of indecision generally is recommended for plasma ACTH concentration evaluation, limiting the

utility of this technique when results fall in this indeterminate range.^{1,29}

In this study of a large cohort of dogs, there was no overlap between the ACTH concentrations measured in dogs with ADHAC and those measured in dogs with AIHAC. To the authors knowledge, this is the 1st time that such strong discrimination has been reported for this test in dogs. The ACTH assay used here has a lower quantification limit (5 pg/mL) than reported for the assays used in most previous surveys (10 and 20 pg/mL),^{7,19} and this technical progress may have helped prevent misclassification of ADHAC. Quantifying above 10 or 20 pg/mL and using these limits as thresholds as in previous surveys would have generated misclassification of some ADHAC cases: 5/91 (5%; 95% CI: 2–12%) for 10 pg/mL and 23/91 (25%; 95% CI: 17–35%) for 20 pg/mL.

The cohort of dogs enrolled in this survey was comparable, in terms of age, breed, and proportion of dogs with ADHAC and AIHAC, with those studied in previous surveys^{1,35–38} and probably reflected the general population of dogs with HAC. However, this situation was associated with a small population of dogs presented with AIHAC (18/109), a limitation of this study. In the largest survey on AIHAC, including 41 dogs, only 29 of the dogs presented with undetectable plasma ACTH concentrations.²⁰ Given the narrow 95% CI for estimated sensitivity in our study for the detection of AIHAC by ACTH determination, under inclusion of cases would not seem to account for this discrepancy. The 2 studies share similar criteria for both HAC diagnosis and AIHAC characterization, with AIHAC characterization based on the gold standard detection of atrophy of the nonneoplastic tissue adjacent to the adrenocortical tumor. As these studies took place almost 20 years apart, different techniques were used to determine ACTH concentration—RIA for the oldest survey, ILMA for this survey—and this difference in technique may account for the difference in results, as sandwich techniques are known to be more specific than single-site assays.^{39,40}

The histological characterization of ADHAC would have required access to both the ACTH-secreting tissue and the adrenal cortex, and this characterization would be very difficult to achieve for a large clinical population. Without the use of this gold standard technique for allocation to the ADHAC group, the combination of several criteria (imaging techniques, dexamethasone suppression tests) supporting ADHAC in each dog of the group would have maximized confidence in our allocation. However, because of the retrospective nature of the study, the use of such a combination of tests would have dramatically decreased the number of dogs included, limiting the power of the study. Despite the limitations associated with the availability of a single criterion for most of the dogs, we are confident of adequate allocation of ADHAC dogs because of the stringency of each criterion used. A feedback inhibition response to dexamethasone is a hallmark of PDH, the major form of ADHAC, although this response is seen in only 65 to 75% of cases, depending on the dose used for the test.¹¹ Abnormal patterns of cortisol concentrations after dexa-

methasone injection, mimicking the changes observed with PDH, occasionally have been observed in dogs with ADH, but are considered extremely rare.^{11,14,41} Thus, the inclusion in the study of dogs with functional adrenocortical tumors, in the population displaying inhibition, appears unlikely. The use of adrenal symmetry to allocate dogs to the ADHAC group potentially is more problematic because no definitive criteria for symmetry have ever been defined, and ADHAC cases may be associated with variable degrees of asymmetry.^{9,10} We used a conservative strategy, considering as ADHAC only dogs with adrenal glands exhibiting <20% asymmetry on adrenal imaging, with normal shape and normal echogenicity or attenuation. Many cases of ADHAC may have been excluded with this strategy. Conversely, the probability of inclusion, in the ADHAC group, of dogs with AIHAC appears to be very low, and this may have affected the results. To the authors knowledge, no description of canine functional adrenocortical tumor, including description of bilateral adrenocortical tumors and description of simultaneous adrenocortical and pituitary tumors, has ever fit these imaging criteria.^{12,13,20,42–45,m} In humans, symmetrical adrenal glands of normal shape and density can be identified by imaging in rare cases of AIHAC: primary pigmented nodular adrenocortical disease. This condition has never been described in dogs. Only the recently described case of food-dependent HAC could have been misclassified by our criteria, because this case displayed dexamethasone sensitivity combined with symmetric and uniformly enlarged adrenal glands.⁴ The unique nature of this case makes the inclusion of another such case in this survey extremely unlikely.

Plasma samples were immediately centrifuged at 4°C and promptly frozen until assay in this study. These conditions were necessary because ACTH is highly unstable at room temperature.⁴⁶ In a past study focusing on ACTH measurements in a limited population of dogs with HAC, defrosting of plasma shipped overnight may have resulted in misclassification of some ADHAC cases.¹⁹ Aprotinin, a proteinase inhibitor, preserves canine plasma ACTH immunoreactivity, allowing less stringent preanalytical conditions.⁴⁶ However, the use of aprotinin for ACTH determination with the ILMA used here has been shown to be associated with a negative bias.¹⁹ For ACTH determinations close to the quantification limit of the assay (eg, measurements equal to 6 pg/mL identified in 2 dogs with ADHAC in the study, 1 diagnosed by CT scan and the other by ultrasound, after HAC diagnosis by ACTH stimulation test), the use of aprotinin, in case of negative bias, might have resulted in inability to quantitate ACTH concentration in some ADHAC dogs. Such inability to quantitate ACTH would have generated overlap between the concentrations in dogs with AIHAC and those in dogs with ADHAC. The retrospective nature of our study precluded the testing of this hypothesis.

Based on studies in human patients, it is generally recommended in dogs that blood samples for ACTH determination be collected between 8:00 and 9:00 AM,¹ assuming a diurnal ACTH rhythm that has not yet been confirmed.^{16,47–50} The samples studied here were ob-

tained in the course of consultations during the morning and afternoon. The interest of clinicians in a diagnostic technique depends not only on its accuracy, but also on the practicality of the technique. Simplification of the procedure, with less restrictive sampling times, provides further evidence of the potential utility of this method.

In conclusion, this study has estimated the specificity and the sensitivity of Immulite ACTH ILMA in a large number of dogs with HAC. No overlap in ACTH concentrations was observed between dogs with ADHAC and dogs with AIHAC. To the authors knowledge, no other noninvasive technique, including previous methods for ACTH determination, has allowed such clear differentiation. This study suggests considering plasma ACTH concentration measurement as a pivotal tool for determining the cause of canine HAC.

Footnotes

^a Immulite ACTH, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA

^b Immulite 2000, Siemens Medical Solutions Diagnostics

^c Synacthène injectable, tetracosactide, 0.25 mg/mL, Novartis Pharma SA, Rueil-Malmaison, France

^d Dexadreson, dexamethasone phosphate, 2 mg/mL, Intervet—Schering Plough, Beaucauzé, France

^e Enzymun-Test cortisol, Roche Diagnostics, Meylan, France

^f Philips Advanced Technology Laboratories HDI 3500, Philips, Eindhoven, The Netherlands

^g Rapinovet, propofol, 1g/100 mL, Schering-Plough Vétérinaire, Levallois-Perret, France

^h Isoflurane aerrane, isoflurane. Baxter SAS, Maurepas, France

ⁱ Scanner Hispeed CT/e Plus, General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI

^j Télébrix 35, sodium and meglumine ioxitalamate, 350 mg of iodine/mL, Laboratoire Guerbet, Roissy-Charles-de-Gaulle, France

^k Microsoft Office Excel 2003 software, Microsoft Corporation, Redmond, WA

^l Measuring usability: confidence interval calculator for a completion rate (<http://www.measuringusability.com/wald.htm>)

^m Peterson ME. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with Cushing's syndrome. Proceedings 19th Annual Forum of the ACVIM, Denver, CO, 2001 (abstract)

Acknowledgments

This work was supported by postdoctoral grants from the Barrié de la Maza Foundation, A Coruña-Spain, awarded to María Isabel Rodríguez Piñeiro and from Intervet Pharma R&D SA, Angers, France, awarded to Ghita Benchekroun, and by grants from the Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires rurales).

References

1. Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In: Feldman EC, Nelson RW, eds. Canine and Feline

Endocrinology and Reproduction. St Louis, MO: Saunders; 2004: 252–357.

2. Churcher RK. Hepatic carcinoid, hypercortisolism and hypokalaemia in a dog. Aust Vet J 1999;77:641–645.

3. Galac S, Kooistra HS, Voorhout G, et al. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. Domest Anim Endocrinol 2005;28:338–348.

4. Galac S, Kars VJ, Voorhout G, et al. ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: A case report. Vet J 2008;177:141–143.

5. Feldman EC, Blake Tyrell J, Bohannon NV. The synthetic ACTH stimulation test and measurement of endogenous plasma ACTH levels: Useful diagnostic indicators for adrenal disease in dogs. J Am Anim Hosp Assoc 1978;14:524–531.

6. Meijer JC, de Bruijne JJ, Rijnberk A, Croughs RJ. Biochemical characterization of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in the dog. J Endocrinol 1978;77:111–118.

7. Feldman EC. Distinguishing dogs with functioning adrenocortical tumors from dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. J Am Vet Med Assoc 1983;183:195–200.

8. Kantrowitz BM, Nyland TG, Feldman EC. Adrenal ultrasonography in the dog. Detection of tumors and hyperplasia in hyperadrenocorticism. Vet Radiol Ultrasound 1986;27:91–96.

9. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in dogs. J Am Vet Med Assoc 1995;207:1180–1183.

10. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK, Miyabayashi T. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: Comparison with normal dogs. J Vet Intern Med 1996;10:110–115.

11. Feldman EC, Nelson RW, Feldman MS. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. J Am Vet Med Assoc 1996;209:772–775.

12. Besso JG, Penninck DG, Gliatto JM. Retrospective ultrasonographic evaluation of adrenal lesions in 26 dogs. Vet Radiol Ultrasound 1997;38:448–455.

13. Hoerauf A, Reusch CE. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. J Am Anim Hosp Assoc 1999;51:193–199.

14. Norman EJ, Thompson H, Mooney CT. Dynamic adrenal function testing in eight dogs with hyperadrenocorticism associated with adrenocortical neoplasia. Vet Rec 1999;144:551–554.

15. Feldman EC, Bohannon NV, Tyrrell JB. Plasma adrenocorticotropin levels in normal dogs. Am J Vet Res 1977;38: 1643–1645.

16. Kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. J Endocrinol 1984;103:219–226.

17. Hegstad RL, Johnston SD, Pasternak DM. Effects of sample handling on adrenocorticotropin concentration measured in canine plasma, using a commercially available radioimmunoassay kit. Am J Vet Res 1990;51:1941–1947.

18. Keller-Wood M. Fast feedback control of canine corticotropin by cortisol. Endocrinology 1990;126:1959–1966.

19. Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Brown JA, et al. Validation of a chemiluminescent enzyme immunoassay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. Vet Clin Pathol 2003;32:180–187.

20. Reusch CE, Feldman EC. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. J Vet Intern Med 1991;5:3–10.

21. Gould SM, Baines EA, Mannion PA, et al. Use of endogenous ACTH concentration and adrenal ultrasonography to distinguish the cause of canine hyperadrenocorticism. J Small Anim Pract 2001;42:113–121.

22. Bertolini G, Furlanello T, Drigo M, Caldin M. Computed tomographic adrenal gland quantification in canine adrenocorticotroph hormone-dependent hyperadrenocorticism. *Vet Radiol Ultrasound* 2008;49:449–453.
23. Meijer JC, Lubberink AA, Rijnberk A, Croughs RJ. Adrenocortical function tests in dogs with hyperfunctioning adrenocortical tumours. *J Endocrinol* 1979;80:315–319.
24. Feldman EC. Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening tests in canine hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1983;182:506–510.
25. Granger N, de Fornel P, Devauchelle P, et al. Plasma proopiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med* 2005;19:23–28.
26. Ginel PJ, Perez-Rico A, Moreno P, Lucena R. Validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of cortisol in canine plasma samples. *Vet Res Commun* 1998;22:179–185.
27. Grooters AM, Biller DS, Merryman J. Ultrasonographic parameters of normal canine adrenal glands: Comparison to necropsy findings. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:126–130.
28. Voorhout G, Stolp R, Lubberink AA, van Waes PF. Computed tomography in the diagnosis of canine hyperadrenocorticism not suppressible by dexamethasone. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:641–646.
29. Reusch CE. Hyperadrenocorticism. In: Ettinger SJ, ed. *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, PA: Saunders; 2005:1592–1612.
30. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998;19:647–672.
31. Boscaro M, Barzon L, Fallo F, Sonino N. Cushing's syndrome. *Lancet* 2001;357:783–791.
32. Mack RE, Feldman EC. Comparison of two low-dose dexamethasone suppression protocols as screening and discrimination tests in dogs with hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:1603–1606.
33. Zeugswetter F, Hoyer MT, Pagitz M, et al. The desmopressin stimulation test in dogs with Cushing's syndrome. *Domest Anim Endocrinol* 2008;34:254–260.
34. Behrend EN, Kemppainen RJ, Clark TP, et al. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs: A survey of internists and dermatologists. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220:1643–1649.
35. Rijnberk A, der Kinderen PJ, Thijssen JH. Spontaneous hyperadrenocorticism in the dog. *J Endocrinol* 1968;41:397–406.
36. Siegel ET, Kelly DF, Berg P. Cushing's syndrome in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1970;157:2081–2090.
37. Ling GV, Stabenfeldt GH, Comer KM, et al. Canine hyperadrenocorticism: Pretreatment clinical and laboratory evaluation of 117 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1979;174:1211–1215.
38. Peterson ME. Hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1984;14:731–749.
39. Gosling JP. A decade of development in immunoassay methodology. *Clin Chem* 1990;36:1408–1427.
40. Selby C. Interference in immunoassay. *Ann Clin Biochem* 1999;36(Part 6):704–721.
41. Mueller C, Sieber-Ruckstuhl N, Wenger M, et al. Low-dose dexamethasone test with "inverse" results: A possible new pattern of cortisol response. *Vet Rec* 2006;159:489–491.
42. Ford SL, Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: Four cases (1983–1988). *J Am Vet Med Assoc* 1993;202:789–792.
43. Greco DS, Peterson ME, Davidson AP, et al. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978–1995). *J Am Vet Med Assoc* 1999;214:1349–1353.
44. Thuroczy J, van Sluijs FJ, Kooistra HS, et al. Multiple endocrine neoplasias in a dog: Corticotrophic tumour, bilateral adrenocortical tumours, and pheochromocytoma. *Vet Q* 1998;20:56–61.
45. Kiupel M, Mueller PB, Ramos VJ, et al. Multiple endocrine neoplasia in a dog. *J Comp Pathol* 2000;123:210–217.
46. Kemppainen RJ, Clark TP, Peterson ME. Preservative effect of aprotinin on canine plasma immunoreactive adrenocorticotropin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* 1994;11:355–362.
47. Castillo VA, Cabrera Blatter MF, Gómez NV, et al. Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Res Vet Sci* 2009;86:223–229.
48. Hanson JM, Kooistra HS, Mol JA, et al. Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and growth hormone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism before and after hypophysectomy. *J Endocrinol* 2006;190:601–609.
49. Kooistra HS, Greven SH, Mol JA, Rijnberk A. Pulsatile secretion of alpha-MSH and the differential effects of dexamethasone and haloperidol on the secretion of alpha-MSH and ACTH in dogs. *J Endocrinol* 1997;152:113–121.
50. Orth DN, Peterson ME, Drucker WD. Plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in normal dogs and dogs with Cushing's syndrome: Diurnal rhythm and responses to various stimuli. *Endocrinology* 1988;122:1250–1262.

1.3.Critères morphologiques : examens d'imagerie des glandes surrénales

A partir de cette classification biochimique, nous avons souhaité évaluer la pertinence de paramètres morphologiques pour établir le diagnostic étiologique du syndrome de Cushing.

1.3.1. Utilisation de l'échographie surrénalienne

Une première étude a porté sur 47 chiens atteints de Cushing et convenablement classés par leur concentration plasmatique en ACTH. Nous avons analysé les résultats des échographies ciblant les surrénales. Pour cette étude, nous avons retenu tous les cas pour lesquels l'échographie montrait une différence de taille des surrénales d'au moins 20%, avec asymétrie équivoque. Nous avons identifié que lors d'asymétrie équivoque, une épaisseur maximale de 5 mm de la plus petite des surrénales était en faveur d'un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. D'autres critères morphologiques (taille de la plus grande surrénale, hétérogénéité de son échogénicité, compression vasculaire...) considérés jusqu'à ce travail comme orientant vers une tumeur corticosurrénale indépendante de l'ACTH se sont révélés de faible performance diagnostique.

Ultrasonography criteria for differentiating ACTH-dependency from ACTH-independency in 47 dogs with hyperadrenocorticism and equivocal adrenal asymmetry.

G. Benchenkroun^{*}, P. de Fornel-Thibaud^{*}, M.I. Rodríguez Piñeiro, D. Rault, J. Besso, A. Cohen, J. Hernandez, F. Stambouli, E. Gomes, D. Begon, C. Maurey-Guenec, and D. Rosenberg.

J Vet Intern Med 2010;24:1077-1085.

^{*} Copremière auteur

Ultrasonography Criteria for Differentiating ACTH Dependency from ACTH Independency in 47 Dogs with Hyperadrenocorticism and Equivocal Adrenal Asymmetry

G. Benckekroun*, P. de Fornel-Thibaud*, M.I. Rodríguez Piñeiro, D. Rault, J. Besso, A. Cohen*, J. Hernandez, F. Stambouli, E. Gomes, F. Garnier, D. Begon, C. Maurey-Guenec, and D. Rosenberg

Background: Adrenal ultrasonography (US) in dogs with hyperadrenocorticism (HAC) is commonly used to distinguish adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-independent (AIHAC) and ACTH-dependent hyperadrenocorticism (ADHAC). To date, no cut-off values for defining adrenal atrophy in cases of adrenal asymmetry have been determined. Given that asymmetrical hyperplasia is sometimes observed in ADHAC, adrenal asymmetry without ultrasonographic proof of adrenocortical tumor such as vascular invasion or metastasis can be equivocal.

Objective: The purpose of this study was to compare adrenal US findings between cases of ADHAC and AIHAC in dogs with equivocal adrenal asymmetry (EAA), and to identify useful criteria for their distinction.

Animals: Forty dogs with EAA were included.

Methods: Ultrasound reports of HAC dogs with adrenal asymmetry without obvious vascular invasion or metastases were reviewed. Dogs were classified as cases of ADHAC (n = 28) or AIHAC (n = 19), determined by plasma ACTH concentration. The thickness, shape, and echogenicity of both adrenal glands and presence of adjacent vascular compression were compared between AIHAC and ADHAC groups.

Results: The maximal dorsoventral thickness of the smaller gland (SDV) ranged from 2.0 to 5.0 mm in AIHAC and from 5.0 to 15.0 mm in ADHAC. The 95% confidence intervals for estimated sensitivity and specificity of a SDV cut-off set at 5.0 mm in the diagnosis of AIHAC were 82–100 and 82–99%, respectively. Other tested US criteria were found to overlap extensively between the 2 groups, precluding their usefulness for distinction.

Conclusion and Clinical Importance: In EAA cases, an SDV ≤ 5.0 mm is an appropriate cut-off for AIHAC ultrasonographic diagnosis.

Key words: Adrenal gland; Asymmetry; Dog; Hyperadrenocorticism; Ultrasonography.

Hyperadrenocorticism (HAC) or Cushing's syndrome is a commonly diagnosed endocrine disorder in dogs. Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-dependent hyperadrenocorticism (ADHAC), mainly pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH), is the most common form of HAC. Only 10–15% of HAC cases are ACTH-independent (AIHAC).¹ The major form of AIHAC is triggered by an unilateral functional adrenocortical tumor (FAT) (adenoma or carcinoma). The distinction between AIHAC and ADHAC is crucial for prognosis and treatment.

From the Internal Medicine Unit, National Veterinary School of Alfort, Maisons-Alfort, France (Benckekroun, de Fornel-Thibaud, Rodríguez Piñeiro, Maurey-Guenec, Rosenberg); Veterinary Anticancer Center, Maisons-Alfort, France (de Fornel-Thibaud); Department of Veterinary Clinical Sciences, Veterinary Faculty of Lugo, University Campus, Lugo, Spain (Rodríguez Piñeiro); Medical Imaging Unit, National Veterinary School of Alfort, Maisons-Alfort, France (Rault, Besso, Cohen, Hernandez, Stambouli, Gomes, Begon); and the Biochemistry Unit, National Veterinary School of Lyon, Marcy l'Étoile, France (Garnier). Part of this work was presented at the ACVIM Forum, Louisville, KY, in June 2006.

*Equally contributed to the work.

*Deceased

Corresponding author: Dan Rosenberg, DVM, PhD, Internal Medicine Unit of the National Veterinary School of Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704. Maisons-Alfort, France; e-mail: drosenberg@vet-alfort.fr.

Submitted May 11, 2009; Revised March 15, 2010; Accepted May 19, 2010.

Copyright © 2010 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2010.0559.x

Abbreviations:

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ADH	adrenal-dependent hyperadrenocorticism
ADHAC	ACTH-dependent hyperadrenocorticism
AIHAC	ACTH-independent hyperadrenocorticism
BW	body weight
CI	confidence interval
DST	dexamethasone suppression test
DVTDR	dorsoventral thickness difference ratio
DVTR	dorsoventral thickness ratio
EAA	equivocal adrenal asymmetry
FAT	functional adrenocortical tumor
HAC	hyperadrenocorticism
HDDST	high-dose dexamethasone suppression test
LDDST	low-dose dexamethasone suppression test
LDV	maximal dorsoventral thickness of the larger gland
PDH	pituitary-dependent hyperadrenocorticism
ROC	receiver operating characteristic
SDV	maximal dorsoventral thickness of the smaller gland
US	ultrasonography

Abdominal ultrasonography (US) currently is considered the “tool of choice” by many clinicians for determining the cause of HAC in dogs and is commonly used by veterinarians for such cases.^{2,3} Being common in veterinary practices, and not very time-consuming, US often is described as a reliable and practical method for identifying the origin of HAC.^{2,4} Ultrasound data obtained for the etiological characterization of HAC in

dogs can be unequivocal. For instance, bilateral normal-sized or large adrenal glands with normal shape and echogenicity are considered strong evidence of adrenocortical hyperplasia secondary to ADHAC.^{4,5} Likewise, a large solitary and abnormally shaped adrenal mass invading adjacent structures or associated with distant nodules characterized by histopathology as adrenocortical metastases is highly indicative of adrenocortical carcinoma in the context of HAC.^{6,7} However, apart from these typical ultrasonographic images, other images, referred to in this paper as “equivocal adrenal asymmetry” (EAA), can be more difficult to analyze for various reasons. First, adrenal asymmetry associated with an adrenal mass and contralateral atrophy is expected in unilateral FAT; however, to date, there is no established cut-off for defining adrenal atrophy. Cases of AIHAC caused by unilateral FAT have even been described with opposite gland thickness within reference values.⁸ Additionally, the appearance of FATs themselves can sometimes differ from the enlarged, rounded, or irregularly rounded shapes with small and homogeneous functional nodules described.^{7,8} Second, adrenocortical nodular hyperplasia involving one or both adrenal glands has been described in dogs with ADHAC generating adrenal asymmetry to a variable extent, changes in adrenal shape and, in some cases, heterogeneous echogenicity of the adrenal gland. In such situations, the images can be confused with those observed in cases of FAT.⁵

The purpose of this study was to analyze adrenal US data in HAC dogs with EAA and to retrospectively determine ultrasonographic criteria to differentiate AIHAC from ADHAC.

Materials and Methods

Clinical Cases

Medical records of dogs evaluated at the Internal Medicine Unit of the National Veterinary School of Alfort (France) between June 1, 2003, and November 1, 2008, were reviewed. We included all dogs with:

- (1) History, physical examination, biochemistry, and hematological findings consistent with HAC.
- (2) At least 1 endocrine test result, ACTH stimulation test or low-dose dexamethasone suppression test (LDDST), consistent with the diagnosis of HAC.
- (3) An unequivocal characterization of HAC origin by plasma ACTH concentration measurement. Additional information for the characterization of HAC (feedback inhibition in response to dexamethasone suppression tests [DSTs], histopathology of adrenocortical tissue removed at surgery or necropsy) was collected when available.
- (4) An ultrasonographic examination of the 2 adrenal glands allowing measurement of the maximal dorsoventral thickness and showing EAA without obvious vascular invasion or organ metastasis.
- (5) No treatment of HAC started before the ultrasound examination.

Endocrine Tests and Hormone Assays

Serum cortisol concentrations for the dynamic endocrine tests were determined with a kit^a previously validated for dogs.⁹

The ACTH stimulation test, based on intravenous (IV) administration of 0.25 mg of tetracosactide,^b the LDDST, based on IV administration of 0.01 mg/kg of body weight (BW) of dexamethasone,^c and the high dose dexamethasone suppression test (HDDST), based on IV administration of 0.1 mg/kg BW of dexamethasone, were performed as described previously.^{10–14} Spontaneous HAC was confirmed in all dogs by either a marked increase in serum cortisol concentration (≥ 500 nmol/L) 1 hour after ACTH stimulation, an inadequate suppression of serum cortisol concentration (≥ 40 nmol/L) 8 hours after dexamethasone injection or both.

For the DSTs, feedback inhibition demonstrating ADHAC was defined as a 4 or 8-hour serum cortisol concentration $< 50\%$ of the basal cortisol concentration, a 4-hour cortisol concentration ≤ 40 nmol/L or, for the HDDST only, an 8-hour cortisol concentration ≤ 40 nmol/L. In cases for which no decrease in cortisol was observed after DSTs, 4-hour and 8-hour plasma ACTH concentrations, additionally to basal ACTH, were measured to distinguish potential dexamethasone insensitivity of the ACTH-producing tissue from adrenocortical autonomy.

Blood samples for measurement of plasma ACTH concentration were collected from the jugular vein in ethylenediaminetetraacetic acid-coated tubes. Samples were centrifuged immediately at 4°C, at $500 \times g$ for 8 minutes, and plasma promptly stored in plastic tubes at -80°C until assay. Plasma ACTH concentrations were determined using Immulite ACTH,^d an immunoluminometric assay, previously validated for dogs¹⁵ samples were run on the Immulite 2000 analyzer.^c Dogs were considered to have AIHAC when ACTH concentration was below the limit of quantification of the assay (< 5 pg/mL). ADHAC was identified by unsuppressed basal ACTH plasma concentrations (> 6 pg/mL). Confidence intervals (CI) for estimated sensitivity and specificity of these criteria to detect ADHAC were previously demonstrated as ranging from 97 to 100% and from 85 to 100%, respectively.¹⁶

Ultrasonographic Examinations

Ultrasonographic procedures were carried out by board-certified or equivalent experienced examiners, with a 5–8 MHz curved array transducer.^f At the time of ultrasound examination, no information about the plasma ACTH concentration of the dogs was available to the examiner. The maximal dorsoventral thickness of the larger gland (LDV) and of the smaller gland (SDV) was measured from static images as described previously.¹⁷ Briefly, the maximal dorsoventral thickness was defined as the maximal dorsoventral dimension, which was perpendicular to the long axis of the adrenal gland. Measurements were obtained with the transducer in a subcostal rather than an intercostal position whenever possible. For each pair of measurements, the dorsoventral thickness difference ratio (DVTDR)—defined as the difference between LDV and SDV with respect to the mean [$\text{DVTDR} = 2 \times (\text{LDV} - \text{SDV}) / (\text{LDV} + \text{SDV})$ —and the dorsoventral thickness ratio (DVTR)—defined as the ratio between LDV and SDV ($\text{DVTR} = \text{LDV} / \text{SDV}$)—were calculated. Adrenal asymmetry was arbitrarily defined before starting the study as $\text{DVTDR} \geq 0.2$.

Each examiner subjectively described the shape, the echogenicity, and the relation with adjacent structures of the 2 adrenal glands. A regular bilobed shape for the left adrenal gland long axis and a smooth wedge to elongated ovoid shape for the right adrenal gland long axis were considered as “normal.”¹⁷ “Nodular enlargement” referred to a round, well-defined focal bulge of the adrenal gland without loss of its global shape. Adrenal glands with close maximal dorsoventral thickness and maximal length measurements, resulting in a short ovoid to spherical appearance and complete loss of normal shape, were subjectively described as “rounded.” For both glands, echogenicity was considered “normal” when adrenal gland parenchyma appeared homogeneously hypoechoic to surrounding fat, or when a layered appearance delineating cortex and medulla

was observed.^{17,18} Mixed echogenicities with focal areas of hyper-echogenicity of adrenal parenchyma, or of the adrenal cortex when corticomedullary differentiation was possible, were designed as “heterogeneous.”⁵ Narrowing of vessels in contact to left or right adrenal glands without obvious vascular invasion was considered to be a sign of “vascular compression.”

Histopathology

For histologic examination, the adrenocortical tissue removed surgically or during necropsy was fixed in 10% neutral buffered formalin and routinely embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Histopathological analyses were performed by board-certified pathologists. Adrenal tumors, when identified, were classified as benign or malignant. Tumor architecture, cell pleomorphism, mitosis frequency, and invasive behavior (ie, capsule or vascular invasion) were recorded. Malignancy was considered when at least evidence of invasive behavior was observed. Adrenal tumor functional status was considered when atrophy of the adjacent nontumoral adrenocortical tissue was noted.

Data Analysis

Data were analyzed with commercially available software.^{g,h} Data were not normally distributed and are reported as medians, ranges, and number of subjects. Continuous values obtained from the 2 groups were compared with the Mann-Whitney rank-sum test. Discontinuous values were compared with the Fisher's exact test. A Spearman correlation coefficient (*r*) was used to assess the correlation between variables. *P* < .05 was considered significant. A threshold for SDV was determined from the receiver operating characteristic (ROC) curve. The 95% CI for estimated sensitivity and specificity for SDV were determined by free software.ⁱ

Results

Abdominal US was performed on 81 HAC dogs over the study period. US examinations were considered unequivocal in 34 dogs. These dogs were classified as having ADHAC on the basis of DVTDR < 0.2, confirmed by an unsuppressed plasma ACTH concentration. The remaining 47 dogs were classified as having EAA and were included in the study. Of these, 19 dogs had AIHAC and 28 dogs had ADHAC. Dogs in the ADHAC group were between 4 and 15 years old (median, 12 years) at the time of diagnosis. Thirteen were male and 15 were female. Their BW ranged from 2 to 36 kg (median, 9 kg). Dogs in the AIHAC group were between 6 and 16 years old (median, 10 years). Thirteen were female and 6 were male. Their BW ranged from 5 to 47 kg (median, 14 kg).

Basal plasma ACTH concentrations of dogs in the AIHAC group were undetectable (<5 pg/mL). In dogs with ADHAC, basal plasma ACTH concentrations ranged from 10 to 286 pg/mL (median, 32 pg/mL).

In the ADHAC group, 18 dogs were subjected to a DST, of which 16 showed feedback inhibition: cortisol suppression was observed in 5 dogs after LDDST and in 11 dogs after HDDST. In the remaining 2 dogs, the absence of a decrease in serum cortisol concentration was associated with an absence of suppression of plasma ACTH concentrations (detectable at baseline, 4 and 8 hours).

In the AIHAC group, 14 adrenal glands were removed by surgery (*n* = 9) or necropsy (*n* = 5) and examined by

Table 1. Comparison of the ultrasound appearance of the smallest and largest adrenal gland in AIHAC and ADHAC dogs with EAA.

	AIHAC		ADHAC	
	Larger Gland	Smaller Gland	Larger Gland	Smaller Gland
Shape				
Nodular enlargement	8	0	20	2
Rounded	11	0	2	0
Normal	0	19	6	26
Echogenicity				
Homogeneous	9	19	18	27
Heterogeneous	10	0	10	1
Compression of vessels				
No	13	19	25	28
Yes	6	0	3	0

AIHAC, ACTH-independent hyperadrenocorticism; ADHAC, ACTH-dependent hyperadrenocorticism; EAA, equivocal adrenal asymmetry; ACTH, adrenocorticotrophic hormone.

histopathology. No medical treatment for HAC was administered to dogs before removal. Functional tumors were identified for all 14 adrenal glands, 10 of which were carcinomas and 4 adenomas.

Ultrasonographic examination of the larger of the 2 adrenal glands disclosed nodular enlargement in 20 dogs in the ADHAC group and in 8 dogs with AIHAC (Table 1, Fig 1). A rounded shape of the whole adrenal gland was identified in 2 dogs with ADHAC and in 11 dogs with AIHAC (Fig 2). The basal ACTH concentrations of the 2 dogs with ADHAC and a rounded-shape adrenal gland were 21 and 74 pg/mL, respectively. The frequency of adrenal glands with rounded shape was significantly different between the 2 groups. Heterogeneous echogenicity was observed for 10 adrenal glands in the ADHAC group and for 10 adrenal glands in the AIHAC group (Fig 3). Echogenicity homogeneity did not differ between the 2 groups. Compression of adjacent vessels was identified in 3 adrenal glands from the ADHAC group (compressing aorta, caudal vena cava, and left renal vein, respectively) and in 6 adrenal glands from the AIHAC group (compressing caudal vena cava in 5 cases and left renal artery in 1 case). DST were performed on the 3 ADHAC cases and feedback inhibition was demonstrated after LDDST in 1 dog and HDDST in 2 dogs. Compression of adjacent vessels was not significantly different between the 2 groups.

Ultrasonographic examination of the smaller adrenal gland disclosed nodular enlargement in 2 dogs with ADHAC and heterogeneous echogenicity in 1 dog with ADHAC. Smaller adrenal glands had normal shape with normal echogenicity in all remaining dogs.

LDV measurements were statistically different between the ADHAC and AIHAC groups, with medians (range) of 12.7 (7.0–37.0) and 27.0 (9.8–88.0) mm, respectively (Fig 4). Three dogs of 19 in the AIHAC group had LDV measurements above the range observed in dogs with ADHAC. There was no correlation between

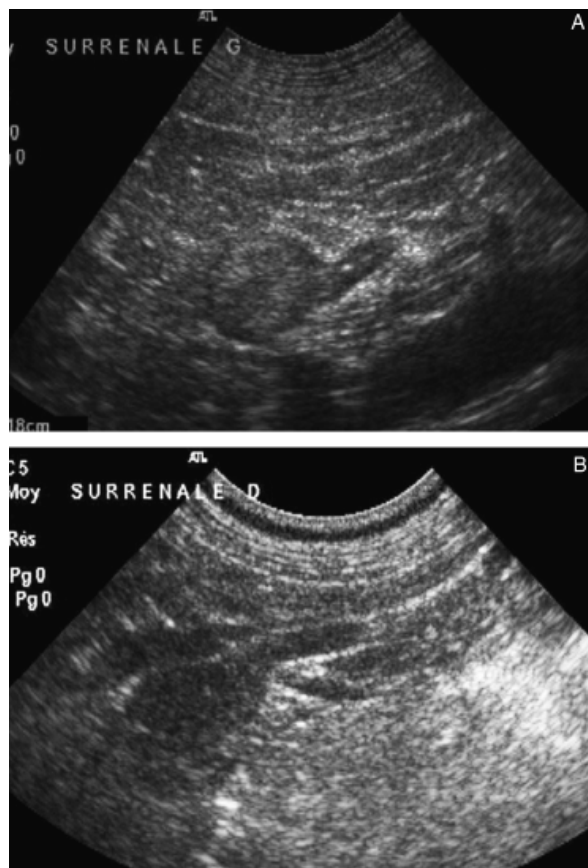


Fig 1. Representative long axis ultrasound views of nodular enlargements of adrenal glands in (A) ADHAC and in (B) AIHAC dogs. Surrenale gauche, Left adrenal gland; Surrenale droite, Right adrenal gland.

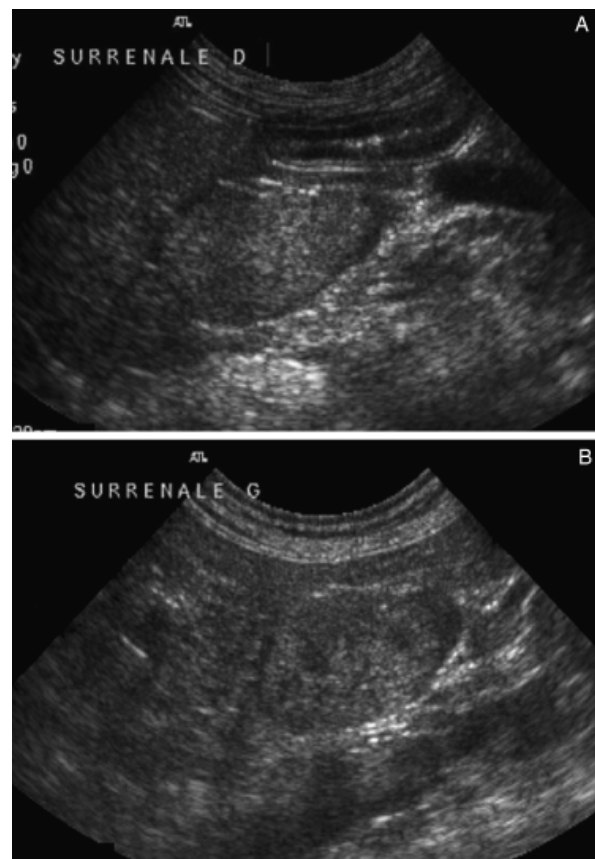


Fig 2. Representative long axis ultrasound views of adrenal glands with rounded shape in (A) ADHAC and in (B) AIHAC dogs (same legend as Figure 1).

LDV and BW in the 2 groups. SDV measurements were statistically different between ADHAC and AIHAC groups, with medians (range) of 7.5 (5.0–14.0) and 3.0 (2.0–5.0) mm, respectively (Fig 5). Eighteen dogs of 19 in the AIHAC group had SDV below the range observed for dogs with ADHAC. There was no correlation between SDV and BW in the 2 groups. DVTDR were statistically different between the ADHAC and AIHAC groups, with medians (range) of 47% (20–126%) and 157% (93–181%), respectively (Fig 6). Sixteen dogs of 19 in the AIHAC group had DVTDR above the range observed for dogs in the ADHAC group. There was no correlation between DVTDR and BW in the 2 groups. DVTR were statistically different for dogs in the ADHAC and AIHAC groups, with medians (range) of 1.6 (1.2–4.3) and 8.3 (2.7–19.7) mm, respectively (Fig 7). Sixteen dogs of 19 in the AIHAC group had DVTR above the range observed for the ADHAC group. There was no correlation between DVTR and BW in the 2 groups.

The ability to distinguish between AIHAC from ADHAC in EAA using SDV measurements was assessed with a ROC curve analysis (Fig 8). The area under the curve of the ROC curve was 0.999. The estimated sensitivity and specificity of SDV measurement delineating AIHAC from ADHAC were 95% (95% CI: 74–99%)

and 100% (95% CI: 88–100%), respectively, for a threshold set at 4.5 mm, and 100% (95% CI: 82–100%) and 96% (95% CI: 82–99%), respectively, for a threshold set at 5.0 mm.

Discussion

This study compares the US appearance of the adrenal glands in 47 dogs with HAC and EAA. Abdominal US is considered to be a reliable tool for distinction between ADHAC and AIHAC in dogs.² Several criteria generally are applied, including homogeneity or heterogeneity of the adrenal glands, shape, compression of adjacent vessels, and symmetry.¹ Symmetry of the adrenal glands is considered to be a crucial factor for this distinction, symmetry being indicative of ADHAC and asymmetry (reflecting an adrenal mass and contralateral adrenal atrophy) indicative of AIHAC.¹ However, to the best of our knowledge, rigorous analyses of the accuracy of these criteria are still lacking. Furthermore, the concept of asymmetry itself is, to a certain extent, ill-defined: criteria for atrophy have not been defined, and a degree of asymmetry has been reported in reference papers describing adrenal ultrasound appearance in ADHAC.^{5,19}

In this study, dogs were classified as having ADHAC or AIHAC based on basal plasma ACTH concentration.

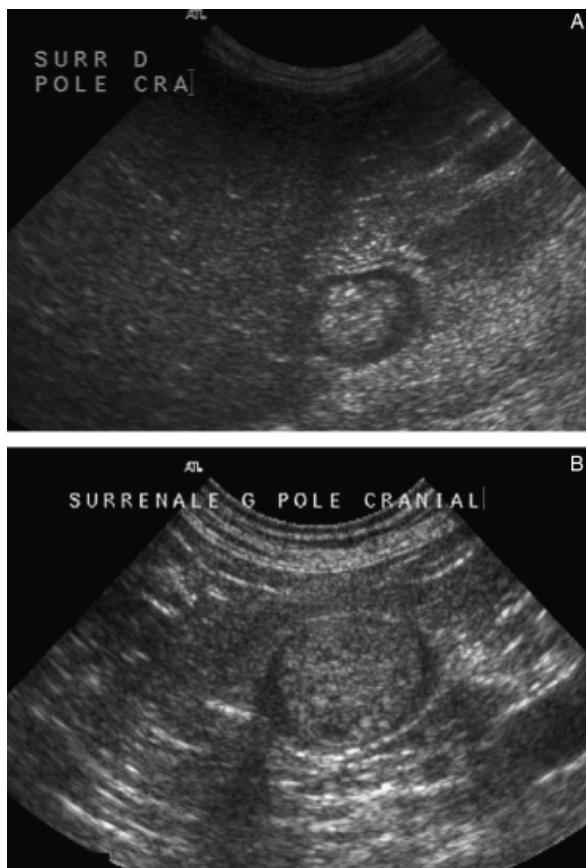


Fig 3. Representative perpendicular to long axis ultrasound views of adrenal glands with heterogeneous echogenicity in (A) ADHAC and in (B) AIHAC dogs. Surr D pole cra, cranial region of the right adrenal gland; Surrenale G pole cranial, cranial region of the right adrenal gland.

In dogs, Cushing's syndrome has long been thought to exist as only 2 forms—PDH or adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH). Other forms of the disease

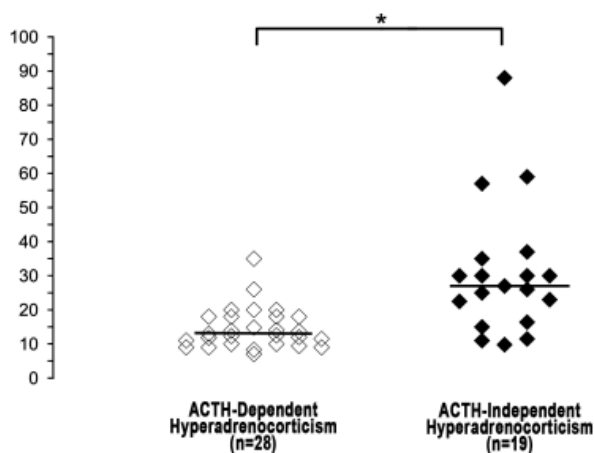


Fig 4. Ultrasound measurements of the maximal dorsoventral thickness of the larger adrenal glands (LDV) (mm) in 28 dogs with ADHAC (white diamonds) and in 19 dogs with AIHAC (black diamonds) with EAA. Median values are represented by horizontal bars. *Statistically significant.

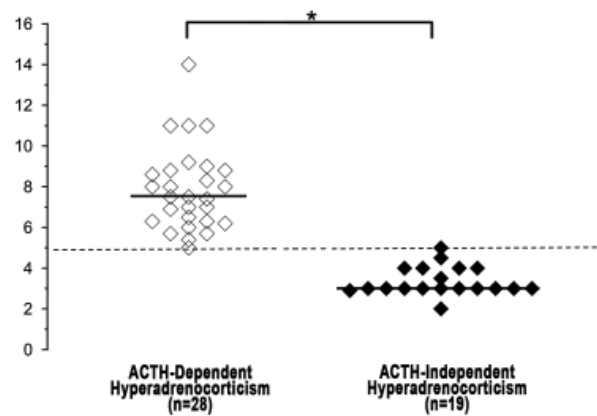


Fig 5. Ultrasound measurements of the maximal dorsoventral thickness of the smaller adrenal glands (SDV) (mm) in 28 dogs with ADHAC and 19 dogs with AIHAC with EAA (same legend as Figure 4). A threshold (dotted line) for the detection of adrenal tumors was set at 5.0 mm.

(HAC because of ectopic ACTH secretion and food-dependent HAC) are well described in humans but have only been recently identified in dogs.^{20–22} Thus, we classified HAC according to criteria generally used in studies of humans, distinguishing between ACTH-dependent and ACTH-independent forms of HAC.^{23,24} Indeed, dogs with ADHAC could have either an ectopic or a pituitary origin of the syndrome, although a pituitary origin is the most common.

The period of enrollment of this study overlaps with the enrollment period of a previously published study evaluating ACTH accuracy for ADHAC and AIHAC discrimination in 109 dogs at the same center.¹⁶ The 2 studies are characterized by distinct inclusion criteria limiting the risks of inclusion of the same dogs. However, 4/28 ADHAC dogs in the present survey were also enrolled in the previous study evaluating ACTH accuracy.¹⁶ The 4 dogs exhibited a cortisol inhibition after DST demonstrating pituitary dependency. Likewise, 5/19 AIHAC dogs in the present study also were already

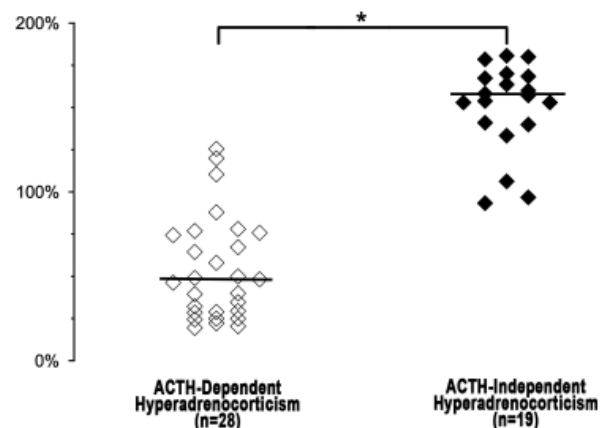


Fig 6. Dorsoventral thickness difference ratios (DVTDR) in 28 dogs with ADHAC and 19 dogs with AIHAC with EAA (same legend as in Figure 4).

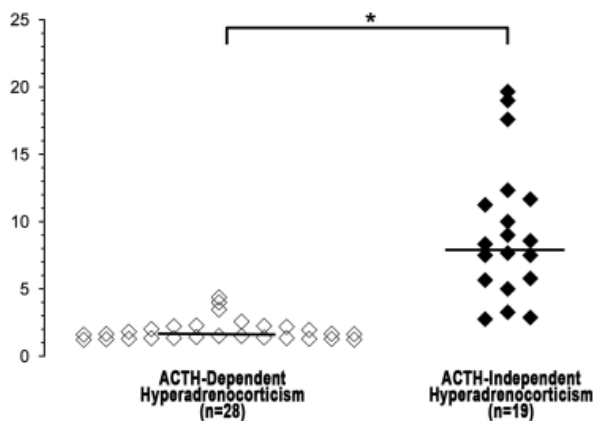


Fig 7. Dorsoventral thickness ratios (DVTR) in 28 dogs with ADHAC and 19 dogs with AIHAC with EAA (same legend as Figure 4).

described.¹⁶ The presence of a FAT (ie, for tumors removed at surgery or necropsy, atrophy of adjacent nontumoral adrenocortical tissue was observed; for tumors removed at necropsy, atrophy of the contralateral adrenal gland was observed) was demonstrated by histopathology for all of them.

In the “ACTH accuracy study,” published previously, no overlap was found between ACTH concentration in 91 dogs with ADHAC and 18 dogs with AIHAC, measured with the same technique.¹⁶ Given the narrowness of the 95% CI for estimated sensitivity and specificity of plasma ACTH concentration for the discrimination of HAC cause, it is unlikely in the current study that dogs

were wrongly classified by ACTH measurement. Indeed, in the present study, the histological examination of adrenal glands from 14/19 AIHAC dogs was consistent with a FAT. Additionally, 18/28 dogs with ADHAC had a DST, 16 of which showed feedback inhibition demonstrating the pituitary origin of the syndrome.¹³ The absence of feedback inhibition in 2/18 dogs tested with DST could be attributed to FATs—highly improbable because of the unsuppressed basal ACTH concentration—to PDH characterized by resistance to dexamethasone suppression, to ectopic Cushing’s syndrome, or to HAC caused by concurrent pituitary and adrenocortical tumors. The presence of both pituitary and adrenocortical tumors in HAC seems to be rare.²⁵ In the largest study of such cases, it was found in only 17 of approximately 1,500 HAC dogs. Moreover, as suggested later by the authors of the study, confusion of concurrent pituitary and adrenocortical tumors with ADHAC with adrenocortical nodular hyperplasia may have resulted in over-inclusion (cortisol suppression in 5 dogs, and, in the case of absence of cortisol suppression, no measurement at the same time of both ACTH and cortisol concentrations over DST in order to analyze the involvement of ACTH-producing tissue and adrenal cortex).¹ In our study, the absence of ACTH suppression in the 2 dogs does not demonstrate or exclude adrenal autonomy. However, given the frequency of ADHAC compared with that of concurrent pituitary and adrenocortical tumors, a single ACTH-producing origin—pituitary gland probably—remains the most likely explanation for these 2 cases.

We only included dogs for which adrenal US was carried out before the start of HAC treatment. Indeed, both trilostane and mitotane are associated with changes in adrenal gland size and appearance^{26–29}; thus such treatment could generate bias in the observations.

The maximal dorsoventral thickness of the adrenal glands has been found to be the only dimension that could be measured in a reliable way with US.^{17,19,30} Measurement by US of other dimensions such as width and length has been shown not to be correlated with gross measurements.¹⁷ The relevance of other quantitative determinations that might be reliable indicators of adrenal gland size such as adrenal volume has still to be evaluated. In the context of this retrospective study, we used the maximal dorsoventral thickness measure for both glands, focusing on EAA. We arbitrarily excluded dogs with <20% difference between the 2 glands and those showing local invasion or organ metastasis consistent with an adrenocortical tumor. Such cases generally are considered unequivocal by clinicians, being indicative of ADHAC and adrenocortical carcinoma, respectively. Among the 81 HAC dogs that were examined by US over the study period, 47 dogs were included. Even if, to our knowledge, the frequency of EAA in dogs has never been studied so far, this frequency probably reflects a selection bias possibly linked to the particularity of the referral population recruited in our center.

In this study, we identified a significant difference in LDV between ADHAC and AIHAC groups. However, a major overlap between the measurements was observed

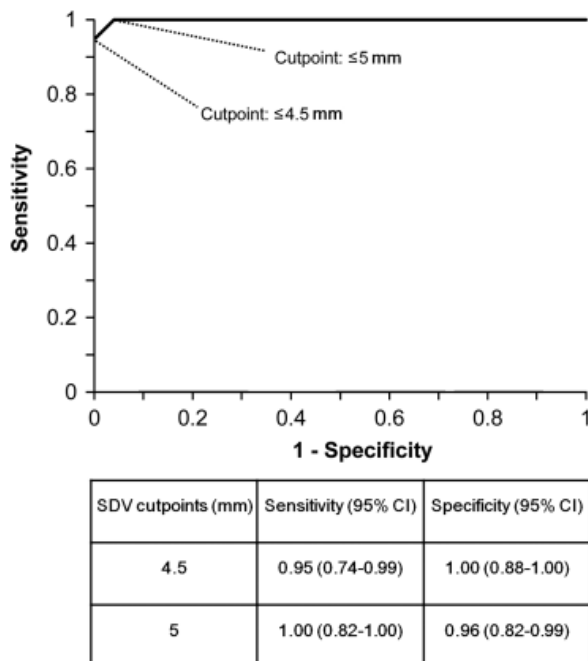


Fig 8. Receiver operating characteristic (ROC) curve, and sensitivity and specificity of 2 selected cut-off values evaluating in EAA dorsoventral thickness of the smaller of the adrenal glands (SDV) as a diagnostic test to distinguish AIHAC from ADHAC dogs.

for the 2 groups. A previous study indicated that a dorso-ventral thickness >20.0 mm is more likely to reflect the presence of an adrenal tumor than hyperplasia.⁷ However, there are exceptions; ADHAC cases have been reported with adrenal gland diameter measuring ≥ 20.0 .³¹ Our study confirms that such a criterion could lead to some cases being wrongly classified, with a LDV between 20.0 and 35.0 mm observed in 5/28 dogs in the ADHAC group. The ADHAC dog with a LDV of 35.0 mm elicited a feedback inhibition response after HDDST. A few days after diagnosis, the dog was euthanized, for reasons unrelated to HAC. The histological examination of the pituitary and adrenal glands showed an adenoma of the *pars distalis*, homogeneous hyperplasia of the smaller adrenal gland (SDV 5.0 mm), and nodular hyperplasia of the enlarged adrenal gland.

The ACTH-secreting tissue and adrenal cortex were not available for histological analysis in many other cases in the ADHAC group because many of them were still alive, and under medical treatment. In the absence of histological analysis, potential extra-adrenocortical pathological features (eg, pheochromocytomas) contributing to adrenal enlargement cannot be completely ruled out, although they appear unlikely because of their scarcity.³² Functional tumors with LDV < 20.0 mm have been described relatively often.^{4,7,8} This study is consistent with previous findings, with 5/19 AIHAC dogs showing LDV < 20.0 mm. The overlap in LDV between the 2 groups shows that use of LDV as the only tool for distinguishing AIHAC and ADHAC would lead to a high rate of misclassification.

In this study, the range of SDV measurements overlapped between the ADHAC and the AIHAC groups by only 1 measurement: 1 dog from each group was found to have an SDV of 5.0 mm. Indeed, in ADHAC, 27/28 SDV measurements were >5.0 mm, ranging from 5.4 to 14.0 mm. The results are in agreement with those of a previously published study in which both adrenal gland widths were measured in 28 dogs with HAC.⁴ In 19/21 dogs classified as having ADHAC, the maximal width of the smallest adrenal gland ranged between 5.2 and 14.3 mm. However, in the same study, 5 dogs classified as having AIHAC had both adrenal gland widths measured, and only 1 had a maximal width of the smallest adrenal gland <5.0 mm (4.3 mm) whereas in the present study, 18/19 SDV of dogs with AIHAC measured between 2.0 and 4.5 mm. In the previous study, allocation of the dogs to AIHAC group was based on indirect criteria (eg, resistance to mitotane treatment, radiographic signs compatible with an adrenal tumor without histological proof of its adrenocortical nature or visualization of images compatible with metastasis without histological proof of their adrenocortical nature) allowing doubts about correct classification.⁴ However, undetectable basal plasma ACTH concentration was identified in the 5 dogs as in the dogs of the present study limiting the risks of misclassification, and the reasons for these differences between the 2 studies remain obscure.

In addition, the observation of a SDV < 5.0 mm in most of the dogs with AIHAC does not agree with another study focusing on the ultrasonographic appearance

of both adrenal glands in 15 dogs with AIHAC caused by FATs.⁸ Unilateral FAT was identified in 12/15 dogs, of which only 7 had a SDV < 5.0 mm. However, classification of AIHAC in this previous study was based on the absence of inhibition feedback after LDDST. Because this absence also is observed in approximately 40% of ADHAC cases,¹³ the inclusion of only dogs with AIHAC was not guaranteed without histological confirmation of FAT or ACTH measurement. In the same study, 3/15 dogs were considered as having 2 FATs, a condition only documented in approximately 10 cases in the literature.^{8,32,33} In the absence of histological analysis, confusion with cases of ADHAC with nodular adrenocortical hyperplasia remains possible. In our study, the absence of double adrenocortical tumors in the AIHAC group probably is linked to the low prevalence of the condition. It could also be explained by the inclusion criteria including only DVTDR $\geq 20\%$, as asymmetry is less likely in bilateral than in unilateral FAT even if cases of bilateral tumors characterized by a certain extent of asymmetry have been described.^{8,32}

This study suggests that SDV measurement is reliable for ADHAC and AIHAC distinction in dogs with EAA: a SDV < 5.0 mm supports AIHAC. The autonomous secretion of cortisol by FAT suppresses pituitary secretion of ACTH. This suppression leads to atrophy of the opposite adrenal cortex.^{1,34} It highlights the importance of evaluating both adrenal glands for the characterization of HAC.¹ Over a long time, visualization of nonenlarged adrenal glands was not guaranteed as many of the studies related to FAT did not give a description of some of the contralateral glands.^{31,33,35} This study has benefited from improvements in ultrasound equipment and skills, allowing the systematic evaluation of the 2 glands for the diagnosis of HAC origin.^{1,2} This study provides, for the first time, cut-offs allowing the distinction of AIHAC and ADHAC in cases of EAA. Using the threshold maximizing AIHAC sensitivity (SDV ≤ 5 mm) the 95% CIs for estimated sensitivity and specificity for AIHAC determination were 82–100 and 82–99%, respectively. Despite the narrow range of specificity and sensitivity values, the observation of adrenal asymmetry with SDV around the cut-off remains equivocal. We therefore used ratios depicting the extent of adrenal asymmetry as a further measurement in such cases. Although statistically different between the 2 groups, DVTR and DVTDR values overlapped between the 2 groups. The use of these 2 ratios didn't allow adequate classification of the 2 cases with SDV = 5.0 mm (data not shown). Other ratios—(LDV / BW, SDV / BW, LDV – SDV) / SDV and (LDV – SDV) / LDV—also were tested without benefit as well (data not shown).

Qualitative criteria related to shape, parenchymal echogenicity, and the effect on surrounding structures also were tested. Because these data were analyzed retrospectively from US reports, bias may have been introduced by under-counting and inaccuracies in the assessment of such subjective criteria. As a matter of fact, although being commonly used in the literature, many of these criteria (eg, nodular enlargement, rounded shape, heterogeneity of the echogenicity of adrenal glands) have

not been precisely defined.^{4,5,8,18} Without demonstration of the reproducibility of these qualitative criteria, risk of disparity of their descriptions exists for each examiner as well as among the different examiners of the present study.

Despite these limitations, this study shows that these data provide inadequate levels of specificity in the AIHAC and ADHAC groups. Heterogeneous parenchyma and focal areas of increased echogenicity previously have been described in adrenal glands of various shapes (normal, nodule, mass), harboring nodular adrenocortical hyperplasia.^{5,7} This study confirms these observations and suggests that these criteria should not be considered as accurate indicators of tumoral origin for HAC. Moreover, this study describes for the first time compression by nodules of adjacent vessels in ADHAC (with ACTH dependency confirmed by plasma ACTH concentration measurement and by cortisol decrease after DST), and shows its limited specificity for determining the presence of tumors.¹

In conclusion, this study highlights the importance of visualization of the atrophied contralateral gland for accurate diagnosis of AIHAC in cases of adrenal asymmetry. It provides, for the first time, a cut-off for SDV of 5.0 mm, allowing the distinction between AIHAC and ADHAC with high sensitivity and specificity in dogs with EAA. Although statistically different between ADHAC and AIHAC, the use of other criteria such as the LDV, the extent of the asymmetry between the 2 glands, changes in echogenicity, and the compression of adjacent vessels is hampered by overlap between the 2 forms of HAC.

Footnotes

^a Enzymun-Test cortisol, Roche Diagnostics, Meylan, France

^b Synacthène injectable, tetracosactide, 0.25 mg/mL, Novartis Pharma SA, Rueil-Malmaison, France

^c Dexadreson, dexamethasone phosphate, 2 mg/mL, Intervet—Shering Plough, Beaucauzé, France

^d Immulite ACTH, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA

^e Immulite 2000, Siemens Medical Solutions Diagnostics

^f Philips Advanced Technology Laboratories HDI 3500, Philips, Eindhoven, The Netherlands

^g Microsoft Office Excel 2003 software, Microsoft Corporation, Redmond, WA

^h SAS/STAT software, version 5.0, SAS Institute Inc, Cary, NC

ⁱ MedCalc software, version 10.0.1, Mariakerke, Belgium

^j Peterson ME. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with Cushing's syndrome. Proceedings 19th Annual Forum of the ACVIM, Denver, CO 2001 (abstract)

María Isabel Rodríguez Piñeiro and by grants from the Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

References

1. Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. St Louis, MO: Saunders; 2004:252–357.
2. Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin Tech Small Anim Pract* 2007;22:2–11.
3. Behrend EN, Kemppainen RJ, Clark TP, et al. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs: A survey of internists and dermatologists. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220:1643–1649.
4. Gould SM, Baines EA, Mannion PA, et al. Use of endogenous ACTH concentration and adrenal ultrasonography to distinguish the cause of canine hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 2001;42:113–121.
5. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK, Miyabayashi T. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: Comparison with normal dogs. *J Vet Intern Med* 1996;10:110–115.
6. Anderson CR, Birchard SJ, Powers BE, et al. Surgical treatment of adrenocortical tumors: 21 cases (1990–1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 2001;37:93–97.
7. Besso JG, Penninck DG, Gliatto JM. Retrospective ultrasonographic evaluation of adrenal lesions in 26 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1997;38:448–455.
8. Hoerauf A, Reusch CE. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;51:193–199.
9. Ginel PJ, Perez-Rico A, Moreno P, Lucena R. Validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of cortisol in canine plasma samples. *Vet Res Commun* 1998;22:179–185.
10. Meijer JC, de Bruijne JJ, Rijnberk A, Croughs RJ. Biochemical characterization of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in the dog. *J Endocrinol* 1978;77:111–118.
11. Meijer JC, Lubberink AA, Rijnberk A, Croughs RJ. Adrenocortical function tests in dogs with hyperfunctioning adrenocortical tumours. *J Endocrinol* 1979;80:315–319.
12. Feldman EC. Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening tests in canine hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1983;182:506–510.
13. Feldman EC, Nelson RW, Feldman MS. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:772–775.
14. Granger N, de Fornel P, Devauchelle P, et al. Plasma pro-opiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med* 2005;19:23–28.
15. Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Brown JA, et al. Validation of a chemiluminescent enzyme immunoassay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. *Vet Clin Pathol* 2003;32:180–187.
16. Rodríguez Piñeiro I, Benčekroun G, de Fornel-Thibaud P, et al. Accuracy of an ACTH immuno luminometric assay for differentiating ACTH-dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:850–855.
17. Grooters AM, Biller DS, Merryman J. Ultrasonographic parameters of normal canine adrenal glands: Comparison to necropsy findings. *Vet Radiol Ultrasound* 1995;36:126–130.

Acknowledgments

This work was supported by postdoctoral grants from Intervet Pharma R & D SA, Angers, France, awarded to Ghita Benčekroun, and from the Consellería de Innovación e Industria (Xunta de Galicia) awarded to

18. Tidwell AS, Penninck DG, Besso JG. Imaging of adrenal gland disorders. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997;27:237–254.
19. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1995;207:1180–1183.
20. Churcher RK. Hepatic carcinoid, hypercortisolism and hypokalaemia in a dog. *Aust Vet J* 1999;77:641–645.
21. Galac S, Kooistra HS, Voorhout G, et al. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:338–348.
22. Galac S, Kars VJ, Voorhout G, et al. ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: A case report. *Vet J* 2008;177:141–143.
23. Newell-Price J, Trainer P, Besser M, Grossman A. The diagnosis and differential diagnosis of Cushing's syndrome and pseudo-Cushing's states. *Endocr Rev* 1998;19:647–672.
24. Boscaro M, Barzon L, Fallo F, Sonino N. Cushing's syndrome. *Lancet* 2001;357:783–791.
25. Greco DS, Peterson ME, Davidson AP, et al. Concurrent pituitary and adrenal tumors in dogs with hyperadrenocorticism: 17 cases (1978–1995). *J Am Vet Med Assoc* 1999;214:1349–1353.
26. Keiser M, Flückiger M, Gardelle O, Reusch CE. Mitotane treatment in a dog with a recurring adrenocortical carcinoma—a case report. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1999;141:279–285.
27. Horauf A, Reusch C. Effects of mitotane therapy in dogs with pituitary dependent Cushing syndrome on the adrenal gland size—an ultrasonographic study. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1999;141:239–245.
28. Mantis P, Lamb CR, Witt AL, Neiger R. Changes in ultrasonographic appearance of adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Vet Radiol Ultrasound* 2003;44:682–685.
29. Ruckstuhl NS, Nett CS, Reusch CE. Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Am J Vet Res* 2002;63:506–512.
30. Nyland TG, Mattoon JS, Herrgesell EJ, Wisner ER. Adrenal glands. In: Nyland TG, Mattoon JS, eds. *Small Animal Diagnostic Ultrasound*. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2002:196–206.
31. Kantrowitz BM, Nyland TG, Feldman EC. Adrenal ultrasonography in the dog. Detection of tumors and hyperplasia in hyperadrenocorticism. *Vet Radiol Ultrasound* 1986;27:91–96.
32. Ford SL, Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: Four cases (1983–1988). *J Am Vet Med Assoc* 1993;202:789–792.
33. Reusch CE, Feldman EC. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *J Vet Intern Med* 1991;5:3–10.
34. Orth DN, Kovacs WJ. The adrenal cortex. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1998:517–664.
35. Poffenbarger EM, Feeney DA, Hayden DW. Gray-scale ultrasonography in the diagnosis of adrenal neoplasia in dogs: Six cases (1981–1986). *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:228–232.

1.3.2. Utilisation de l'examen tomodensitométrie

Dans une deuxième étude portant sur 64 chiens, nous avons analysé les résultats de l'examen tomodensitométrie des surrénales et de l'hypophyse des chiens atteints. Dans cette étude, un recouvrement important de l'ensemble des critères testés entre forme dépendante et indépendante de l'ACTH a été identifié. Néanmoins, la spécificité du ratio du diamètre maximal de la surrénale de la plus grande taille sur le diamètre maximal de la surrénale de la plus petite taille pour la distinction des formes indépendantes de l'ACTH a été jugée acceptable avec un seuil décisionnel positionné à 2,08 (intervalle de confiance à 95% de sensibilité et la spécificité estimés entre 0,915 et 1,000 et 0,885 et 0,999 respectivement).

Use of computed tomography adrenal gland measurement for differentiating ACTH dependence from ACTH independence in 64 dogs with hyperadenocorticism.

M.I. Rodríguez Piñeiro, P. de Fornel-Thibaud, **G. Benckroun**, F. Garnier, C. Maurey-Guenec, F. Delisle, and D. Rosenberg.

J Vet Intern Med 2011;25:1066-74.

Use of Computed Tomography Adrenal Gland Measurement for Differentiating ACTH Dependence from ACTH Independence in 64 Dogs with Hyperadrenocorticism

M.I. Rodríguez Piñeiro, P. de Fornel-Thibaud, G. Benchenkroun, F. Garnier, C. Maurey-Guenec, F. Delisle, and D. Rosenberg

Background: The measurement of adrenal gland size on computed tomography (CT) scan has been proposed for the etiological diagnosis of hyperadrenocorticism (HAC) in dogs. Symmetric adrenal glands are considered to provide evidence for ACTH-dependent hyperadrenocorticism (ADHAC), whereas asymmetry suggests ACTH-independent hyperadrenocorticism (AIHAC). However, there are currently no validated criteria for such differentiation.

Objective: The aim of this retrospective study was to compare various adrenal CT scan measurements and the derived ratios in ADHAC and AIHAC cases, and to validate criteria for distinguishing between these conditions in a large cohort of dogs.

Animals: Sixty-four dogs with HAC (46 ADHAC, 18 AIHAC).

Methods: Dogs with confirmed HAC and unequivocal characterization of its origin were included. Linear measurements of adrenal glands were made on both cross-sectional and reformatted images.

Results: An overlap was systematically observed between the AIHAC and ADHAC groups for all measurements tested. Overlaps also were observed for ratios tested. For the maximum adrenal diameter ratio derived from reformatted images (rADR), only 1/18 AIHAC dogs had a rADR within the range for ADHAC. For a threshold of 2.08, the 95% confidence intervals for estimated sensitivity and specificity extended from 0.815 to 1.000 and from 0.885 to 0.999, respectively, for AIHAC diagnosis.

Conclusion and Clinical Importance: Measurements from cross-sectional or reformatted CT scans are of little use for determining the origin of HAC. However, rADR appears to distinguish accurately between ADHAC and AIHAC, with a rADR > 2.08 highly suggestive of AIHAC.

Key words: Adrenal gland; Computed tomography; Diagnostic imaging; Endocrinology; Hyperadrenocorticism.

Hyperadrenocorticism (HAC), or Cushing's syndrome, is a commonly diagnosed endocrine disorder in dogs. Adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-dependent hyperadrenocorticism (ADHAC) is the most common form of HAC. The presence of a pituitary adenoma usually is responsible for this condition, although rare examples of ectopic secretion have occasionally been described.^{1–3} HAC is ACTH-independent hyperadrenocorticism (AIHAC) in 10–15% of affected dogs. The major form of AIHAC is triggered by a functional adrenocortical tumor, adenoma, or carcinoma, and is known as adrenal-dependent hyperadrenocorticism (ADH). One case of food-dependent AIHAC also has been described recently.^{2,4}

Correct differentiation between ADHAC and AIHAC is essential for prognosis and treatment decisions. Over

Abbreviations:

ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ADHAC	ACTH-dependent hyperadrenocorticism
AIHAC	ACTH-independent hyperadrenocorticism
Ao	aorta diameter
CT	computed tomography
DST	dexamethasone suppression test
HAC	hyperadrenocorticism
HDDST	high-dose dexamethasone suppression test
LAD	maximum diameter of the larger adrenal gland
LDDST	low-dose dexamethasone suppression test
rADR	adrenal diameter ratio on reformatted images
rALR	adrenal length ratio on reformatted images
rLAD	maximum diameter of the larger adrenal gland on reformatted images
rLAL	maximum length of the larger adrenal gland on reformatted images
rSAD	maximum diameter of the smaller adrenal gland on reformatted images
rSAL	maximum length of the smaller adrenal gland on reformatted images
SAD	maximum diameter of the smaller adrenal gland
SAL	maximum length of the smaller adrenal gland
m	

From the Internal Medicine Unit, National Veterinary School of Alfort, Maisons-Alfort, France (Rodríguez Piñeiro, Benchenkroun, de Fornel-Thibaud, Maurey-Guenec, Delisle, Rosenberg); the Internal Medicine Unit, National Veterinary School of Lyon, Marcy l'Étoile, France (Rodríguez Piñeiro); the Veterinary Anticancer Center, Maisons-Alfort, France (de Fornel-Thibaud, Delisle); and the Biochemistry Unit, National Veterinary School of Lyon, Marcy l'Étoile, France (Garnier). Part of this work was presented at the ECVIM-CA Congress, in Porto (Portugal), in September 2009.

Corresponding author: D. Rosenberg, DVM, PhD, Internal Medicine Unit, National Veterinary School of Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort, France; e-mail: drosenberg@vet-alfort.fr

Submitted November 12, 2010; Revised June 1, 2011; Accepted June 24, 2011.

Copyright © 2011 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2011.0773.x

the last 30 years, imaging techniques and endocrine tests have been developed for this purpose.^{5–13} Pituitary enlargement can be identified in pituitary-dependent HAC, the main form of ADHAC, on computed tomography (CT) scans, for example,^{14,15} but pituitary-dependent HAC with a pituitary gland of normal appearance also may occur,^{2,16,17} presumably resulting from an overlap

with the appearance of the pituitary gland in dogs with AIHAC. Measurement of the adrenal glands by imaging is an obvious strategy for determining the cause of HAC. Symmetric normal sized or enlarged adrenal glands are expected in ADHAC, whereas strong asymmetry is expected in cases of AIHAC caused by unilateral functional adrenal tumors.^{18,19} CT measurements of the adrenal glands occasionally have been reported in healthy dogs, dogs with adrenal tumors and dogs with adrenal hyperplasia because of ADHAC, and different methods have been described for determining maximum diameter and length,^{14,20–22} as well as the volume of the adrenal glands.^{23,24} Cross-sectional views initially were considered for the measurement of maximum adrenal gland diameter.¹⁴ However, there is a risk of miscalculation with this technique when the long axis of the measured adrenal gland is not perpendicular to the transverse view. Obtaining transverse views from reformatted images is feasible with new software.²³ This strategy could optimize the fit to the short axis of the adrenal glands. Adrenal gland length also can be calculated from reformatted images, but the use of this method in dogs has not been reported. The accuracy, for discrimination between ADHAC and AIHAC, of maximum adrenal gland diameter on transverse or reformatted CT scans and of adrenal gland length on reformatted images or of any other ratio calculated from CT scan measurements, has not been determined in a large cohort of dogs.

The aims of this study were to evaluate the accuracy of adrenal length and diameter measurements taken on CT scans for the etiologic diagnosis of HAC in a large cohort of dogs, and to compare the performance of maximum diameter measurements and derived ratios obtained from cross-sectional and reformatted images for distinguishing between AIHAC and ADHAC.

Materials and Methods

Clinical Cases

The medical records of dogs evaluated at the Internal Medicine Unit of the National Veterinary School of Alfort (France), between January 1, 2003 and April 30, 2010, were reviewed. Included were all dogs with:

- (1) A history, physical examination, biochemical, and hematological findings consistent with HAC.
- (2) At least 1 endocrine test result, ACTH stimulation test, or low-dose dexamethasone suppression test (LDDST) supporting the diagnosis of HAC.
- (3) Unequivocal determination of the origin of HAC. For dogs in this study, this determination was based on the measurement of ACTH concentration. Because the inclusion period of this study overlapped that of a previous study evaluating the accuracy of ACTH determination for etiologic diagnosis in HAC, dogs included in both studies were assigned to the ADHAC group only if a dexamethasone suppression test (DST) was performed and feedback inhibition was observed, and to the AIHAC group in cases of histologic analysis showing the presence of a functional adrenal tumor. For dogs included in this study, additional information for HAC characterization (feedback inhibition in response to DST and histologic features of

adrenocortical tissue removed by surgery or necropsy) was collected when available.

- (4) Pituitary and abdominal CT scans were performed before treatment.

Endocrine Tests and Hormone Assays

Plasma cortisol concentrations were determined by dynamic endocrine tests, with a kit^a validated previously in dogs.²⁵ The ACTH stimulation test, based on the IV administration of 0.25 mg of tetracosactide,^b the LDDST, based on the IV administration of dexamethasone^c at a dosage of 0.01 mg/kg of body weight, and the high-dose dexamethasone suppression test (HDDST), based on the IV administration of 0.1 mg/kg body weight of dexamethasone, were performed as described previously.^{6,11,26–28} Hyperadrenocorticism was confirmed by a marked increase in serum cortisol concentration (≥ 500 nmol/L) 1 hour after ACTH stimulation, an inadequate decrease in serum cortisol concentration (≥ 40 nmol/L) 8 hours after dexamethasone injection, or both. ADHAC was demonstrated by feedback inhibition 4 or 8 hours after dexamethasone injection in the DST. For the LDDST, feedback inhibition was defined as a 4-hour cortisol concentration < 40 nmol/L or $< 50\%$ of the basal concentration, or an 8-hour cortisol concentration $< 50\%$ of the basal concentration but ≥ 40 nmol/L. For the HDDST, feedback inhibition was defined as a 4-hour or 8-hour serum cortisol concentration < 40 nmol/L or $< 50\%$ of the basal concentration.¹¹

Blood samples for ACTH determination were collected from the jugular vein into EDTA-coated tubes. The samples were immediately centrifuged at 4°C, 500 × g for 8 minutes, and the resulting plasma was transferred to plastic tubes and stored at –80°C until required. Plasma ACTH concentrations were determined with Immulite ACTH,^d validated previously for dogs, run on an Immulite 2000 analyzer.^{d,29} All dogs with an unsuppressed ACTH concentration (≥ 6 pg/mL) were considered to have ADHAC, and dogs with an ACTH concentration below the limit of quantification of the assay (< 5 pg/mL) were considered to have AIHAC.¹³

CT Scans

Food was withheld from the dogs for 12 hours before CT examination of the pituitary and adrenal glands. Anesthesia was induced by the IV administration of 6.5 mg/kg of propofol (1 g/100 mL)^e and was maintained with inhaled isoflurane^f and oxygen. With dogs in sternal recumbency, a CT scan of the neurocranium, between the external occipital protuberance and the cribriform plate, before and 1–2 minutes after the IV injection of contrast medium^g (2 mL/kg), administered as a hand-injected bolus, was performed with a helical CT scanner.^h The scanning parameters were as follows: full axial modality, 120 kVp, 90–224 mA, 512–512 matrix, 3-mm-thick consecutive slices. A contrast-enhanced CT scan of the cranial abdomen was obtained 5–10 minutes after postcontrast image acquisition for the pituitary gland region. The scanning parameters were as follows: helical modality, 0.7 s/rotation, standard algorithm, 120 kVp, 100–130 mA, 512–512 matrix, 1.25 mm slice thickness, pitch 0.625:1.

All images were transferred to a workstationⁱ and analyzed by one of the authors blinded to the origin of HAC for each dog.

Pituitary images were evaluated with the same window settings (window width 250, window length 80). Homogeneous or heterogeneous contrast enhancement of the pituitary gland was noted and the pituitary height/brain area (P/B) ratio was calculated as the ratio of pituitary gland height (mm) to brain area (mm²).^{16,28} Pituitary glands with a P/B ratio $\leq 0.31 \times 10^{-2} \text{ mm}^{-1}$ were considered normal in size, and those with a P/B ratio $> 0.31 \times 10^{-2} \text{ mm}^{-1}$ were considered enlarged, as described previously.¹⁶

Abdominal images were evaluated with standard abdominal windowing (400 window width/40 window level). Cross-sectional and reformatted images were examined.

On cross-sectional images, the adrenal glands were round to oval. For apparently oval glands, the largest diameter of the section was measured and, after evaluation of all sections of each gland, only the maximum diameters of the larger (LAD) and smaller (SAD) adrenal glands were recorded. The impact of the choice of cross-sectional view chosen on aorta diameter (Ao) calculation was investigated in 5 dogs selected randomly. On day 1, Ao was measured on the cross-sectional view on which the LAD was obtained. On day 2, Ao was measured on the cross-sectional view on which the SAD was obtained. On day 3, all cross-sectional views containing at least 1 adrenal gland subsequently were numbered cranio-caudally and Ao was measured on the median view. There was systematically <5% difference among the means of these 3 measurements and these differences therefore were considered nonsignificant. By way of consequences, Ao was measured as on day 3 for all dogs. The following ratios were calculated: LAD/Ao, SAD/Ao, and the adrenal diameter ratio (ADR), defined as the ratio of the maximum diameters of the 2 adrenal glands (LAD/SAD).

Reformatted images for each adrenal gland were obtained from the cross-sectional images. Parasagittal reconstruction planes containing adrenal glands were progressively modified to oblique, with no curving of the plane until the maximum length of each adrenal gland was reached. The maximum lengths of the adrenal glands then were measured. The lengths of the glands identified as the larger and the smaller gland on reformatted images were designated rLAL and rSAL, respectively. Full sections of each adrenal gland then were reformatted perpendicular to the long axis of the main body of the adrenal gland. The maximum diameters on reformatted views of the larger and smaller glands identified on cross-sectional images were designated rLAD and rSAD, respectively. Ratios (rLAD/Ao, rSAD/Ao, and rADR) analogous to those for the cross-sectional images then were calculated. Additional ratios based on adrenal length, such as the adrenal length ratio (rALR), defined as the ratio of rLAL to rSAL (rLAL/rSAL), and maximum adrenal length divided by Ao for each gland (rLAL/Ao, rSAL/Ao), also were established.

For each adrenal gland, we assessed mural compression and intraluminal invasion of the surrounding vasculature (caudal vena cava, aorta, and renal veins and arteries), as described previously.³⁰ Intraluminal vascular invasion was defined as the presence of a contrast medium void within a vessel continuous with the adrenal gland. Mural compression was defined as displacement of the vessel wall without luminal invasion. The presence or absence of calcification also was recorded.

Histology

For histological examination, adrenocortical tissue removed surgically or during necropsy was fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections were cut and stained with hematoxylin and eosin. Histologic analyses were performed by board-certified pathologists. Adrenal tumors were classified as benign or malignant. Tumor architecture, cell pleomorphism, mitosis frequency, and invasive behavior (ie, capsule or vascular invasion) were recorded. Malignancy was considered in all cases in which at least some evidence of invasive behavior was observed. The functional status of adrenal tumors was considered when atrophy of the adjacent nontumoral adrenocortical tissue was noted.³¹

Data Analysis

Data were analyzed with commercially available software,^j with the significance level set at 5%. The Shapiro-Wilk *W*-test was used to assess the normality of the data. Data were not normally distrib-

uted and therefore described with medians and ranges. Mann-Whitney rank-sum tests were used to compare adrenal measurements between the 2 groups. The thresholds for the most discriminatory parameters were determined from the receiver operating characteristics (ROC) curve. The 95% confidence intervals (CI) for the estimated sensitivity and specificity of these parameters were identified with free software.^k

Results

Criteria for inclusion in this study were met by 64 dogs. The AIHAC group contained 18 dogs and the ADHAC group contained 46 dogs. Median age at diagnosis was 11 years (range, 7–15 years) for dogs with AIHAC and 11 years (range, 5–15 years) for dogs with ADHAC. The male/female ratio was 10/8 for dogs with AIHAC and 19/27 for dogs with ADHAC. The AIHAC group consisted of 5 Labrador Retrievers, 4 cross-breeds, 2 Fox Terriers, and 7 individuals of other breeds. The ADHAC group consisted of 10 Yorkshire Terriers, 5 Poodles, 4 Boxers, 2 Dachshunds, 2 Bichons, 2 American Staffordshire Terriers, and 2 Labrador Retrievers. The remaining 19 dogs were cross-breeds (5 dogs) and individuals of other breeds.

ACTH stimulation tests were performed in 41 dogs (13 AIHAC and 28 ADHAC) and HAC was confirmed by an abnormal response to ACTH stimulation in 39 dogs (11 AIHAC and 28 ADHAC). The LDDST was performed in 34 dogs (9 AIHAC and 25 ADHAC) and an unsuppressed cortisol concentration 8 hours after dexamethasone injection was observed in 33 of these dogs (8 AIHAC and 25 ADHAC).

ACTH concentration was <5 pg/mL in AIHAC dogs and was between 8 and 500 pg/mL in ADHAC dogs. In 13/18 dogs of the AIHAC group, histologic analysis was possible after adrenalectomy or necropsy, and revealed the presence of a functional adrenal tumor. Carcinoma was diagnosed in 7 dogs and adenoma in the remaining 6 dogs. Six of these 13 dogs (4 dogs with adrenocortical carcinoma and 2 with adenoma) had been included in a previous study.¹³ In the 46 ADHAC dogs, 19 dogs displayed feedback inhibition after LDDST, with another 3 dogs displaying suppression after HDDST. Thirteen of these 22 dogs with feedback inhibition were included in the previous study.¹³

The size of the pituitary gland was considered normal in all dogs in the AIHAC group. The pituitary gland was considered enlarged in 20/46 dogs in the ADHAC group. Homogeneous attenuation was noted in 56/64 dogs. In 8 dogs with enlarged pituitary glands, attenuation appeared to be heterogeneous. P/B ratios differed significantly between the AIHAC and ADHAC groups ($P < .01$) with median values (range) of 0.22×10^{-2} ($0.15\text{--}0.31 \times 10^{-2}$) mm^{-1} and 0.27×10^{-2} ($0.14\text{--}1.35 \times 10^{-2}$) mm^{-1} , respectively. In 25/46 ADHAC dogs, P/B ratio values overlapped with the range of P/B ratios for the AIHAC group.

Compression or invasion of blood vessels by adrenal glands was observed only in the AIHAC group. Renal vein compression was identified in 7/18 animals (5/7 right renal vein, 2/7 left renal vein); compression of the caudal

vena cava by the right adrenal gland was observed in 5/18 dogs and invasion of the caudal vena cava by the right adrenal gland was observed in 1/18 dogs. Arterial compression also was observed, with the aorta affected in 2/18 cases and the left renal artery affected in 2 other cases. Calcification of 1 of the 2 glands was visible in 10/18 AIHAC dogs and 1/46 ADHAC dogs. In all of these cases, the larger of the adrenal gland was always involved.

In 9 AIHAC dogs (4 carcinomas and 5 adenomas) with vascular compression or invasion, and in 5 AIHAC dogs (4 carcinomas and 1 adenoma) with adrenal calcifications on CT scan images, macroscopic examination during necropsy or surgery, and subsequent histologic analysis were possible. In all of these cases, vascular compression or invasion and adrenal calcification were confirmed.

Measurements of LAD and SAD on cross-sectional CT images and the resulting LAD/Ao, SAD/Ao, and ADR values differed significantly between the AIHAC and ADHAC groups (Table 1 and Figs 1–3). Measurements for AIHAC dogs overlapped with those of ADHAC dogs for 12/18 dogs for LAD and 14/18 dogs for SAD. The calculated ratios for the AIHAC group overlapped with those of the ADHAC group for 12/18 dogs for LAD/Ao, 6/18 dogs for SAD/Ao, and 3/18 dogs for ADR.

Table 1. Measurements and ratios for evaluating the size of the adrenal glands in 46 dogs with ADHAC and in 18 dogs with AIHAC ($P < .05$ considered significant).

Measurements	AIHAC		ADHAC		<i>P</i>
	Median	Range	Median	Range	
Cross-sectional images					
LAD	25.0	15.6–68.0	15.0	6.3–29.2	<.001
SAD	6.7	3.3–9.5	12.1	5.4–24.4	<.001
Ao	10.0	6.0–14.1	9.4	4.0–16.0	.347
LAD/Ao	2.4	1.65–4.82	1.55	0.85–3.28	<.001
SAD/Ao	0.63	0.33–1.20	1.33	0.76–1.82	<.001
ADR	3.20	2.26–10.79	1.17	1.01–2.51	<.001
Reformatted images					
rLAD	23.4	13.8–63.0	11.8	5.5–28.8	<.001
rSAD	6.9	3.1–8.8	10.1	5.0–19.6	<.001
rLAL	30.2	15.4–77.2	24.3	10.9–39.7	.143
rSAL	18.9	9.2–27.7	19.8	9.4–38.9	.081
rLAD/Ao	2.23	1.43–4.66	1.30	0.87–2.77	<.001
rSAD/Ao	0.61	0.32–0.84	1.09	0.70–1.83	<.001
rADR	3.70	2.39–11.25	1.14	1.01–2.42	<.001
rLAL/Ao	2.95	1.56–5.84	2.70	1.74–3.47	.263
rSAL/Ao	1.75	0.95–3.14	2.29	1.36–3.13	.001
rALR	1.43	1.17–3.05	1.13	1.01–1.56	<.001

ADHAC, ACTH-dependent hyperadrenocorticism; AIHAC, ACTH-independent hyperadrenocorticism; Ao, aorta diameter; LAD, maximum diameter of the larger adrenal gland; rADR, adrenal diameter ratio on reformatted images; rALR, adrenal length ratio on reformatted images; rLAD, maximum diameter of the larger adrenal gland on reformatted images; rLAL, maximum length of the larger adrenal gland on reformatted images; rSAD, maximum diameter of the smaller adrenal gland on reformatted images; rSAL, maximum length of the smaller adrenal gland on reformatted images; SAD, maximum diameter of the smaller adrenal gland; SAL, maximum length of the smaller adrenal gland.

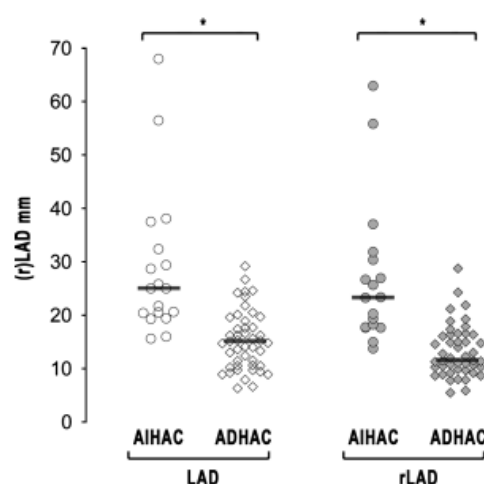


Fig 1. Maximum adrenal diameter of the larger adrenal gland on cross-sectional computed tomography scan views (LAD, open symbols) and reformatted images (rLAD, closed symbols) in dogs with ADHAC (diamonds) and AIHAC (circles). Median values are indicated by horizontal lines (*statistically significant). LAD, maximum diameter of the larger adrenal gland; rLAD, maximum diameter of the larger adrenal gland on reformatted images; ADHAC, ACTH-dependent hyperadrenocorticism; AIHAC, ACTH-independent hyperadrenocorticism.

ROC curve analysis was used to assess the extent to which ADR distinguished between AIHAC and ADHAC. The area under the curve of the ROC curve was 0.994, with a 95% CI of 0.932–1.000. The sensitivity and specificity (95% CI) of ADR for AIHAC detection were 1.000 (0.815–1.000) and 0.956 (0.852–0.995), respectively, for a threshold of 1.95, 0.944 (0.727–0.999) and

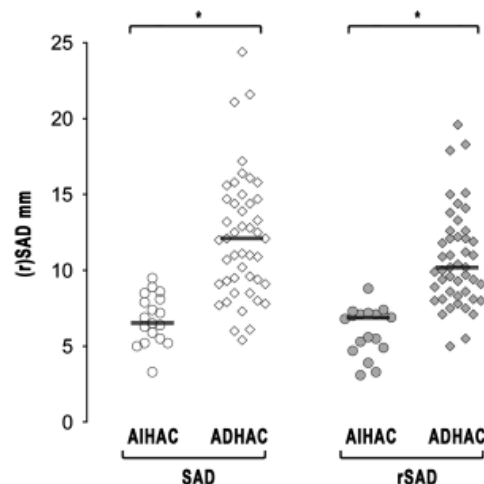


Fig 2. Maximum adrenal diameter of the smaller adrenal gland on cross-sectional computed tomography scan views (SAD, open symbols) and reformatted images (rSAD, closed symbols) in dogs with ADHAC (diamonds) and AIHAC (circles). Median values are indicated by horizontal lines (*statistically significant). SAD, maximum diameter of the smaller adrenal gland; rSAD, maximum diameter of the smaller adrenal gland on reformatted images; ADHAC, ACTH-dependent hyperadrenocorticism; AIHAC, ACTH-independent hyperadrenocorticism.

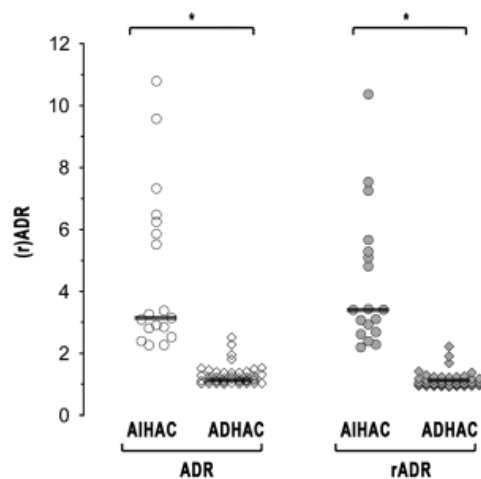


Fig 3. Adrenal diameter ratio (ADR, open symbols) and reformatting adrenal diameter ratio (rADR, closed symbols) in dogs with ADHAC (diamonds) and AIHAC (circles). Median values are indicated by horizontal lines (*statistically significant). ADHAC, ACTH-dependent hyperadrenocorticism; AIHAC, ACTH-independent hyperadrenocorticism.

0.957 (0.852–0.995), respectively, for a threshold of 2.26, and 0.833 (0.586–0.964) and 1.000 (0.923–1.000), respectively, for a threshold of 2.51.

For length-based ratios derived from reformatted images, significant differences between the 2 groups were found only for rSAL/Ao and rALR (Table 1). The rSAL/Ao and rALR values of AIHAC dogs overlapped with those of ADHAC dogs in 15/18 and 10/18 cases, respectively.

On reformatted images, rLAD and rSAD measurements and the values of rLAD/Ao, rSAD/Ao, and rADR obtained differed significantly between the ADHAC and AIHAC groups (Figs 1–3 and Table 1). Both rLAD and rSAD values overlapped with those of the ADHAC dogs in 13/18 AIHAC dogs. An overlap with the values

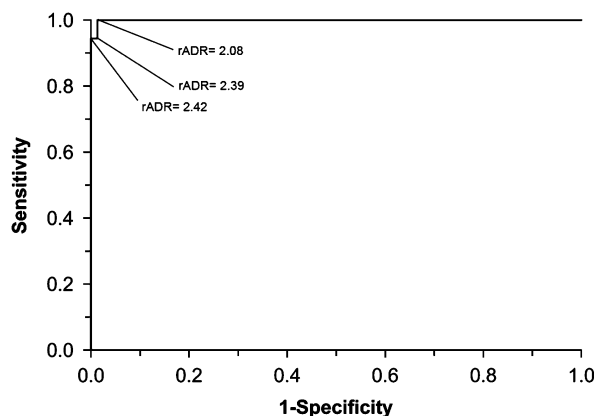


Fig 4. Receiver operating characteristics (ROC) curve, and sensitivity and specificity of 3 selected cutoff values for evaluation of reformatted adrenal diameter ratio (rADR) as a diagnostic test for distinguishing between AIHAC and ADHAC in dogs. ADHAC, ACTH-dependent hyperadrenocorticism; AIHAC, ACTH-independent hyperadrenocorticism.

obtained for ADHAC was observed for rLAD/Ao, rSAD/Ao, and rADR, for 12, 6, and 1 of the 18 dogs of the AIHAC group, respectively.

ROC curve analysis was used to assess the ability of rADR to distinguish between AIHAC and ADHAC (Fig 4). The area under the curve was 0.999, with a 95% CI of 0.942–1.000. The sensitivity and specificity of ADR for AIHAC detection were 1.000 (95% CI, 0.815–1.000) and 0.978 (95% CI, 0.885–0.999), respectively, for a threshold of 2.08, 0.944 (95% CI, 0.727–0.999) and 0.978 (95% CI, 0.885–0.999), respectively, for a threshold of 2.39, and 0.944 (95% CI, 0.727–0.999) and 1.000 (95% CI, 0.923–1.000), respectively, for a threshold of 2.42.

For the 13 AIHAC dogs with available histologic analyses, we evaluated the degree to which measurements of adrenal gland diameter from CT images and the derived ratios distinguished between adrenocortical adenomas and carcinomas. An overlap between benign and malignant tumors was systematically observed for each measurement and ratio considered (Table 2).

Discussion

This study takes advantage of the routine practice of combining pituitary and adrenal CT scans in dogs with

Table 2. Measurements and ratios for evaluating the size of the adrenal glands in 6 dogs with an adrenocortical adenoma and in 7 dogs with an adrenocortical carcinoma ($P < .05$ considered significant).

Measurements	Adenomas		Carcinomas		<i>P</i>
	Median	Range	Median	Range	
Cross-sectional images					
LAD	20.6	19.3–29.4	32.4	15.6–68.0	.086
SAD	8.3	3.3–9.5	6.3	5.0–8.6	.116
LAD/Ao	2.38	2.08–3.42	3.75	1.75–4.82	.153
SAD/Ao	0.91	0.33–1.20	0.63	0.45–0.99	.116
ADR	2.83	2.27–6.24	5.86	2.26–10.79	.199
Reformatted images					
rLAD	18.9	15–25.7	30.4	13.8–63	.174
rSAD	5.9	3.3–8.8	5.6	3.9–7.1	.886
rLAL	18.2	15.4–33.0	31.2	18.0–77.2	.086
rSAL	14.0	10.5–25.4	19.2	10.5–27.7	.431
rLAD/Ao	2.17	1.63–3.05	3.19	1.43–4.66	.253
rSAD/Ao	0.80	0.33–0.84	0.59	0.39–0.76	.199
rADR	3.06	2.39–6.15	5.53	2.49–8.18	.253
rLAL/Ao	2.40	1.56–4.06	3.12	2.37–5.48	.116
rSAL/Ao	1.80	1.06–3.14	1.73	1.50–2.39	.886
rALR	1.35	1.24–1.47	2.07	1.24–3.05	.063

Ao, aorta diameter; LAD, maximum diameter of the larger adrenal gland; rADR, adrenal diameter ratio on reformatted images; rALR, adrenal length ratio on reformatted images; rLAD, maximum diameter of the larger adrenal gland on reformatted images; rLAL, maximum length of the larger adrenal gland on reformatted images; rSAD, maximum diameter of the smaller adrenal gland on reformatted images; rSAL, maximum length of the smaller adrenal gland on reformatted images; SAD, maximum diameter of the smaller adrenal gland; SAL, maximum length of the smaller adrenal gland.

HAC at our hospital for retrospective evaluation of the diagnostic accuracy of adrenal gland measurement for differentiating between AIHAC and ADHAC. Sixty-four dogs enrolled at a single center were assigned to the AIHAC and ADHAC groups on the basis of basal plasma ACTH concentration, which is known to have high diagnostic accuracy. In a previous study of a cohort of 109 dogs, we found no overlap between basal plasma ACTH concentrations recorded in dogs with AIHAC and concentrations in dogs with ADHAC.¹³ Nineteen dogs were included in both the current study and the previous study. These dogs initially were diagnosed with AIHAC on the basis of histologic examinations of adrenocortical tissue showing functional adrenal tumors, or with ADHAC on the basis of feedback inhibition after DST, with minimal associated risks of allocation errors.

Forty-five dogs were included only in this study (12 with AIHAC and 33 with ADHAC). Additional data, confirming the accuracy of allocation on the basis of plasma ACTH concentration, were available in some of these cases. Adrenocortical histology data were available for 7/12 AIHAC dogs included in this study only, demonstrating the presence of adrenocortical tumors in each case. Similarly, the LDDST was performed in 14/33 ADHAC dogs included in this study only, and feedback inhibition suggested pituitary dependence in 8 of these dogs (95% CI, 30–80%). The sensitivity of this test for ADHAC detection is less than perfect. In the largest study to date evaluating its accuracy, feedback inhibition was identified in 111/181 dogs with ADHAC (95% CI, 54–68%), consistent with our findings.¹¹ One of the 6 dogs tested by LDDST and displaying no feedback inhibition was subjected to a high-dose DST, and feedback inhibition was observed in this second test.

The size of the pituitary gland was considered normal in 56% (95% CI, 42–70%) of ADHAC dogs and in 100% (95% CI, 85–100%) of AIHAC dogs, limiting the usefulness of pituitary gland examination by CT scan for distinguishing between AIHAC and ADHAC. In a previous report, the pituitary glands of dogs with ADHAC evaluated by CT scan were considered nonenlarged in 39% (95% CI, 28–51%) of dogs, consistent with our findings.¹⁶ Both studies are based on conventional contrast-enhanced CT without dynamic CT. In some ADHAC dogs, despite an absence of pituitary gland enlargement on postcontrast images, pituitary microadenomas can be identified indirectly by dynamic CT scans.^{17,32} The accuracy of pituitary gland dynamic CT scan for distinguishing between ADHAC and AIHAC remains to be evaluated.

Only 2 previous studies have evaluated the utility of adrenal gland CT scans for characterizing Cushing's syndrome in dogs: 1 on 9 dogs (AIHAC confirmed in 4) and the other on 10 dogs (AIHAC confirmed in 5).^{14,20}

The present survey included 64 dogs with HAC, 18 of which had AIHAC (28%; 95% CI, 18–41%). AIHAC classically is described as accounting for between 15 and 20% of HAC cases.³³ Examination of the records of the included dogs identified no bias that could account for this potential overinclusion of AIHAC cases. The cohort of dogs enrolled in this survey was similar, in terms of age

and breed, to those studied in previous surveys.^{34–36} The possible predominance of HAC in females remains a matter of debate. Most studies have argued against such a sex-related predisposition, but 1 survey of dogs with AIHAC reported that females accounted for 63% of the dogs included (95% CI, 48–76%).^{36–38} The present study did not confirm this trend, with a 95% CI for female representation of 25–66% for AIHAC and of 44–71% for ADHAC.

Animals were included in our study only if a CT scan had been performed before the start of treatment for HAC. Trilostane and mitotane, both used in our institution, are known to induce changes in adrenal gland size.^{39–42} Such treatments would therefore bias observations if initiated before the CT scan.

Adrenal gland calcification was observed in both ADHAC (in 1 case only) and AIHAC, confirming ultrasound observations in other studies.⁴³ Caudal vena cava invasion was observed only in 1 dog with an adrenocortical carcinoma. The sensitivity of CT scan for vascular invasion by adrenal tumors recently has been estimated at 86% (95% CI, 62 to > 99%).³⁰ The non-detection of a large number of vascular invasions therefore appears unlikely. Vascular invasion seems to be less common in dogs with adrenocortical tumors than in dogs with other adrenal tumors.^{30,43,44} Because of this low prevalence, additional CT scan features remain to be identified to predict the aggressiveness of adrenal tumors in cases of HAC. Although assessed in only a small number of dogs, the ability of adrenocortical measurements from CT scan images and derived ratios to discriminate between adrenocortical carcinomas and adenomas would be expected to be low, based on the results reported here. However, present data support the notion that larger glands are more likely to be malignant.⁴³ Indeed, none of the dogs with an adrenocortical adenoma had a LAD, rLAD, or rLAL above 29.4, 25.7, and 33.0 mm, respectively.

An overlap was observed between the adrenal gland measurements on nonreformatted images of the AIHAC and ADHAC groups, for all of the size parameters studied. In dogs, the long axis of the left adrenal gland is not aligned with either the medial or dorsal plane of the body.^{20,45,46} Cross-sectional images therefore generate oblique views of at least 1 adrenal gland rather than transverse views, resulting in variations of apparent gland shape and the possibility of miscalculating maximum diameter and length.²¹ In a previous study, attempts were made to identify the largest dorsolateral-to-ventromedial dimension, defined as the “width” and the greatest dimension perpendicular to the width, which was defined as “thickness.”²¹ Other types of measurement from cross-sectional views also have been described, including measurement of the largest diameter of each adrenal gland.¹⁴ In the absence of data comparing the accuracy and reproducibility of the various methods, we chose to use this last method because of its simplicity.

A major overlap in SAD was observed between the 2 groups, with the dogs in the AIHAC group having an SAD of up to 9.5 mm. This result is not consistent with

the findings of a recent study demonstrating the usefulness of ultrasound measurements for distinguishing between AIHAC and ADHAC in dogs with equivocal adrenal asymmetry, in which the maximal dorsoventral diameter of the smaller adrenal gland was considered to give accurate results with a threshold of 5.0 mm. There are many possible reasons for this discrepancy, including differences in recruitment between these 2 studies. The measurements themselves also differed, with SAD not always being dorsoventral in the present study. Moreover, different imaging techniques may give discordant results for adrenal gland measurement.⁴⁷ The concordance between adrenal gland measurements on CT and ultrasound scans in dogs has never been assessed, making it difficult to compare the 2 modalities. Finally, the accuracy of CT scans for measuring adrenal glands remains unclear. CT scan measurement was reported to result in both over- and underestimation of adrenal gland size with respect to direct measurements of excised normal, hyperplastic, and tumoral adrenal glands in 1 study.²⁰ In another study, a correlation was found between CT measurements and gross measurement of normal adrenal glands.²¹ However, the slope of the regression line was <1 , indicating that CT scan measurements underestimated gland measurements >10.0 mm, and overestimated measurements <10.0 mm. Because all 18 SAD measurements in the AIHAC group and 16/46 SAD measurements in the ADHAC group were <10.0 mm, this parameter may have been particularly affected by a possible bias in size estimation. The reasons for this possible bias remain unclear, but partial volume effects may play a role in such small structures,⁴⁸ despite the use of thin slices to limit this artifact.

A previous study indicated that a maximal dorsoventral thickness >20.0 mm on ultrasound scan was more likely to reflect the presence of an adrenal tumor than hyperplasia.⁴³ However, exceptions have been described, with maximal dorsoventral thickness in some cases of adrenal hyperplasia reaching up to 35.0 mm.³¹ Our CT-based study confirmed that the maximum diameter of the larger gland may sometimes exceed 20.0 mm in dogs with ADHAC, for measurements on cross-sectional or reformatted views (9/46 for LAD and 4/46 for rLAD).

The standardization of (r)SAD and (r)LAD, by dividing by Ao, to take into account differences in the sizes of the dogs examined, resulted in no clinically relevant decrease in the overlap between the AIHAC and ADHAC groups for the various parameters.

Thus, evaluation of the degree of asymmetry between the adrenal glands by calculating adrenal gland maximum diameter ratios is a valuable method for distinguishing between AIHAC and ADHAC. The utility of adrenal gland symmetry or asymmetry on cross-sectional CT views for determining etiological diagnosis was considered in 2 previous studies.^{14,20} However, asymmetry was defined subjectively in these studies and no cut-off point was proposed for distinguishing between etiologies of HAC. The present study confirms that a certain degree of asymmetry may be observed in dogs with ADHAC, highlighting the need for validated objective criteria defining the degree of asymmetry required

for AIHAC diagnosis. Indeed, in the 2 previous studies, 1/9 and 1/10 cases initially were identified as AIHAC on the basis of adrenal gland asymmetry, but adrenocortical hyperplasia subsequently was identified on adrenalectomy, suggesting a diagnosis of ADHAC.^{14,20} Based on the adrenal gland measurements available for one of these studies, an ADR of 1.42 was calculated for the dog with dubious adrenal asymmetry, this value being within the range for ADHAC dogs in this survey, but below the range for AIHAC dogs.²⁰

Adrenal gland maximum diameter ratio differed significantly between the AIHAC and ADHAC groups, whether derived from cross-sectional CT images (ADR) or from reformatted images (rADR). However, the overlap between the ranges of values obtained for AIHAC and ADHAC was more limited for rADR. These data suggest that measurements from reformatted images, although more time consuming to obtain, more accurately distinguish between the 2 conditions.

Because animals were assigned to groups in this study on the basis of plasma ACTH concentration, the HAC of dogs allocated to the AIHAC group may have been because of either functional adrenal tumor or ACTH-independent adrenocortical hyperplasia. This second cause of AIHAC has been reported only once in a veterinary publication, in the context of food-dependent HAC.⁴ This is the only known case of its type, and it is highly likely that all the cases included in this survey were because of functional adrenal tumors, even in the dogs for which no histological data were available. The accuracy of rADR for AIHAC discrimination in cases of ACTH-independent adrenocortical hyperplasia remains to be determined and will require the identification of other cases of the new entity. However, in the aforementioned case of food-dependent HAC, the adrenal glands on CT images were described as symmetric and would certainly have been misclassified if the rADR threshold validated here had been used.⁴ Likewise, bilateral functional adrenal tumor, although rare, may generate equivocal images characterized by a certain degree of adrenal symmetry, resulting in possible misclassification by rADR.

These possible exceptions aside, the present study demonstrates that rADR is an accurate tool for distinguishing between AIHAC and ADHAC. The most sensitive cut-off point tested in this study (2.08) appears to be the most relevant, because of the clinical implications of misclassifying a dog with AIHAC as having ADHAC. In field conditions, given the relatively low frequency of AIHAC in dogs, a simple ratio of the maximum diameters of the adrenal glands can be used to rule out the presence of functional adrenal tumors in cases in which $rADR \leq 2.08$, with a high degree of confidence.

In conclusion, this study evaluated the utility of various measurements of adrenal gland size and derived ratios obtained from CT scans, for distinguishing between AIHAC and ADHAC in a large number of dogs with HAC. Maximum adrenal gland diameter ratio appeared to be the most useful parameter, particularly when this ratio was calculated from reformatted images. A $rADR \leq 2.08$ is highly suggestive of ADHAC.

Footnotes

- ^a Enzymun-Test cortisol, Roche Diagnostics, Meylan, France
^b Synacthène injectable, tetracosactide, 0.25 mg/mL, Novartis Pharma SA, Rueil-Malmaison, France
^c Dexadreson, dexamethasone phosphate, 2 mg/mL, Intervet-Schering Plough, Beaucauzé, France
^d Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA
^e Rapinovet, Schering-Plough Vétérinaire, Levallois-Perret, France
^f Isoflurane aerrane, Baxter SAS, Maurepas, France
^g Télébrix 35, sodium and meglumine ioxitalamate, 350 mg of iodine/mL, Laboratoire Guerbet, Roissy-Charles-de-Gaulle, France
^h Scanner Hispeed CT/e Plus, General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI
ⁱ Advantage Workstation, AW 4.4. General Electric Medical Systems
^j SPSS Statistical Package, version 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL
^k Measuring usability: confidence interval calculator for a completion rate (<http://www.measuringusability.com/wald.htm>)

Acknowledgment

This work was supported by postdoctoral grants from the *Consellería de Innovación e Industria (Xunta de Galicia)*, awarded to María Isabel Rodríguez Piñeiro and from Intervet Pharma R&D SA (Angers, France), awarded to Ghita Benchekroun, and by grants from the *Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires rurales)*.

References

1. Churcher RK. Hepatic carcinoid, hypercortisolism and hypokalaemia in a dog. *Aust Vet J* 1999;77:641–645.
2. Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. St Louis, MO: Saunders; 2004:252–357.
3. Galac S, Kooistra HS, Voorhout G, et al. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:338–348.
4. Galac S, Kars VJ, Voorhout G, et al. ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: A case report. *Vet J* 2008;177:141–143.
5. Feldman EC, Blake Tyrell J, Bohannon NV. The synthetic ACTH stimulation test and measurement of endogenous plasma ACTH levels: Useful diagnostic indicators for adrenal disease in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1978;14:524–531.
6. Meijer JC, de Bruijne JJ, Rijnberk A, Croughs RJ. Biochemical characterization of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in the dog. *J Endocrinol* 1978;77:111–118.
7. Feldman EC. Distinguishing dogs with functioning adrenocortical tumors from dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1983;183:195–200.
8. Kantrowitz BM, Nyland TG, Feldman EC. Adrenal ultrasonography in the dog. Detection of tumors and hyperplasia in hyperadrenocorticism. *Vet Radiol Ultrasound* 1986;27:91–96.
9. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1995;207:1180–1183.
10. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK, Miyabayashi T. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: Comparison with normal dogs. *J Vet Intern Med* 1996;10:110–115.
11. Feldman EC, Nelson RW, Feldman MS. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:772–775.
12. Gould SM, Baines EA, Mannion PA, et al. Use of endogenous ACTH concentration and adrenal ultrasonography to distinguish the cause of canine hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 2001;42:113–121.
13. Rodríguez Piñeiro MI, Benchekroun G, de Fornel-Thibaud P, et al. Accuracy of an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) immunoluminometric assay for differentiating ACTH-dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:850–855.
14. Voorhout G, Stolp R, Lubberink AA, van Waes PF. Computed tomography in the diagnosis of canine hyperadrenocorticism not suppressible by dexamethasone. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:641–646.
15. Kipperman BS, Feldman EC, Dybdal NO, Nelson RW. Pituitary tumor size, neurologic signs, and relation to endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 43 cases (1980–1990). *J Am Vet Med Assoc* 1992;201:762–767.
16. Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA, Rijnberk A. Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Endocrinol* 1997;152:387–394.
17. Auriemma E, Barthez PY, van der Vlugt-Meijer RH, et al. Computed tomography and low-field magnetic resonance imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 11 cases (2001–2003). *J Am Vet Med Assoc* 2009;235:409–414.
18. Mauldin GN, Burk RL. The use of diagnostic computerized tomography and radiation therapy in canine and feline hyperadrenocorticism. *Probl Vet Med* 1990;2:557–564.
19. Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Clin Tech Small Anim Pract* 2007;22:2–11.
20. Emms SG, Wortman JA, Johnston DE, Goldschmidt MH. Evaluation of canine hyperadrenocorticism, using computed tomography. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189:432–439.
21. Voorhout G. X-ray-computed tomography, nephrotomography, and ultrasonography of the adrenal glands of healthy dogs. *Am J Vet Res* 1990;51:625–631.
22. Morandi F, Mays JL, Newman SJ, Adams WH. Imaging diagnosis bilateral adrenal adenomas and myelolipomas in a dog. *Vet Radiol Ultrasound* 2007;48:246–249.
23. Bertolini G, Furlanello T, De Lorenzi D, Caldin M. Computed tomographic quantification of canine adrenal gland volume and attenuation. *Vet Radiol Ultrasound* 2006;47:444–448.
24. Bertolini G, Furlanello T, Drigo M, Caldin M. Computed tomographic adrenal gland quantification in canine adrenocorticotroph hormone-dependent hyperadrenocorticism. *Vet Radiol Ultrasound* 2008;49:449–453.
25. Ginel PJ, Perez-Rico A, Moreno P, Lucena R. Validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of cortisol in canine plasma samples. *Vet Res Commun* 1998;22:179–185.
26. Meijer JC, Lubberink AA, Rijnberk A, Croughs RJ. Adrenocortical function tests in dogs with hyperfunctioning adrenocortical tumours. *J Endocrinol* 1979;80:315–319.
27. Feldman EC. Comparison of ACTH response and dexamethasone suppression as screening tests in canine hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 1983;182:506–510.
28. Granger N, de Fornel P, Devauchelle P, et al. Plasma pro-opiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med* 2005;19:23–28.

29. Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Brown JA, et al. Validation of a chemiluminescent enzyme immunometric assay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. *Vet Clin Pathol* 2003; 32:180–187.
30. Schultz RM, Wisner ER, Johnson EG, MacLeod JS. Contrast-enhanced computed tomography as a preoperative indicator of vascular invasion from adrenal masses in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 2009;50:625–629.
31. Benchechrone G, de Fornel-Thibaud P, Rodríguez Piñeiro MI, et al. Ultrasonography criteria for differentiating ACTH-dependency from ACTH-independency in 47 dogs with hyperadrenocorticism and equivocal adrenal asymmetry. *J Vet Intern Med* 2010;24:1077–1085.
32. van der Vlugt-Meijer RH, Meij BP, van den Ingh TS, et al. Dynamic computed tomography of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 2003;17:773–780.
33. Reusch CE. Hyperadrenocorticism. In: Ettinger SJ, ed. *Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia, PA: Saunders; 2005:1592–1612.
34. Rijnberk A, der Kinderen PJ, Thijssen JH. Spontaneous hyperadrenocorticism in the dog. *J Endocrinol* 1968;41: 397–406.
35. Siegel ET, Kelly DF, Berg P. Cushing's syndrome in the dog. *J Am Vet Med Assoc* 1970;157:2081–2090.
36. Ling GV, Stabenfeldt GH, Comer KM, et al. Canine hyperadrenocorticism: Pretreatment clinical and laboratory evaluation of 117 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1979;174:1211–1215.
37. Willeberg P, Priester WA. Epidemiological aspects of clinical hyperadrenocorticism in dogs (canine Cushing's syndrome). *J Am Anim Hosp Assoc* 1982;18:717–724.
38. Reusch CE, Feldman EC. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *J Vet Intern Med* 1991;5:3–10.
39. Keiser M, Flückiger M, Gardelle O, Reusch CE. Mitotane-Behandlung bei einem Hund mit einem rezidivierenden Nebennierenrindenkarzinom—ein Fallbericht. *Schweiz Arch Tierheilk* 1999;141:279–285.
40. Hoerauf A, Reusch CE. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;51:193–199.
41. Ruckstuhl NS, Nett CS, Reusch CE. Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Am J Vet Res* 2002;63:506–512.
42. Mantis P, Lamb CR, Witt AL, Neiger R. Changes in ultrasonographic appearance of adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Vet Radiol Ultrasound* 2003;44:682–685.
43. Besso JG, Penninck DG, Gliatto JM. Retrospective ultrasonographic evaluation of adrenal lesions in 26 dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1997;38:448–455.
44. Kyles AE, Feldman EC, De Cock HE, et al. Surgical management of adrenal gland tumors with and without associated tumor thrombi in dogs: 40 cases (1994–2001). *J Am Vet Med Assoc* 2003;223:654–662.
45. Graham J. Adrenal glands. In: Penninck DG, d'Anjou MA, eds. *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. Ames, IA: Blackwell; 2008:385–396.
46. Franck PM, Mahaffey MB. The peritoneal space. In: Thrall DE, ed. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. St Louis, MO: Saunders; 2007:647–666.
47. Rubin RT, Phillips JJ. Adrenal gland volume determination by computed tomography and magnetic resonance imaging in normal subjects. *Invest Radiol* 1991;26:465–469.
48. Lingam RK, Sohaib SA, Vlahos I, et al. CT of primary hyperaldosteronism (Conn's syndrome): The value of measuring the adrenal gland. *Am J Roentgenol* 2003;181:843–849.

2. Analyse prédictive de l'agressivité des tumeurs hypophysaires lors de syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH

2.1.Introduction

Lors de syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH lié à une tumeur hypophysaire, des formes indolentes et des formes agressives moins fréquentes, à expansion rapide, ont été décrites chez l'homme et le chien. Des critères non invasifs, en particulier cliniques, de détection précoce des formes agressives font défaut, tout particulièrement chez le chien pour lequel l'absence de symptômes précoces rapportés conduit à différer la détection de tumeurs volumineuses à un stade tardif de leur développement, malheureusement associé à l'expression d'anomalies comportementales et nerveuses très marquées.

2.2. Utilité diagnostique de la température corporelle et de la fréquence cardiaque pour la différenciation des formes agressives de tumeur hypophysaire chez le chien

Dans l'étude présentée dans l'article qui suit, nous avons souhaité évaluer si la fréquence cardiaque et la température corporelle pouvaient constituer des indicateurs cliniques d'une tumeur hypophysaire agressive. Dans cette étude, une différence significative entre les chiens présentant une tumeur hypophysaire de petite taille et ceux présentant une tumeur hypophysaire de grande taille a été identifiée pour les valeurs de fréquence cardiaque et de la température corporelle.

Dogs with macroadenomas have lower body temperature and heart rate than dogs with microadenomas

G. Benchekroun, L. Desquilbet, M. Herrtage, N. Jeffery, D. Rosenberg and N. Granger.

Soumis au Vet Journal

Manuscript Number: YTVJL-D-16-00795R1

Title: Dogs with macroadenomas have lower body temperature and heart rate than dogs with microadenomas

Article Type: Short communication

Keywords: Canine Neoplasia; Cushing; Hypothermia; Bradycardia; Forebrain

Corresponding Author: Dr. Nicolas Granger, DVM, PhD, Dip.ECVN, FHEA

Corresponding Author's Institution: University of Bristol

First Author: Ghita Bencheckroun

Order of Authors: Ghita Bencheckroun; Loic Desquilbet; Michael E Herrtage; Nick D Jeffery; Dan Rosenberg; Nicolas Granger, DVM, PhD, Dip.ECVN, FHEA

Abstract: Pituitary macroadenomas compress the hypothalamus, which partly regulates heart rate and body temperature. The aim of this study was to investigate whether heart rate and / or body temperature could aid in clinically differentiating dogs with macroadenomas from dogs with microadenomas (i.e. small non-compressive pituitary mass). Two groups of dogs diagnosed with pituitary-dependent hyperadrenocorticism (i.e. Cushing's disease) were included. Heart rate and body temperature were collected on initial presentation before any procedure. Dogs with macroadenoma had a significantly lower heart rate and body temperature ($p < 0.01$) compared to dogs with microadenoma. We suggest that cut-off values of 84 bpm and 38.3°C in dogs with Cushing's disease, especially with vague neurological signs, might help to suspect the presence of a macroadenoma.

Short communication

Dogs with macroadenomas have lower body temperature and heart rate than dogs with microadenomas

Ghita Benchekroun^a, Loic Desquilbet^b, Michael E. Herrtage^c, Nick D. Jeffery^d, Dan Rosenberg^e and Nicolas Granger^{f,*}

^a: Unité de Médecine Interne, Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France;

^b: UMR-CNRS-MNHN 7179, 1 avenue du Petit Chateau, 91800 Brunoy, France; Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort, France.

^c: Department of Veterinary Medicine, The Queen's Veterinary School Hospital, University of Cambridge, United Kingdom;

^d: Department of Veterinary Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, IA 50011, USA.

^e: Micen Vet Centre, Créteil, France.

^f: School of Veterinary Sciences, University of Bristol, Langford House, Langford, North Somerset, BS40 5DU

* Corresponding author.

Tel: +441173319113; Email address: nicolas.granger@bristol.ac.uk

Abstract

Pituitary macroadenomas compress the hypothalamus, which partly regulates heart rate and body temperature. The aim of this study was to investigate whether heart rate and / or body temperature could aid in clinically differentiating dogs with macroadenomas from dogs with microadenomas (i.e. small non-compressive pituitary mass). Two groups of dogs diagnosed with pituitary-dependent hyperadrenocorticism (*i.e.* Cushing's disease) were included. Heart rate and body temperature were collected on initial presentation before any procedure. Dogs with macroadenoma had a significantly lower heart rate and body temperature ($p < 0.01$) compared to dogs with microadenoma. We suggest that cut-off values of 84 bpm and 38.3°C in dogs with Cushing's disease, especially with vague neurological signs, might help to suspect the presence of a macroadenoma.

Keywords: Canine Neoplasia; Cushing; Hypothermia; Bradycardia; Forebrain.

Pituitary-dependent hyperadrenocorticism (*i.e.* Cushing's disease) in dogs can be caused by large or small pituitary tumours (macroadenoma or microadenoma respectively). In addition to endocrine manifestations, macroadenomas may cause neurological signs because they expand into the pituitary stalk and compress and invade the hypothalamus, third ventricle and thalamus (Behrend 2015). It is often difficult to suspect a macroadenoma because neurological signs are non-specific, including lethargy, reduced appetite, delayed response to stimulation, loss of interest in household activities and episodes of disorientation, which often are perceived as 'ageing' by owners. More definitive neurological signs eventually occur (ataxia, tetraparesis, head pressing, pacing, circling, etc.), probably when the brain compensatory mechanisms become overwhelmed (Kipperman et al 1992, Nelson et al 1989, Wood et al 2007).

Dysfunction of the autonomic nervous system, including loss of heart rate and body temperature regulation, was recognized early in dogs with macroadenomas with compression of the hypothalamus (Verstraete and Thoonen 1939) and is also mentioned in textbooks (De Lahunta and Glass 2015).

We hypothesized that the heart rate and body temperature might be lower in dogs with macroadenoma and therefore could aid in differentiating a macroadenoma from a microadenoma in dogs with Cushing's disease. We therefore compared heart rate and body temperature between dogs with macroadenomas and dogs with microadenomas and Cushing's disease.

Dogs presented at the Internal Medicine Unit, National Veterinary School of Alfort (France) and at the Queen's Veterinary School Hospital, University of Cambridge (United Kingdom) were included between January 1st 2006 and June 30th 2011.

All dogs were diagnosed with Cushing's disease using adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation test, low-dose dexamethasone suppression test, ACTH plasma concentration measurement, serum biochemistry, hematology and adrenal glands imaging with CT or ultrasound. They all underwent pituitary imaging by CT or magnetic resonance imaging (MRI). The macroadenoma group included dogs with macroadenomas defined as a tumour height / brain area ratio ($P/B \geq 0.40 \times 10^{-2} \text{ mm}^{-1}$), as previously described (Granger et al 2005). Dogs with microadenomas had a P/B ratio $< 0.40 \times 10^{-2} \text{ mm}^{-1}$.

For all dogs, heart rate, body temperature, body weight and neurological deficits were recorded within 2 weeks prior to brain imaging and retrieved from the medical records.

The data were analysed with SAS using a p value of 0.05 to denote significance. Medians and interquartile ranges are reported for quantitative data. We investigated the association between macroadenoma and body temperature and between macroadenoma and heart rate by using a multivariate linear regression, including potential confounders (association with body temperature (or heart rate) with a p value < 0.20). The candidate variables as potential confounders were: sex, age, body weight and sterilization. We compared medians with Mann-Whitney's test. The association between 2 quantitative variables was tested with Spearman's correlation test.

84

The macroadenoma group and the microadenoma group included 29 and 30 dogs respectively (Table 1 and 2).

The body temperature and heart rate median and interquartile ranges are presented in Table 3. A significant difference was found between the two groups for both parameters (Figure 1 and 2). Plotting the heart rate against the body temperature resulted in more widespread dispersion of the plot of dogs with macroadenomas compared to dogs with microadenomas (Figure 3).

The crude difference estimated by the univariate linear regression between the two groups (macroadenoma *versus* microadenoma) was estimated to be -0.52°C ($p < 0.01$) and -19 bpm ($p < 0.01$) respectively for body temperature and heart rate. In both models, only the body weight was identified as a potential confounder. After adjustment for body weight, the difference ($\Delta = -0.65^{\circ}\text{C}$ and $\Delta = -18$ bpm) remained significant ($p < 0.01$ and $p = 0.04$).

The most discriminating thresholds for both parameters were determined from receiver operating characteristic (ROC) curves (Table 4).

The neurological signs in dogs with macroadenomas remained vague (including only altered mentation and behavioral changes) in 12 dogs and were circling, cortical blindness and partial seizures in 8 dogs. Nine dogs with vague signs had a heart rate < 84 bpm or a body temperature $< 38.3^{\circ}\text{C}$.

Our data support that the heart rate and body temperature are lower in dogs with macroadenomas compared to dogs with microadenomas. The combined finding a heart rate < 84 bpm and a body temperature $< 38.3^{\circ}\text{C}$ provides a good clinical reason to pursue pituitary imaging, especially in dogs with vague neurological signs such as reduced mentation. We took

107 advantage of the routine practice, in our institution, to combine pituitary and adrenal CT scans
108 in dogs investigated for hyperadrenocorticism. This allowed us to collect data from dogs with
109 microadenomas and therefore no neurological signs.

110 The limited magnitude of the body temperature reduction in dogs with macroadenoma might be
111 due to the fact that diencephalic lesions can cause hypothermia or hyperthermia, as observed in
112 humans (Carmel 1985). Because smaller or old animals are more likely to develop hypothermia,
113 age and bodyweight were tested as potential confounding factors but none were found as such.

114 The significant difference in heart rate observed between the two groups is likely secondary to
115 induction of the Cushing reflex secondary to increased intracranial pressure leading to heart rate
116 reduction (Fitch et al, 1977). Another possible explanation would be a direct hypothalamic
117 effect. It is commonly assumed that an association between the heart rate and the body weight
118 exists in dogs. Indeed, the body weight was a potential confounding factor but the difference
119 remained significant between the two groups after adjustment for body weight.

120 Because the diagnostic value of these parameters will always remain limited in dogs with clear
121 forebrain neurological dysfunction, it would be of interest to evaluate the temperature and heart
122 rate of dogs with macroadenomas and Cushing's disease but no neurological sign, to assess if
123 loss of regulation of body temperature heart rate could be early indicators of a macroadenoma.

124
125 In summary, our data revealed that dogs with macroadenomas had a significantly lower heart
126 rate and body temperature compared to dogs with microadenomas. In the context of a case
127 diagnosed with Cushing's disease, but with vague forebrain signs (such as obtundation), the
128 finding of a heart rate < 84 bpm or a body temperature $< 38.3^{\circ}\text{C}$ should raise the suspicion of
129 the presence of a macroadenoma providing support for advanced pituitary imaging.

131 **Conflict of interest statement**

132 The authors disclose no conflict of interest.

133 **Acknowledgments**

134 The authors would like to thank the referring veterinary surgeons of the dogs described in this
135 paper, the staff of the Queen's Veterinary School Hospital and of the National Veterinary
136 School of Alfort and Mrs Mathilde Duchaussoy MRCVS DVM, for their help.

137

References

- Behrend EN. Canine hyperadrenocorticism, 2015. In: Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, Scott-Moncrieff JCR, editors. Canine and Feline Endocrinology. Saunders Elsevier, St. Louis, MO, USA: 377-451.
- Carmel PW, 1985. Vegetative dysfunctions of the hypothalamus. *Acta Neurochir (Wien)*; 75(1-4):113-121.
- de Lahunta A, Glass E, Kent M, 2015. Diencephalon. In: de Lahunta A, Glass E and Kent M, editors. Veterinary neuroanatomy and clinical neurology. St Louis: Saunders: 499-508.
- Fitch W, McDowall DG, Keaney NP, Pickerodt VW, 1977. Systemic vascular responses to increased intracranial pressure. 2. The 'Cushing' response in the presence of intracranial space-occupying lesions: systemic and cerebral haemodynamic studies in the dog and the baboon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 40(9):843-852.
- Granger N, de Fornel P, Devauchelle P, et al, 2005. Plasma pro-opiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med*; 19(1):23-28.
- Kipperman BS, Feldman EC, Dybdal NO, Nelson RW, 1992. Pituitary tumor size, neurologic signs, and relation to endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 43 cases (1980-1990). *J Am Vet Med Assoc*; 201(5):762-767.
- Nelson RW, Ihle SL, Feldman EC, 1989. Pituitary macroadenomas and macroadenocarcinomas in dogs treated with mitotane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 13 cases (1981-1986). *J Am Vet Med Assoc*; 194(11):1612-1617.
- Verstraete A, Thoonen J, 1939. Twee nieuwe gevallen van hypophysaire stoornissen bij den hond. *Vlaams diergeneesk Tijdschr*; 8:304-314.
- Wood FD, Pollard RE, Uerling MR, Feldman EC, 2007. Diagnostic imaging findings and endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism that did or did not have neurologic abnormalities: 157 cases (1989-2005). *J Am Vet Med Assoc*; 231(7):1081-1085.

Table 1

Signalment (body weight, age and sex) of dogs included in the macroadenoma and microadenoma groups.

	Body weight (kg)				
	Median	25th Percentile	75th Percentile	Min	Max
Macroadenoma group	22.5	12.8	35	5	44
Microadenoma group	7	5	12	3	27
	Age (years)				
	Median	25th Percentile	75th Percentile	Min	Max
Macroadenoma group	9	8	12	5	15
Microadenoma group	11	9	12	7	14
	Male	Female			
Macroadenoma group	23	6			
Microadenoma group	15	15			

Table 2 Pituitary height/brain area (P/B) ratio and neurological signs reported in dogs with macroadenomas and P/B ratio in dogs with microadenomas.

	P/B ratio					
	Median	25th Percentile	75th Percentile	Min	Max	
Macroadenoma group	1	0.57	1.15	0.41	1.71	
Microadenoma group	0.14	0.14	0.26	0.14	0.37	
	Neurological signs					
	Present	Absent	Description			
Macroadenoma group	20	9	Altered mentation and behavioural changes (12 dogs); Circling, cortical blindness and partial seizures (8 dogs).			
Microadenoma group	0	30				

185 **Table 3**

186 Body temperature (°C: degree Celsius) and heart rate (bpm: beats per minute) in the
 187 macroadenoma and microadenoma groups.

	Body temperature (°C)				
	Median	25th Percentile	75th Percentile	Min	Max
Macroadenoma group	38.3	38	38.6	37	39.2
Microadenoma group	38.8	38.5	39.1	37.7	39.7
	Heart rate (bpm)				
	Median	25th Percentile	75th Percentile	Min	Max
Macroadenoma group	96	76	120	52	148
Microadenoma group	108	100	134	80	180

188

189

190 **Table 4**

191 Results of the receiver operating characteristic curve analysis for body temperature (°C: degree
192 Celsius) and heart rate (bpm: beats per minute).

	AUC (95% CI)	Younden index	Associated criterion	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)
Body Temperature (°C)	0.79 (0.66-0.88)	0.49	≤38.3	0.62 (0.42 – 0.79)	0.86 (0.69 – 0.96)
Heart rate (bpm)	0.70 (0.57-0.81)	0.38	≤84	0.41 (0.23 – 0.61)	0.97 (0.83 – 0.99)

193

194

Figure legends

Figure 1: Box plot of body temperature in 29 dogs with macroadenomas and 30 dogs with microadenomas. The box represents interquartile range (25th to 75th percentile). T-bars represent the minimum and maximum data values. Median values are indicated by horizontal lines (*: statistically significant, $P < 0.05$).

Figure 2: Box plot of heart rate in 29 dogs with macroadenomas and 30 dogs with microadenomas. See Figure 1 for legend.

Figure 3: Plot of the heart rate (x-axis) against the body temperature (y-axis) for dogs with macroadenoma (solid circle) and dogs with microadenomas (open circle). Dogs in the microadenoma group are mainly located in the upper right quadrant. Note the dispersion of the data in the macroadenoma group towards the left with 10 dogs with a HR < 84 bpm and 14 dogs with a BT < 38.3°C but only one dog in the microadenoma group with a HR < 84 bpm and 3 with a BT < 38.3°C. Dashed lines on both plots represent the cut off value found using ROC curves for heart rate and body temperature.

Figure 1

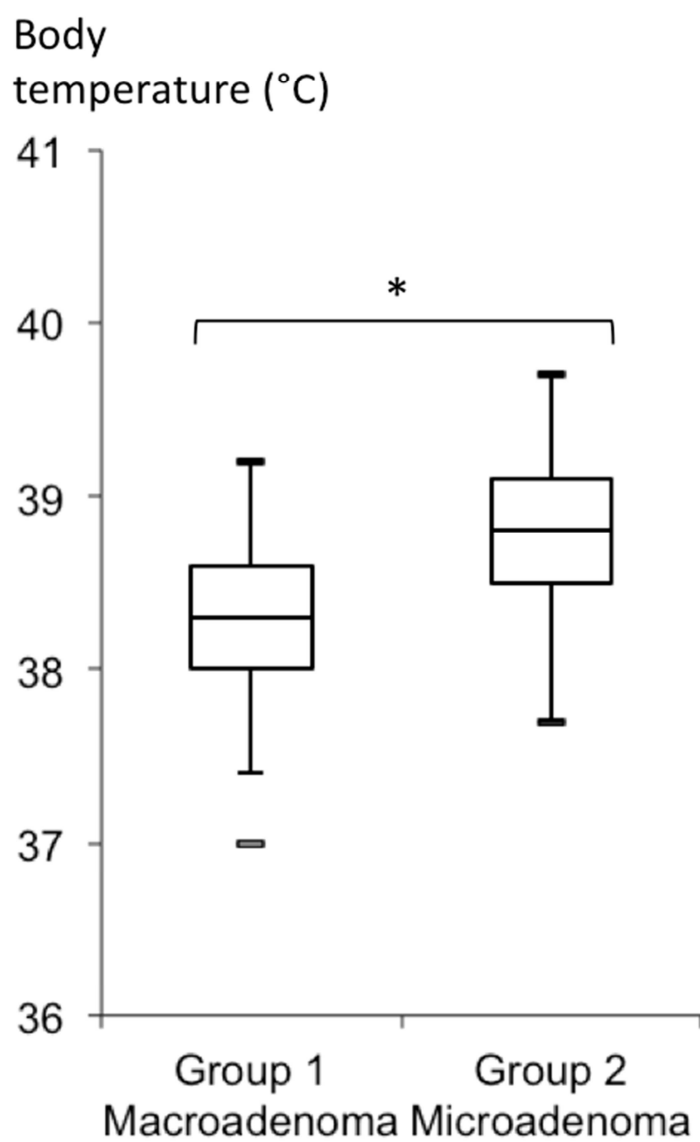


Figure 2

Heart rate (bpm)

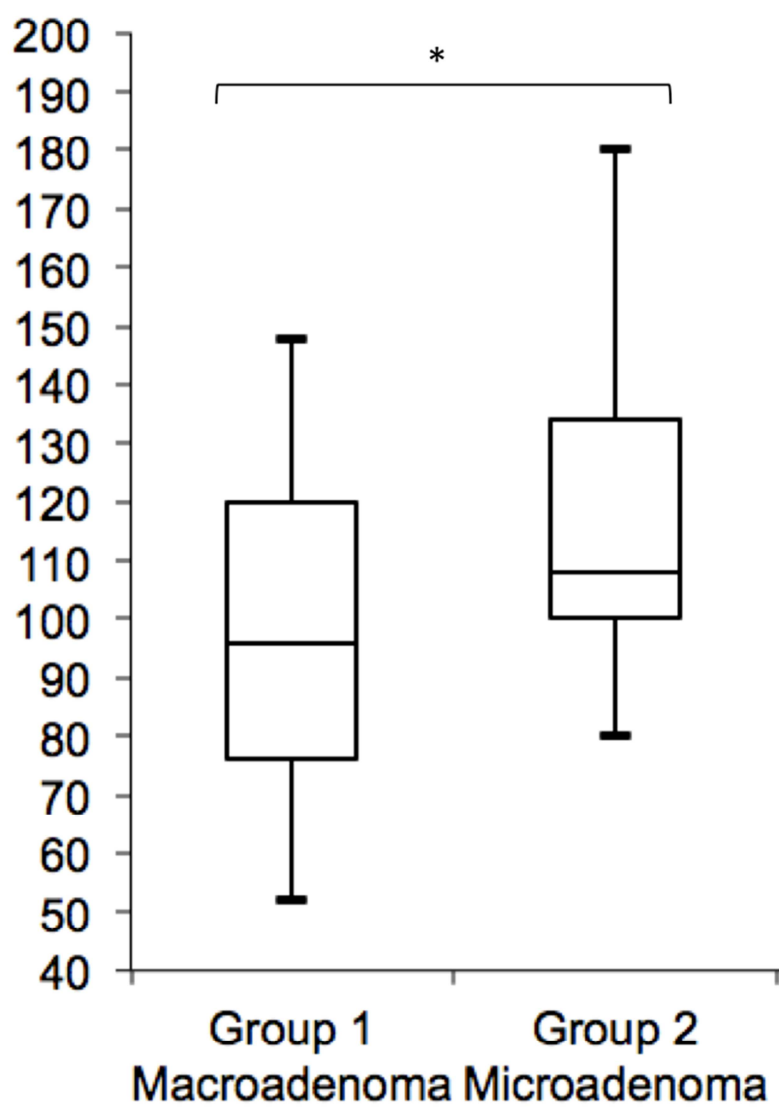
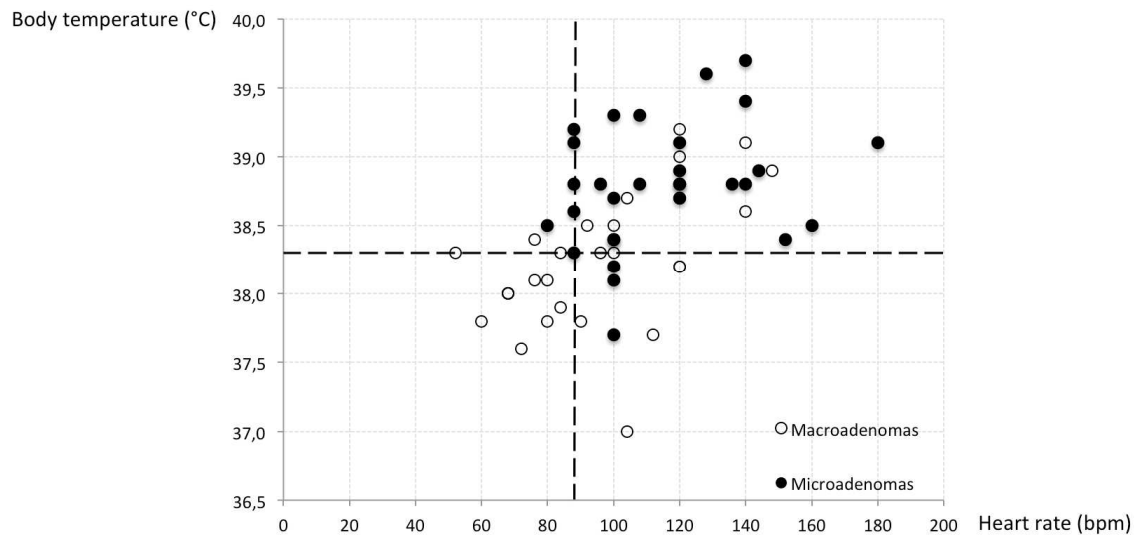


Figure 3



Highlights

- Dogs pituitary macroadenomas have a lower heart rate than dogs with pituitary microadenomas.
- Dogs pituitary macroadenomas have a lower body temperature than dogs with pituitary microadenomas.
- Cut-off values of 38.3°C and 84 bpm allow discrimination between pituitary macroadenomas and microadenomas.
- Cushing dogs with vague neurological signs and bradycardia should be screened for the presence of a macroadenoma.

2.3. Intérêt du dosage plasmatique des précurseurs de l'ACTH pour la détection des adénomes hypophysaires de grande taille chez le chien et chez le chat

Chez l'homme, une concentration sanguine élevée du précurseur de l'ACTH, la proopiomélanocortine (POMC), a été identifiée chez des patients à tumeur corticotrope agressive. On peut poser l'hypothèse soit d'une élévation de la synthèse de la POMC, soit d'un défaut de maturation de la POMC dans les cellules tumorales, le clivage étant effectué physiologiquement par la proconvertase 1/3 (PC1/3). Compte tenu de la rareté de la maladie, ces résultats n'ont été obtenus que sur des cohortes à faible effectif comportant moins de six patients avec tumeur agressive chez l'homme (197) et il n'existe aucune publication se rapportant à cette donnée chez l'animal.

Antérieurement à ce travail de thèse, l'équipe encadrante avait validé un dosage de la POMC chez le chien et observé une concentration élevée lors de tumeurs de grande taille (34). Dans le cadre de cette thèse, le dosage de la POMC a été réalisé sur un plus grand nombre de chiens atteint de la maladie de Cushing et notre donnée d'élévation de son expression, initialement publiée pour 32 chiens, a été confirmée sur une plus large population incluant 120 chiens (77 tumeurs de petite taille et 43 tumeurs de grande taille) (Figure 9).

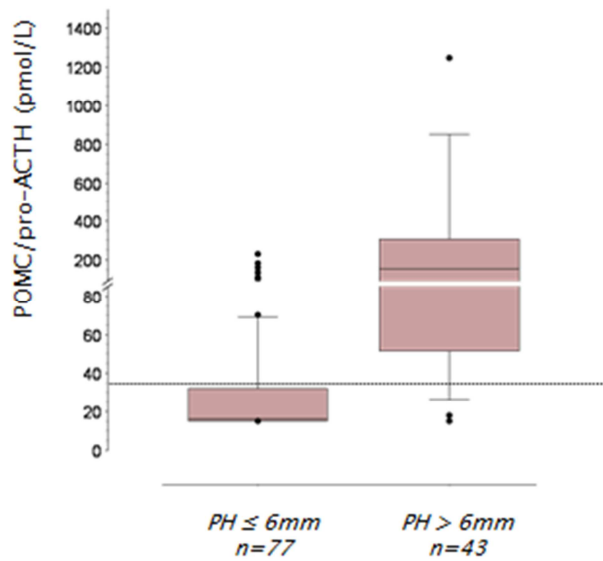


Figure 9 : Représentation de la concentration en POMC/pro-ACTH en fonction de la taille de l'hypophyse. La concentration est significativement différente entre les deux groupes.

Les tumeurs corticotropes de chat sont rares mais souvent agressives. Dans le travail présenté dans l'article qui suit, nous avons validé chez le chat un dosage du précurseur de l'ACTH et évalué sa concentration plasmatique lors de tumeurs corticotropes dans cette espèce. Cette étude a confirmé chez le chat les résultats préalablement obtenus chez l'homme et le chien et a permis de montrer que cette élévation en POMC plasmatique semble une donnée conservée entre les carnivores et les primates, suggérant dans un premier temps que le dosage de la POMC plasmatique serait un marqueur pertinent dans le diagnostic de la maladie de Cushing chez le chat, particulièrement chez les animaux atteints de tumeur agressive.

Plasma ACTH precursors in cats with pituitary dependent hyperadrenocorticism.

G. Benckroun, P. de Fornel Thibaud, M. Dubord, O. Dossin, F. Fracassi, B. Rannou, F. Garnier, C. Maurey-Guenec, S. Daminet et D. Rosenberg.

J Vet Intern Med 2012, 26:575-581.

Plasma ACTH Precursors in Cats with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism

G. Benckekroun, P. de Fornel-Thibaud, M. Dubord, O. Dossin, F. Fracassi, B. Rannou, F. Garnier, C. Maurey-Guenec, S. Daminet, and D. Rosenberg

Background: Diagnosis of pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH) in cats is challenging because there is no specific diagnostic test.

Hypothesis/Objective: The determination of plasma ACTH precursor (POMC and pro-ACTH) concentration might facilitate the diagnosis of PDH in cats. The aim of the study was to evaluate prospectively the plasma concentrations of ACTH precursors in a small cohort of cats with PDH and to estimate the value of this approach for diagnosis.

Animals: Four groups of cats were included: group 1 (cats with PDH), group 2 (cats with diabetes mellitus but not hyperadrenocorticism (HAC)), group 3 (cats with diabetes mellitus and confirmed acromegaly but not HAC), and group 4 (healthy cats).

Methods: PDH diagnosis was based on clinical data, low-dose dexamethasone suppression test (LDDST), and adrenal and pituitary gland computed tomography (CT) scan. For groups 2, 3, and 4, hyperadrenocorticism was excluded by LDDST or urine cortisol:creatinine ratio (UCCR). An immunoluminometric assay was used to determine plasma concentrations of ACTH precursors in the 4 groups of cats.

Results: Group 1 contained 9 cats (enlarged pituitary gland in 7/9). Plasma ACTH precursor concentrations ranged from <53 to >1010 pmol/L with 8/9 concentrations ≥ 229 pmol/L. Groups 2, 3, and 4 included 13, 7, and 13 cats, respectively. Plasma ACTH precursor concentrations ranged from <53 to 96 pmol/L in group 2, <53 to 72 pmol/L in group 3, and <53 to 99 pmol/L in group 4.

Conclusion and Clinical Importance: High plasma concentration of ACTH precursors in cats (>100 pmol/L) is highly suggestive of PDH.

Key words: Corticotroph tumors; Cushing's disease; Feline; Pro-adrenocorticotropin.; Pro-opiomelanocortin.

Hyperadrenocorticism (HAC) in cats is a rare condition, with no more than 100 cases reported.^{1–17} It is caused by a functional pituitary adenoma in 80% of cases.^{1,16,17} About 50% of these pituitary tumors are microscopic, the others being large enough for visualization by computed tomography (CT) or magnetic resonance imaging (MRI).¹ Diagnosing HAC in cats is difficult. The most common clinical findings are poorly

Abbreviations:

BW	body weight
CT	computed tomography
Cort _{8h}	serum cortisol concentration 8 hours after low-dose dexamethasone administration
DM	diabetes mellitus
DSH	domestic shorthair
HAC	hyperadrenocorticism
IRMA	immunoradiometric assay
LDDST	low-dose dexamethasone suppression test
MRI	magnetic resonance imaging
PC1	prohormone convertase 1
PDH	pituitary-dependent hyperadrenocorticism
RIA	radioimmunoassay
UCCR	urine cortisol:creatinine ratio

From the Internal Medicine Unit, Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France (Benckekroun, de Fornel-Thibaud, Maurey-Guenec, Rosenberg); and the Veterinary Anticancer Center, Maisons-Alfort, France (de Fornel-Thibaud); the Biochemistry Unit, Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France (Dubord); the Department of Clinical Sciences and Clinical Research Unit, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France (Dossin); the Department of Veterinary Medical Sciences, Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italia (Fracassi); the Biochemistry Unit, Vetagro Sup, Campus Vétérinaire de Lyon, Marcy l'Etoile, France (Rannou, Garnier); the Department of Small Animal Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium (Daminet). Part of this work was presented at the 2008 ACVIM Forum, Seattle, WA; at the annual ECVIM-CA Congress, in Ghent, Belgium, September 2008 (winner of the ESVE abstract award); and at the 2009 ACVIM Forum and Canadian Veterinary Medical Association Convention, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author: Dan Rosenberg, DVM, PhD. Internal Medicine Unit, Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704, Maisons-Alfort, France; e-mail: drosenberg@vet-alfort.fr

Submitted September 8, 2011; Revised February 7, 2012; Accepted March 2, 2012.

Copyright © 2012 by the American College of Veterinary Internal Medicine

10.1111/j.1939-1676.2012.00924.x

controlled diabetes mellitus (DM), associated with polyuria and polydipsia (PU/PD), weight loss, polyphagia, abdominal distension, muscle weakness, lethargy, and dermatologic abnormalities.^{1–15} None of these clinical signs can be considered as specific, with the possible exception of the occasionally observed skin fragility syndrome.^{1,12,16} Furthermore, PDH in cats is not the only condition characterized by a frequent association with DM and the common visualization of a pituitary tumor on imaging. These features are common to acromegaly in cats, and it might be difficult to distinguish between these 2 conditions in the absence of clinical signs specific to one of the 2 diseases.^{18–21}

Corticotrophic function tests have been validated for the diagnosis of HAC in cats, but lack specificity.¹ Urine cortisol:creatinine ratio (UCCR) and the low-dose dexamethasone suppression test (LDDST) are

generally preferred to ACTH stimulation tests, which lack sensitivity.^{1,8,22,23} The intravenous (IV) administration of 0.01 mg/kg dexamethasone is less frequently associated with feedback inhibition in healthy cats than in dogs. The LDDST is therefore generally based on the IV administration of 0.1 mg/kg dexamethasone in cats, to increase specificity.²⁴

Deregulated secretion of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) by corticotroph tumor causes PDH. ACTH is derived from pro-opiomelanocortin (POMC) a high molecular weight polypeptide precursor. This precursor is first processed to pro-ACTH which is then cleaved to ACTH by the prohormone convertase 1 (PC1).²⁵ Plasma ACTH precursor (POMC and pro-ACTH) concentrations are high in large or aggressive pituitary corticotrophic tumors in both humans and dogs,^{26–29} but no equivalent information is available for cats. The aim of this study was to describe plasma ACTH precursor (POMC and pro-ACTH) concentrations in cats with PDH and to estimate the utility of such determinations for the diagnosis of this condition, by comparing the results obtained with those for 3 other groups of cats: cats with DM but not HAC, cats with DM and confirmed acromegaly but not HAC, and healthy cats.

Materials and Methods

Clinical Cases

Cats were included prospectively in this study at the veterinary schools of Alfort and Toulouse (France), Ghent (Belgium), and Bologna (Italy). Four groups of cats were included. The cats in group 1 had PDH. Group 2 included cats with DM without HAC. Group 3 included cats with DM and confirmed acromegaly without HAC. Group 4 contained clinically healthy cats.

The inclusion criteria for group 1 were clinical findings consistent with HAC, confirmed by LDDST results, symmetric adrenal glands on contrast-enhanced CT scan, suggesting a pituitary origin, and availability of a pituitary contrast-enhanced CT scan for measurement of the pituitary gland height.

Cats were allocated to groups 2 and 3 after the diagnosis of DM on the basis of clinical findings, hyperglycemia, glycosuria, and serum fructosamine concentration above the reference interval, and exclusion of HAC. We excluded HAC on the basis of an absence of clinical findings consistent with it, with the exception of clinical signs of DM, and the results of UCCR or LDDST, the choice of the test used being left to the owner. Final inclusion in group 3 was based on insulin resistance (defined as poor clinical control and mean serum glucose concentration >300 mg/dL despite the use of insulin at a dose >1.5 units/kg/injection twice daily),³⁰ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations consistent with acromegaly, and evidence of pituitary gland enlargement detected on contrast-enhanced CT scan. Cats were assigned to group 2 on the basis of data inconsistent with acromegaly, with at least 2 of the following criteria satisfied: no insulin resistance, IGF-1 within the reference interval, no CT scan or MRI performed, or no evidence of pituitary gland enlargement on CT or MRI.

Cats in group 4 were recruited from among staff members owned cats, based on history and clinical examination with no abnormality, no medication given within the past month, unremarkable results of serum biochemistry including serum glucose and fructosamine concentration within reference interval, and ruling out HAC by UCCR or LDDST, with the choice of test

governed essentially by the lifestyle of the cat (living alone versus with other cats, limiting the simplicity of urine collection).

Laboratory Methods and Endocrine Tests

Serum and urine cortisol concentrations were determined with a kit,^a previously validated for use in cats.^{31,32} The LDDST was performed by injecting dexamethasone^b IV at a dose of 0.1 mg/kg body weight (BW) and collecting blood at baseline and after 4 and 8 hours.^{24,33,34} Reference values for serum cortisol concentration 8 hours after dexamethasone administration were ≤ 20 nmol/L. Serum cortisol concentration ≥ 40 nmol/L 8 hours after dexamethasone injection was considered consistent with HAC.¹

Urine for UCCR determination was collected by the owners, at home, on the morning of the test.²² Urine creatinine concentration was measured by an enzymatic method.^c HAC was ruled out when UCCR values were below the upper limit of the reference interval ($4\text{--}36 \times 10^{-6}$).

Serum fructosamine concentration was determined with a colorimetric assay.^d The reference interval used was 200–370 $\mu\text{mol/L}$.

Total serum IGF-1 concentration was determined with a commercially available radioimmunoassay^e validated for the cat, with reference values ranging from 208 to 443 ng/mL.³⁵ Serum IGF-1 concentration >1000 ng/mL in a diabetic cat was considered consistent with acromegaly.

Blood samples for the determination of ACTH and ACTH precursor concentrations were collected from the jugular vein into EDTA-coated tubes. The samples were immediately centrifuged at 4°C, $500 \times g$ for 8 minutes, and the resulting plasma was transferred to plastic tubes and stored at -80°C until analysis.

Plasma ACTH concentration was measured with an immunoluminometric assay (ILMA)^f previously used in cats.^{7,36} The reference interval used was 8–93 pg/mL. We determined the POMC/pro-ACTH concentrations of plasma samples from cats with the OCTEIA POMC kit,^g validated according to current procedures for bioanalytical analysis.³⁷ The calibration curve was obtained with 6 lyophilized human POMC calibrators diluted in a blank plasma matrix. The blank plasma matrix corresponded to a pooled collection of plasma samples from 10 healthy cats obtained 4 hours after the IV administration of dexamethasone phosphate at a dose of 1 mg/kg BW. Linearity was tested by diluting 1 sample with a high concentration of ACTH precursors in blank plasma matrix (dilution 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, and 1 : 16). The ratios of observed to expected values ranged from 100 to 109% (Table 1). The sensitivity of the assay, defined as the concentration corresponding to the mean plus 2 standard deviations for 5 replicates of the blank plasma matrix, was 53 pmol/L. Accuracy was determined by reconstituting 3 samples containing known concentrations of ACTH precursors with plasma matrix. Each sample was analyzed 5 times. Observed to expected ratios for spiking recovery ranged from 94 to 101% and accuracy was estimated as 98%. The intra-assay coefficient of variation obtained at 3 different samples with unknown concentrations measured 5 times each in a single assay ranged from 8 to 16% (Table 1). The interassay coefficient of variation obtained at 3 different samples with unknown concentrations measured in 5 consecutive assays ranged from 2 to 6%.

Computed Tomography

Food was withheld from the cats for 12 hours before CT scan. Anesthesia was induced by the IV administration of 6.5 mg/kg of propofol (1 g/100 mL),^h and was maintained with inhaled isofluraneⁱ and oxygen. Cats were placed in sternal recumbency and

Table 1. Partial validation of the OCTEIA POMC kit for use with cat plasma.

Sample	Concentrations		Measured/ Expected (%)
	Measured (pmol/L)	Expected (pmol/L)	
Linearity			
A	543	543	100
A/2	295	271	109
A/4	145	136	107
A/8	70	68	103
A/16	<53	<53	NA
Accuracy			
Sample 1	68 ± 1 ^a	72	94
Sample 2	167 ± 3 ^a	169	99
Sample 3	336 ± 11 ^a	333	101
Precision			
Intra-assay (pmol/L)	CV% (n = 5)	Interassay (pmol/L)	CV% (n = 5)
78 ± 8 ^a	10	57 ± 3 ^a	6
223 ± 18 ^a	8	231 ± 5 ^a	2
728 ± 114 ^a	16	351 ± 19 ^a	5

^aMean ± SD.

CV, coefficient of variation; NA, not applicable.

a CT scan of the neurocranium between the external occipital protuberance and the cribiform plate was obtained before and 1 minute after the IV injection of contrast medium (2 mL/kg),^j on a helical CT scanner.^k Pituitary gland height was measured for each cat on the image with the largest cross-section of the pituitary gland. A pituitary height ≥ 3.7 mm was considered enlarged.³⁸ Contrast-enhanced CT scans were obtained for the cranial abdomen in the cats of group 1, 5–10 minutes after contrast administration for image acquisition of the pituitary gland region. Adrenal gland was subjectively considered symmetric in size in case of difference between the maximal diameter of the larger and the smaller gland <20%.

Statistical Analysis

Microsoft Excel^l was used for descriptive statistics and data were described with medians and ranges. Plasma ACTH concentrations above the upper limit of quantification of the assay were reported as >1250 pg/mL. Plasma ACTH precursor concentrations below the analytical sensitivity of the assay were reported as <53 pmol/L and graphically plotted as = 53 pmol/L. Concentration above the upper limit of quantification of the assay was reported as >1,010 pmol/L and graphically plotted as = 1,010 pmol/L.

Plasma ACTH precursor concentrations for the 4 groups were compared by a Kruskal–Wallis one way analysis of variance test carried out with free software.^m A *P* value < .05 was considered significant. Group to group testing was then assessed by Mann–Whitney rank sum tests. Bonferroni correction was used to adjust the type I error rate for multiple comparisons such that *P* value < .05/6 or *P* value < .008 was considered significant.

Results

The inclusion criteria were met by 9, 13, 7, and 13 cats in groups 1, 2, 3 and 4, respectively. There were 4 neutered males and 5 neutered females in group 1. One of these cases has already been described in a case

report.⁷ All were domestic shorthair (DSH) cats. Median age at the time of the diagnosis was 12 years (range: 10–15 years). Their clinical signs were PU/PD (n = 6), polyphagia (n = 4), weight loss (n = 3), neuromuscular abnormalities such as weakness, abnormal behavior, neurologic deficits (n = 6), and dermatologic signs (n = 9). Five of these cats displayed skin fragility. Seven had poorly controlled DM. Median serum cortisol concentration 8 hours after low-dose dexamethasone administration (Cort_{8h}) was 152 nmol/L (range: 63–258 nmol/L). Plasma ACTH concentration was measured in 7 cats and ranged from 10 to >1250 pg/mL (median: 355 pg/mL), being within reference interval in one of the cat and above in the other 6. Seven cats had an enlarged pituitary gland, with a height of 6 mm to 27 mm (median: 8 mm). No pituitary gland abnormality was visible for 2 cats with typical clinical signs of HAC. Serum IGF-1 concentration was measured in 7 of the cats of this group (median: 85 ng/mL, range: 25–371 ng/mL). Serum fructosamine concentration was measured in 5 diabetic cats (median: 554 μ mol/L, range: 411–652 μ mol/L).

Group 2 included 7 male and 5 female DSH cats, and 1 male Russian blue cat, all neutered. Median age at inclusion was 13 years (range: 6–16 years). Clinical signs were: PU/PD (n = 13), polyphagia (n = 6), weight loss (n = 8), anorexia (n = 1), and plantigrade posture (n = 2). HAC was excluded on the basis of the LDDST in 6 cats (median Cort_{8h}: 9 nmol/L, range: <6–25) and UCCR in 7 cats (median: 6×10^{-6} , range: $1-8 \times 10^{-6}$). Pituitary gland was examined by CT scan only in one (with no abnormality). Median serum IGF-1 concentration was 457 ng/mL (range: 110–1489 ng/mL). Serum IGF-1 concentration was above reference interval (208–443 ng/mL) in 6 cats, <1000 ng/mL in 2 cats (457 and 463 ng/mL), and >1000 ng/mL in the remaining 4 cats. Median serum fructosamine concentration was 597 μ mol/L (range: 431–807 μ mol/L).

Group 3 included 6 male cats and 1 female cat, all neutered. Five were DSH and the other 2 were Burmese cats. Median age at the time of diagnosis was 12 years (range: 11–14 years). Clinical signs were PU/PD (n = 7), polyphagia (n = 5), weakness (n = 2), weight gain (n = 2), plantigrade posture (n = 2), heart murmur (n = 2), prognathism (n = 2), increased interdental spacing (n = 1), stridor (n = 1), anorexia (n = 1), and weight loss (n = 1). Median IGF-1 concentration was 1094 ng/mL (range: 1000 to >1460 ng/mL). Median pituitary height was 5 mm (range: 4–8 mm). Median fructosamine concentration was 562 μ mol/L (range: 429–787 μ mol/L). HAC was excluded on the basis of UCCR in 6 cases (median: 7×10^{-6} , range: $2-30 \times 10^{-6}$) and LDDST in 1 case (Cort_{8h}: <6 nmol/L).

Group 4 comprised 9 neutered females, 1 neutered male, 1 intact male, and 2 intact females. Median age at the time of blood collection was 3 years (range: 1–11 years). All the cats in this group were DSH. HAC was excluded by UCCR in 10 cases (median: 6×10^{-6} , range: $5-9 \times 10^{-6}$) and by LDDST in 3

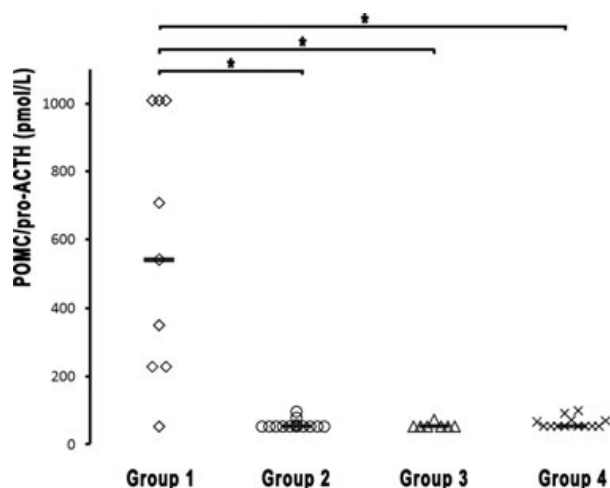


Fig 1. Pro-opiomelanocortin and pro-adrenocorticotrophic hormone (POMC and pro-ACTH) concentrations in cats with PDH (group 1, diamonds), cats with DM with no demonstration of acromegaly (group 2, circles), cats with DM and acromegaly (group 3, triangles), and healthy cats (group 4, crosses). Measurements below the lower limit of quantification of the assay are assigned a concentration of 53 pmol/L, and measurement above the higher limit of quantification of the assay are assigned a concentration of 1010 pmol/L. Medians are indicated by horizontal lines. *Significantly different ($P < .008$).

cases (Cort_{8h} : <6 nmol/L). Median fructosamine concentration was 232 $\mu\text{mol/L}$ (range: 179–267 $\mu\text{mol/L}$).

Plasma ACTH precursor (POMC and pro-ACTH) concentrations in group 1 ranged from <53 to >1010 pmol/L (median: 543 pmol/L) (Fig 1). In the 7 cats with an enlarged pituitary gland, concentration measurements ranged between 229 and >1010 pmol/L (median: 709 pmol/L). One of the cats without pituitary gland enlargement had an ACTH precursor concentration <53 pmol/L and the other had an ACTH precursor concentration of 229 pmol/L. In the other groups, plasma ACTH precursor concentrations ranged between <53 and 96 pmol/L (median: <53 pmol/L) for group 2, <53 and 72 pmol/L (median: <53 pmol/L) for group 3, and <53 and 99 pmol/L (median: <53 pmol/L) for group 4. The ACTH precursor concentration was <53 pmol/L in 10/13, 6/7, and 8/13 cats, respectively, in group 2, 3, and 4. Plasma ACTH precursor concentrations in the cats of group 1 were significantly higher than those in cats from groups 2, 3, or 4 ($P < .001$, $P = .004$, and $P = .003$, respectively). Plasma ACTH precursor concentrations did not differ significantly between the cats of groups 2, 3, and 4.

Discussion

In this study, we prospectively compared plasma ACTH precursor (POMC and pro-ACTH) concentrations in cats with PDH, DM, DM with acromegaly and healthy cats. PDH in cats is a rare disease and the largest survey of this disease to date included only 8 cases.¹⁷ Despite the inclusion of cats from 4

different referral centers, we were able to include only 9 cases prospectively, making it difficult to estimate the sensitivity of the tool developed in this study.

PDH diagnosis is challenging in cats because of its vague clinical presentation and the inadequacies of the available diagnosis tools. In this study, 8/9 cats with PDH have a plasma ACTH precursor concentration ≥ 229 pmol/L, whereas none of the healthy cats or cats with DM with or without acromegaly had plasma ACTH precursor concentrations >99 pmol/L. These results suggest that corticotrophic tumors in cats are associated with high plasma concentrations of ACTH precursors. In humans, it is assumed that the impairment of POMC processing in less differentiated pituitary tumors derived from corticotroph cells leads to an increase in the secretion of ACTH precursors into the plasma.^{26,27,39} In dogs, high plasma ACTH precursor concentrations is correlated with the size of the pituitary tumor.^{28,29} Plasma concentrations of ACTH precursors are high in 13/14 dogs with a large pituitary tumor (pituitary gland height of 5–22 mm).²⁹ Similar results were obtained in this study, with the recording of high plasma ACTH precursor concentrations in all 7 cats with an enlarged pituitary gland (6–27 mm in height). Plasma ACTH precursor concentrations above the upper limit of the range of values obtained for the control group were also found in 1/2 cats with PDH and no visible pituitary gland enlargement. ACTH precursors are rarely present at detectable concentrations in the plasma of dogs with PDH, but no enlargement of the pituitary gland.²⁹ This observation is reminiscent of another case with no enlargement of the pituitary gland (pituitary gland height: 2.9 mm) reported in a previous study focusing on hypophysectomy in cats with PDH.⁸ A high plasma ACTH precursor concentration was indirectly suspected, based on comparisons of plasma ACTH concentrations determined by radioimmunoassay (RIA), which should theoretically detect both ACTH and ACTH precursors, and by an immunoradiometric assay (IRMA), which was more specific for ACTH. Histologic examination showed the differentiation of the pituitary gland of this cat to be similar to that in other hypophysectomized cats in the survey.⁸

Plasma ACTH concentration was measured in 7/9 cats with PDH with a commercialized ILMA claimed by the manufacturer as specific for ACTH concentration determination in humans. Indeed, these measurements appeared poorly correlated with plasma ACTH precursors concentrations measures in the same cats. Comparison of plasma ACTH concentrations RIA and ILMA to evaluate indirectly ACTH precursors concentrations was not conducted in this study. One PDH cat had ACTH concentration within reference interval. To date, very little is known about ACTH measurement in cats with HAC. In dogs, plasma ACTH concentration is within reference interval in 58/91 dogs with PDH.⁴⁰

Hypophysectomy is rarely performed at our referral centers and postmortem examination was declined in

most of the PDH cases. Consequently, the main limitation of this study is the lack of histologic examination of the pituitary gland of the cats with PDH or acromegaly included. In addition to providing information about differentiation status, immunohistologic characterization of the pituitary tumors would have made it possible to confirm the corticotrophic or somatotrophic nature of the tumor, and the correct allocation of the cats to groups 1 and 3. Despite this limitation, the assignment of cats to these 2 groups was probably accurate. We used the most specific criteria possible to limit the risk of misallocation in the 2 groups. In 7/9 cats in group 1, the association of clinical signs compatible with HAC, the absence of feedback inhibition after LDDST with a dose of dexamethasone (0.1 mg/kg) limiting the false-positive rate and the detection of pituitary gland enlargement, provided strong evidence of PDH.¹ Serum IGF-1 concentration was measured in 5 of these 7 cats and was within the reference interval, confirming the low probability of acromegaly. PDH in cats may be associated with the absence of visible pituitary gland enlargement on CT scan, as was the case for 2 animals in this study.^{1,8} Both cats concerned had a serum IGF-1 concentration within the reference interval. One had a potbellied appearance and acquired skin fragility, which is rarely observed in contexts other than HAC in cats. It has occasionally been reported after the use of progestagens, or in the contexts of DM without documented HAC, disseminated histoplasmosis, and various biliary and hepatic diseases.^{41–44} Routine biochemistry and hematologic examination, and complete ultrasound examination of the abdomen identified none of these features in this cat, other than DM. The 2nd cat was the only animal in group 1 to have a plasma ACTH precursor concentration below the lower limit of quantification of the assay. The clinical signs of this cat were suggestive of HAC (abdominal distension, thin and inelastic skin with alopecia, weight loss, and poorly controlled DM). It had an unsuppressed cortisol concentration, 4 and 8 hours after LDDST (320 nmol/L and 180 nmol/L, respectively). In dogs, the risk for any corticotrophic function test, including the LDDST, of false-positive results suggesting HAC is frequently highlighted in reference textbooks and review manuscripts, especially when DM is present.^{45,46} However, this risk has rarely been investigated in cats. In 1 recent study, suppression was systematically observed after LDDST with 0.1 mg/kg dexamethasone in 20 cats with DM, regardless of the quality of glycaemia control, whereas no suppression was observed in 2 additional cats subsequently diagnosed with HAC.³⁴ Given these findings and the clinical features of this cat, the probability of misclassification to group 1 appears low.

In this study, cats were assigned to group 3 on the basis of a combination of insulin resistance, high IGF-1 concentration, and pituitary gland enlargement. Cases of acromegaly lacking at least one of these criteria have already been described in cats and it is therefore possible that some cases of acromegaly were missed with this strategy.^{35,47,48} Conversely, none of

these criteria including IGF-1 concentration >1000 ng/mL can be considered specific of acromegaly separately, but the probability of incorrectly including cats without acromegaly in group 3 appears low with these 3 robust criteria taken together.^{35,48,49} The high ratio of males to females (6/7 cats) is consistent with published findings.^{35,47} Moreover, although the clinical presentation of acromegaly in cats is polymorphic, some features are reasonably specific. In 4/7 cats, at least one of the following features, weight gain despite insulin resistance, morphologic changes, or stridor, was present increasing even more our confidence that the cats had been correctly assigned.

One cat in group 3 and 1 cat in group 2 was anorexic. Although described in acromegalic and diabetic cats,^{50,51} anorexia is usually a sign of complicated diabetes or concurrent disease. The 2 cats had uncomplicated diabetes mellitus and no concurrent disease was identified.

Acromegaly in cats is underdiagnosed.³⁵ Neither insulin resistance, IGF-1 concentration above our diagnostic cut-off, nor pituitary gland enlargement can be considered perfectly sensitive for acromegaly diagnosis.^{35,48} Thus, it is possible that acromegalic cats were included in group 2. This is particularly true for the 4 cats with serum IGF-1 concentrations >1,000 ng/mL. The serum IGF-1 concentrations of cats with DM without acromegaly increase with treatment duration, but generally remain within the reference interval, which was not the case for these 4 cats. Three of them had poorly controlled DM on enrollment, but did not meet the criteria used here for insulin resistance. The owners of these 4 cats refused permission for CT scans of the pituitary glands of the cats, which were thus assigned to group 2. Bearing these doubts about the correct allocation of these 4 cats in mind, the clear difference in ACTH precursor concentration between cats with PDH and non HAC cats with DM with or without demonstrated acromegaly (groups 2 and 3) is likely to be useful to clinicians, as HAC in cats is often diagnosed in a context of DM, suspected acromegaly, or both.^{1–3,21}

The use of OCTEIA POMC kit in cat was only partially validated in this study. Precision was determined with minimal number of replicates in this context of scarcity of samples from cats containing detectable concentrations of ACTH precursors.³⁷ The size and format (eg, median age at 3 years) of group 4 didn't allow the determination of a reference interval. Interference (eg, hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia) and stability at different conditions of storage were not tested either. We used stringent preanalytical conditions: blood centrifugation at 4°C, immediate freezing of plasma until analysis, by analogy with the requirements for plasma ACTH concentration measurement.⁵² We are aware of no published data relating to the stability of ACTH precursors in humans. In dogs, preliminary results have indicated that simple sampling and shipping procedures can be used.ⁿ The commercialization of the OCTEIA POMC kit has been stopped recently limiting the possibility of using the

results of this study in clinical field. However, antibodies on which this commercial assay was based are still available in the lab where they were developed.^o Validation of a new assay developed with the same antibodies appears possible in theory.

In conclusion, ACTH precursor concentration ≥ 229 pmol/L was measured in 8/9 cats with PDH. No plasma POMC/pro-ACTH concentration ≥ 100 pmol/L was found in a relatively large number of cats without PDH (cats with DM with or without acromegaly and healthy cats). Subject to a new validation of an assay allowing ACTH precursor concentration measurement and confirmation in a larger cohort of cats with PDH, the use of this kind of tool may be of value for the diagnosis of PDH in cats and for the general diagnostic approach to DM in cats.

Footnotes

^a Immulite cortisol, Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA

^b Dexadreson, dexamethasone phosphate, 2 mg/mL, MSD Animal Health, Beaucauzé, France

^c Konelab creatinine (Enzymatic), Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland

^d Fructosamine, Roche, Basel, Switzerland

^e Cambridge Specialist Laboratories Services Ltd, Cambridge, UK

^f Immulite ACTH, Siemens Medical Solutions Diagnostics

^g OCTEIA POMC, Immunodiagnostic Systems Limited, Boldon, Tyne and Wear, UK

^h Rapinovel, Schering-Plough Vétérinaire, Levallois-Perret, France

ⁱ Isoflurane aerrane, Baxter SAS, Maurepas, France

^j Télébrix 35, sodium and meglumine ioxitalamate, 350 mg of iodine/mL. Laboratoire Guerbet, Roissy-Charles-de-Gaulle, France

^k Scanner Hispeed CT/e Plus. General Electric Medical Systems, Milwaukee, WI

^l Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Corporation, Redmond, WA

^m VassarStats, <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>

ⁿ de Fornel-Thibaud P, Granger N, Rosenberg D. Effect of aprotinin, centrifugation, and storage temperatures on stability of canine plasma adrenocorticotrophic hormone precursors before analysis, *J Vet Intern Med* 2005;19:423 (abstract)

^o Professor Anne White, Faculty of Medical and Human Sciences, University of Manchester, Manchester, UK

Acknowledgments

This study was supported by postdoctoral grants from Intervet Pharma R & D SA, Angers, France, awarded to Ghita Bencheckroun, and from the *Direction Générale de l'Enseignement et de la Recherche (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche)*. The authors thank the referring veterinary surgeons of the cats described in this study, and all the clinical staff members involved in recruiting the cases described in this study.

References

1. Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism in cats (Cushing's syndrome). In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. St Louis, MO: Saunders; 2004:358–393.
2. Nelson RW, Feldman EC, Smith MC. Hyperadrenocorticism in cats: Seven cases (1978–1987). *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:245–250.
3. Watson PJ, Herrtage ME. Hyperadrenocorticism in six cats. *J Small Anim Pract* 1998;39:175–184.
4. Rossmeisl JH, Jr, Scott-Moncrieff JC, Siems J, et al. Hyperadrenocorticism and hyperprogesteronemia in a cat with an adrenocortical adenocarcinoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2000;36:512–517.
5. Blois SL, Dickie EL, Kruth SA, Allen DG. Multiple endocrine diseases in cats: 15 cases (1997–2008). *J Feline Med Surg* 2010;12:637–642.
6. Spada E, Proverbio D, Giudice C, et al. Pituitary-dependent hyperadrenocorticism and generalised toxoplasmosis in a cat with neurological signs. *J Feline Med Surg* 2010;12:654–658.
7. Fracassi F, Mandrioli L, Diana A, et al. Pituitary macroadenoma in a cat with diabetes mellitus, hypercortisolism and neurological signs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007;54:359–363.
8. Meij BP, Voorhout G, van den Ingh TS, Rijnberk A. Transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in 7 cats. *Vet Surg* 2001;30:72–86.
9. Meij BP, van derVlugt-Meijer RH, van denIngh TS, Rijnberk A. Somatotroph and corticotroph pituitary adenoma (double adenoma) in a cat with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *J Comp Pathol* 2004;130:209–215.
10. Schwedes CS. Mitotane (o,p'-DDD) treatment in a cat with hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 1997;38:520–524.
11. Boag AK, Neiger R, Church DB. Trilostane treatment of bilateral adrenal enlargement and excessive sex steroid hormone production in a cat. *J Small Anim Pract* 2004;45:263–266.
12. Daley CA, Zerbe CA, Schick RO, Powers RD. Use of metyrapone to treat pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a cat with large cutaneous wounds. *J Am Vet Med Assoc* 1993;202:956–960.
13. Moore LE, Biller DS, Olsen DE. Hyperadrenocorticism treated with metyrapone followed by bilateral adrenalectomy in a cat. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:691–4.
14. Neiger R, Witt AL, Noble A, German AJ. Trilostane therapy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in 5 cats. *J Vet Intern Med* 2004;18:160–164.
15. Skelly BJ, Petrus D, Nicholls PK. Use of trilostane for the treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a cat. *J Small Anim Pract* 2003;44:269–272.
16. Duesberg C, Peterson ME. Adrenal disorders in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997;27:321–347.
17. Duesberg CA, Nelson RW, Feldman EC, et al. Adrenalectomy for treatment of hyperadrenocorticism in cats: 10 cases (1988–1992). *J Am Vet Med Assoc* 1995;207:1066–1070.
18. Elliott DA, Feldman EC, Koblik PD, et al. Prevalence of pituitary tumors among diabetic cats with insulin resistance. *J Am Vet Med Assoc* 2000;216:1765–1768.
19. Feldman EC, Nelson RW. Acromegaly and hyperadrenocorticism in cats: A clinical perspective. *J Feline Med Surg* 2000;2:153–158.
20. Feldman EC, Nelson RW. Disorders of growth hormone. In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. St Louis, MO: Saunders; 2004:45–84.

21. Gunn-Moore D. Feline endocrinopathies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2005;35:171–210, vii.
22. Goossens MM, Meyer HP, Voorhout G, Sprang EP. Urinary excretion of glucocorticoids in the diagnosis of hyperadrenocorticism in cats. *Domest Anim Endocrinol* 1995;12:355–362.
23. Henry CJ, Clark TP, Young DW, Spano JS. Urine cortisol:creatinine ratio in healthy and sick cats. *J Vet Intern Med* 1996;10:123–126.
24. Smith MC, Feldman EC. Plasma endogenous ACTH concentrations and plasma cortisol responses to synthetic ACTH and dexamethasone sodium phosphate in healthy cats. *Am J Vet Res* 1987;48:1719–1724.
25. White A, Gibson S. ACTH precursors: Biological significance and clinical relevance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:251–255.
26. Gibson S, Ray DW, Crosby SR, et al. Impaired processing of proopiomelanocortin in corticotroph macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:497–502.
27. Raffin-Sanson ML, Massias JF, Dumont C, et al. High plasma proopiomelanocortin in aggressive adrenocorticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4272–4277.
28. Bosje JT, Rijnberk A, Mol JA, et al. Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Domest Anim Endocrinol* 2002;22:201–210.
29. Granger N, de Fornel P, Devauchelle P, et al. Plasma pro-opiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med* 2005;19:23–28.
30. Feldman EC, Nelson RW. Feline diabetes mellitus. In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. St Louis, MO: Saunders; 2004:539–579.
31. Reimers TJ, Salerno VJ, Lamb SV. Validation and application of solid-phase chemiluminescent immunoassays for diagnosis of endocrine diseases in animals. *Comp Haematol Int* 1996;6:170–175.
32. Cauvin AL, Witt AL, Groves E, et al. The urinary cortisol:creatinine ratio (UCCR) in healthy cats undergoing hospitalisation. *J Feline Med Surg* 2003;5:329–333.
33. Peterson ME, Graves TK. Effects of low dosages of intravenous dexamethasone on serum cortisol concentrations in the normal cat. *Res Vet Sci* 1988;44:38–40.
34. Kley S, Alt M, Zimmer C, et al. Evaluation of the low-dose dexamethasone suppression test and ultrasonographic measurements of the adrenal glands in cats with diabetes mellitus. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2007;149:493–500.
35. Niessen SJ, Petrie G, Gaudiano F, et al. Feline acromegaly: An underdiagnosed endocrinopathy? *J Vet Intern Med* 2007;21:899–905.
36. Simpson CJ, Mansfield CS, Milne ME, Hodge PJ. Central diabetes insipidus in a cat with central nervous system B cell lymphoma. *J Feline Med Surg* 2011;13:787–792.
37. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, et al. Bioanalytical method validation: A revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000;17:1551–1557.
38. Tyson R, Graham JP, Bermingham E, et al. Dynamic computed tomography of the normal feline hypophysis cerebri (Glandula pituitaria). *Vet Radiol Ultrasound* 2005;46:33–38.
39. Raffin-Sanson ML, de Keyser Y, Bertagna X. Proopiomelanocortin, a polypeptide precursor with multiple functions: From physiology to pathological conditions. *Eur J Endocrinol* 2003;149:79–90.
40. Rodriguez Piñeiro MI, Benckekroun G, de Fornel-Thibaud P, et al. Accuracy of an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) immunoluminometric assay for differentiating ACTH-dependent from ACTH-independent hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:850–855.
41. Regnier A, Pieraggi MT. Abnormal skin fragility in a cat with cholangio-carcinoma. *J Small Anim Pract* 1989;30:419–423.
42. Trotman TK, Mauldin E, Hoffmann V, et al. Skin fragility syndrome in a cat with feline infectious peritonitis and hepatic lipidosis. *Vet Dermatol* 2007;18:365–369.
43. Daniel AG, Lucas SR, Junior AR, et al. Skin fragility syndrome in a cat with cholangiohepatitis and hepatic lipidosis. *J Feline Med Surg* 2010;12:151–155.
44. Tamulevicius AM, Harkin K, Janardhan K, Debey BM. Disseminated histoplasmosis accompanied by cutaneous fragility in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011;47:e36–e41.
45. Feldman EC, Nelson RW. Canine diabetes mellitus. In: Feldman EC, Nelson RW, eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia, PA: Saunders; 2004:486–538.
46. Gilor C, Graves TK. Interpretation of laboratory tests for canine Cushing's syndrome. *Topics Companion Anim Med* 2011;26:98–108.
47. Berg RI, Nelson RW, Feldman EC, et al. Serum insulin-like growth factor-I concentration in cats with diabetes mellitus and acromegaly. *J Vet Intern Med* 2007;21:892–898.
48. Reusch CE, Kley S, Casella M, et al. Measurements of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in cats with diabetes mellitus. *Vet Rec* 2006;158:195–200.
49. Starkey SR, Tan K, Church DB. Investigation of serum IGF-I levels amongst diabetic and non-diabetic cats. *J Feline Med Surg* 2004;6:149–155.
50. Peterson ME, Taylor RS, Greco DS, et al. Acromegaly in 14 cats. *J Vet Intern Med* 1990;4:192–201.
51. Crenshaw KL, Peterson ME. Pretreatment clinical and laboratory evaluation of cats with diabetes mellitus: 104 cases (1992–1994). *J Am Vet Med Assoc* 1996;209:943–949.
52. Kemppainen RJ, Clark TP, Peterson ME. Preservative effect of aprotinin on canine plasma immunoreactive adrenocorticotropin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* 1994;11:355–362.

2.4. Etude de la maturation de l'ACTH lors des tumeurs corticotropes chez le chien

Cette reproductibilité des observations entre l'homme et les carnivores domestiques suggère la que le blocage des étapes de maturation de la POMC dans les tumeurs corticotropes accompagne, voire induisent, l'acquisition d'un phénotype agressif. Cette hypothèse d'un défaut de maturation n'a pas encore été rapportée chez l'homme et nous avons donc entrepris de l'évaluer chez l'animal, en débutant chez le chien.

Nous avons étudié la maturation de la POMC au sein de tumeurs corticotropes canines prélevées après le décès de l'animal. Pour cela, nous avons mis au point des techniques de détection par Western Blot de la POMC et de la PC1/3 puis nous avons appliqué cette technique sur des tumeurs corticotropes d'agressivité variable.

Les résultats d'une analyse préliminaire, obtenus à partir de cinq tumeurs de grande taille et six tumeurs de petite taille ont révélé une expression faible et inconstante de la PC1/3 et une altération de la maturation de la POMC au sein des cinq tumeurs de grande taille, en comparaison avec les tumeurs de petite taille. Ces résultats nécessitent bien sûr d'être confirmés sur un plus grand effectif. A terme, une évaluation quantitative des ARN messagers de la POMC et de la PC1/3 au sein de tumeurs corticotropes de grande et de petite taille, complémentaire, pourrait être réalisée, sous réserve de conditions strictes de prélèvement des tissus, compatible avec la préservation des transcrits.

Pro-opiomelanocortin (POMC) processing and prohormone convertase 1 (pc1/3) level in dogs with pituitary corticotroph tumors.

G. Benckroun, P. de Fornel Thibaud, D. Rosenberg.

Soumis au Domestic Animal Endocrinology

Pro-opiomelanocortin processing and prohormone convertase 1 level in dogs with pituitary corticotroph tumours.

Ghita Benchekroun, Pauline de Fornel-Thibaud and Dan Rosenberg¹

Unité de Médecine Interne, Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, Maisons-Alfort, France.

ghita.benchekroun@vet-alfort.fr, p.defornel@micen-vet.fr, d.rosenberg@micen-vet.fr

Corresponding author: Dan Rosenberg

Tel: + 33 6 60 81 40 45

Email address: d.rosenberg@micen-vet.fr

Funding source:

MSD animal health R&D provided financial support for the conduct of this study but had no involvement in collection, analysis or interpretation of the data presented.

¹ Present address : Micen-Vet, 58 Rue Auguste Perret, Parc technologique Europarc, 94000 Créteil, France

Abstract

Pituitary corticotroph cells express the adrenocorticotropin hormone (ACTH) precursor known as pro-opiomelanocortin (POMC) and the prohormone convertase 1 (PC1/3) enzyme. This co-expression allows the multistep proteolytic maturation of POMC into pro-ACTH, then into ACTH before ACTH secretion. High plasma levels of ACTH precursors, associated with large corticotroph tumours, have been measured in dogs with Cushing's disease. These data suggest that PC1/3 protein expression and POMC processing is altered in such tumours. The aim of this study was to characterize the levels of ACTH precursors and PC1/3 protein in small and large corticotroph tumours of dogs with Cushing's disease.

Pituitary tumours of dogs with Cushing's disease were collected post-mortem 30 minutes to 12 hours after natural death or euthanasia, and arbitrarily classified as small (pituitary height <6 mm) or large (pituitary height > 6 mm). POMC, pro-ACTH and PC1/3 were analysed by Western Blotting. After extraction, 4 μ g of total protein from each pituitary sample were loaded and resolved by SDS-PAGE, then transferred and revealed with adapted positive controls. Loading standardisation was controlled by β -actin Western Blotting after membrane stripping.

Six small and 5 large corticotroph tumours were collected. POMC and pro-ACTH signals were visualised in 5/5 large tumours and in 5/6 small tumours. The strongest signal intensity was observed in 2 large tumours. The pro-opiomelanocortin signal was higher than the pro-ACTH signal in 5/5 large tumours but equal to or lower than the pro-ACTH signal in 5/6 small tumours. The PC1/3 signal was weak to undetectable in 5/5 large tumours but strong in 5/6 small tumours.

Taken together, these results suggest differences in PC1/3 protein levels and patterns of POMC processing between large and small corticotroph tumours. If confirmed in larger

groups of tumours, further studies will be required to characterise the mechanism involved in these differences.

Key words

Pro-opiomelanocortin, proconvertase 1, Cushing's disease, pituitary, dog

1. INTRODUCTION

Hyperadrenocorticism (HAC) is one of the main canine endocrine diseases, especially in middle-aged and geriatric dogs. Approximately 80% of cases have Pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH, Cushing's disease) and about 80% of pituitary tumours are small. The remaining tumours are large and are visualised by CT scan or MRI.

PDH is associated with excessive or inappropriate secretion of ACTH. ACTH is derived from the multistep proteolytic action of prohormone convertase, mainly prohormone convertase 1 (PC1/3), on the high-molecular weight polypeptide precursor known as pro-opiomelanocortin (POMC) (1). POMC is mainly expressed by the pituitary corticotrophic cells. PC 1/3 is more ubiquitously expressed, including by corticotrophic cells. POMC is first processed to pro ACTH which is then cleaved to ACTH before secretion. PC1/3 controls both cleavage steps (1).

Indirect data, suggesting that plasma concentrations of ACTH precursors in dogs with large pituitary tumours were higher than in dogs with small pituitary tumours, were collected and then confirmed by our group using a direct ACTH precursor assay in 36 dogs (2; 3). These results were further confirmed in 120 additional dogs (unpublished personal data).

High levels of ACTH precursors have also been demonstrated in large pituitary tumours in humans (4; 5), and recently in cats (6). This latter species is characterised by a higher proportion of large pituitary tumours than in dogs or humans (7). Finally, evidence of high plasma levels of ACTH precursors has been found in less differentiated silent corticotroph tumours (8).

These observations suggest that POMC processing might be modified in dogs with PDH caused by large and undifferentiated tumours. Therefore, the aim of this study was to characterise and compare ACTH precursors and PC1/3 levels in large and small pituitary tumours in dogs with PDH.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Dogs diagnosed with PDH were included in the study. Inclusion criteria were:

- 1) A history and physical examination consistent with HAC.
- 2) At least one endocrine test result - ACTH stimulation test or low-dose dexamethasone suppression test - confirming the diagnosis of HAC.
- 3) Demonstration of the pituitary origin of HAC by measure of an unsuppressed plasma concentration of ACTH, an abdominal ultrasonography or an abdominal contrast-enhanced tomography showing adrenal symmetry.
- 4) A pituitary contrast-enhanced computed tomography allowing measurement of the pituitary height. Pituitary tumours were classified as microadenomas (pituitary height < 6 mm: group 1) and macroadenomas (pituitary height $\geq$ 6 mm: group 2).
- 5) Post-mortem sampling of pituitary tissue.

Pituitary tissues from dogs without HAC were also collected and used to develop the Western Blot protocol.

When an adequate volume of plasma was available, plasma POMC and pro ACTH were measured by an immunoluminometric assay previously validated in dogs (3).

2.2 Tissue collection and extraction

Pituitary glands were removed from all dogs during necropsy, within 30 minutes to 12 hours following natural death or euthanasia, then immediately frozen and kept at -80°C until processed.

Whole cell extracts were prepared from frozen tissue samples with the aim of limiting the possibility of enzyme and precursor degradation during extraction, as previously described (9; 10). Briefly, samples were Dounce-disrupted in a 50 mM Tris-Cl, pH 7.5 buffer, containing

0.5% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM E-64, 1 mM pepstatin, 10 mM leupeptin, 300 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 5.0 mg/ml aprotinin. After disruption, extracts were centrifuged at 3,000 g for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected, separated into aliquots, and stored at -80 °C until further use. Protein concentrations of each sample were measured by bicinchoninic acid method (11), using a commercial assay (MicroBC Assay, Interchim, Montluçon, France). The optical absorbances obtained at 570 nm were plotted against a bovine serum albumin standard curve ranging from 0 to 100 μ g/ml.

2.3 Western Blot analysis

2.3.1 ACTH precursors:

Proteins were resolved by SDS-PAGE in a Tris HCl 18% polyacrylamide gel (Biorad) and transferred to 0.2 μ m nitrocellulose sheets as previously described (12-14). The equivalent of 4 μ g of protein from pituitary extracts, 1500 ng of 1-39 ACTH fragment (A0423 *Sigma*) and 100 ng of canine recombinant POMC were loaded into the gel. The membranes were probed with antibody ab8615 (abcam), a commercially available monoclonal mouse antibody directed against the 1-24 fragment of ACTH, diluted 1/5000 in blocking solution. Binding of this antibody was detected by incubating the membrane with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Na931) 1/25000 diluted (*Amersham Biosciences*).

Immunodetected proteins were visualised with a commercial enhanced chemiluminescence system (ECL advance) and then exposed to X-ray films (*Amersham Hyperfilm ECL*, *Ge Healthcare*).

2.3.2 Proconcentrase 1/3

Proteins were resolved by SDS-PAGE in a Tris HCl 4 – 15 % polyacrylamide gel (Biorad) and transferred to 0.2 μ m nitrocellulose sheets. The equivalent of 4 μ g of protein for pituitary extracts and 10 ng for recombinant PC1/3, used as control (*Recombinant Human PC1/3 R&D*

systems (“forme aminoterminal” 111-617, 66 kDa), were loaded into the gel. The membranes were probed with antibody ab28551 (abcam), a commercially available antiserum directed against a synthetic 46 amino acid amino-terminal fragment of the protein, diluted 1/25000 in blocking solution. Binding of this antibody was detected by incubating the membrane with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (ab6721; abcam) 1/50000 diluted before detection.

2.3.4 Control of loading standardisation

Membranes were then stripped in a commercial stripping solution (Restore Western Blot Stripping, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's recommendation and re-probed for detection of actin, used as internal control of loading standardisation. Beta-actin immunodetection was adapted from reference (15), with blocking and labelling in the same buffer as the one used for the first detections and use of primary antibody (pan Ab-5, Neomarkers, Fremont, CA, USA) diluted at 1:2000 and anti-mouse IgG secondary antibody (ECL Na931, Ge Healthcare) diluted at 1:100000.

3. RESULTS

3.1 Description of cases

Six corticotropic microadenomas (Group 1) and 5 corticotropic macroadenomas (Group 2) were collected.

Group 1 included 6 dogs (4 males and 2 females) between 7 and 12 years old. Signalment, clinical findings and results of diagnostic tests are presented in Table 1. A CT scan was performed in 4 dogs. No pituitary tumour was visualised in 2 dogs whereas the pituitary gland was 5 and 6 mm in height in the other 2 dogs. The small tumour size was confirmed during necropsy examination. The plasma concentrations of ACTH precursors were measured in 4 dogs and ranged from 16 pmol/L to 70 pmol/L (Table 1).

Group 2 included 5 dogs (1 male, 3 females and 1 spayed female) between 7 and 12 years old. Signalment, clinical findings and diagnostic tests are presented in Table 2. Large pituitary tumours with heights ranging from 9 to 22 mm were visualised by CT scan. The plasma concentration of ACTH precursors was measured in all dogs and ranged from 15 to 1010 pmol/L (Table 2).

3.2 POMC-derived peptides Western Blot

POMC and pro-ACTH signals were detected in 5/5 macroadenomas and in 5/6 microadenomas (Figure 1).

A higher signal was detected for POMC than for pro-ACTH in all dogs from Group 2. In dogs from Group 1, the POMC signal seemed higher than the pro-ACTH signal in 2 dogs (dogs 1 and 5) whereas the pro-ACTH signal was higher than or identical to the POMC signal in the tumours of 2 dogs (dogs 4 and 6) and poorly detectable in the 2 others (dogs 2 and 3).

The highest POMC signal intensity was observed in 2 dogs from Group 2 (samples II and III).

3.3 PC1/3 Western Blot

A strong PC1/3 signal was identified in 5/6 dogs from Group 1 whereas the signal was weak to undetectable in all dogs from Group 2 (Figure 1).

4. DISCUSSION AND CONCLUSION

Cushing's disease usually occurs in middle-aged dogs. This condition results from inappropriate ACTH secretion by a corticotroph adenoma. A correlation between inappropriate POMC secretion by corticotroph adenoma and tumour aggressiveness has been reported in humans, dogs and cats (3-6). We hypothesised that POMC processing might be altered in large pituitary tumours and the aim of this study was therefore to characterise the PC1/3 protein status in a cohort of canine corticotropic tumours associated with Cushing's disease. To the best of the authors' knowledge, a characterisation at protein level has never been done in any species. In the present study, a clear difference in PC1/3 protein signal was found between microadenomas and macroadenomas, accompanied by a loss of expression of the PC1/3 protein in all dogs with a macroadenoma. These results suggest a lower level of PC1/3 protein in large pituitary tumours than in small ones. A similar finding was reported in two studies in humans, where defective PC1/3 expression was found in silent corticotroph adenoma (SCA) (16; 17). In both studies, PC1/3 expression was assessed by immunostaining. Interestingly, comparable levels of PC1/3 mRNA determined by RT-PCR were detected in SCA and non-functioning pituitary macroadenoma. This finding suggests a defective post-transcriptional regulation of PC1/3 in SCA rather than PC1/3 gene mutation. However, another study reported decreased mRNA expression of PC1/3 in SCA *versus* ACTH secreting tumour leading to Cushing's disease (18). The expression of PC1/3 or POMC was not assessed in the present study, due to variability in the time of sampling after death and the lack of stability of mRNA.

The presence of POMC and pro-ACTH protein in large and small pituitary tumours was quite variable. In large pituitary tumours, the POMC signal was higher than the pro-ACTH signal and was strong in 2 tumours. In dogs with small pituitary tumours, the pro-ACTH signal was

higher than the POMC signal in 4 small tumours but the POMC signal was higher in the 2 other tumours, as in large pituitary tumours.

The POMC signal was inversely proportional to the PC1/3 signal in the 5 macroadenomas, and was strong when PC1/3 was undetectable. This observation supports the involvement of PC1/3 in the maturation loss of POMC in some pituitary tumours. However, differences in POMC expression between large and small pituitary tumours cannot be excluded due to the absence of POMC mRNA characterisation in the present study. In another study, POMC mRNA was assessed in 10 canine corticotroph adenomas and compared to the levels obtained in pituitary glands of healthy dogs (19). The authors found that the POMC mRNA levels in dogs with corticotroph adenomas were approximately 5.5-fold greater than those in the control group. Three dogs with corticotroph adenomas had a large pituitary lesion but the POMC expression in these tumours was not compared with that of the 7 other dogs.

In the present study, the POMC and proACTH signals in small pituitary tumours were particularly variable. The classification of pituitary tumours as small or large remains unclear in veterinary medicine. We used a cut-off height of 6 mm because the induced neurological signs have rarely been described below this limit (20). However, this threshold is debatable and our allocation process may have played a role in the observed variability. It is also probable that pituitary tumour aggressiveness and differentiation cannot be assessed simply from the size of the tumour. To the best of our knowledge, no histologic or molecular criteria to characterise corticotroph tumour aggressiveness have been validated in dogs. In the case of small tumours, the possibility exists of early sampling - before a large size is attained – which could also have contributed to the variation in the POMC/Pro-ACTH signal within this group. A clear limitation of the present study is the lack of clear identification of the ACTH band in the POMC protein-derived Western Blot. Indeed, differences in the PC1/3 signal should ideally be compared with the POMC processing pattern which includes ACTH. ACTH is 4

kDa in weight and recovering such a small polypeptide by Western Blotting is technically challenging. Technical improvement of the protocol might allow the detection of ACTH.

The dogs included in this study received either trilostane or mitotane and some dogs with large pituitary tumours underwent radiation therapy in addition to medical treatment. As there were only 11 dogs in this study, it was difficult to investigate the potential interference of these treatments with POMC processing and PC 1/3 expression. To date, there is no data in the literature to support an effect of anticortisol or radiation therapy on POMC processing or PC1/3 expression.

A control group of dogs without hyperadrenocorticism would have to be included in future studies to compare POMC processing and PC1/3 expression between dogs with hyperadrenocorticism (caused by large or small pituitary tumours) and normal dogs.

Our study, despite its limitations, provides some new perspectives. Our preliminary finding of a defective PC1/3 protein signal in pituitary macroadenoma, if confirmed, could subsequently lead to characterisation of the mechanism involved and its possible role in the pathophysiology of corticotroph tumours.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from MSD Animal Health R& D, Angers, France.

REFERENCES

1. Bicknell AB. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 20:692-699, 2008.
2. Bosje JT, Rijnberk A, Mol JA, Voorhout G, Kooistra HS. Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Domest Anim Endocrinol* 22:201-210, 2002.
3. Granger N, De Fornel P, Devauchelle P, Segond S, Delisle F, Rosenberg D. Plasma pro-opiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med* 19:23-28, 2005.
4. Gibson S, Ray DW, Crosby SR, Dornan TL, Jennings AM, Bevan JS, Davis JR, White A. Impaired processing of proopiomelanocortin in corticotroph macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 81:497-502, 1996.
5. Raffin-Sanson ML, Massias JF, Dumont C, Raux-Demay MC, Proeschel MF, Luton JP, Bertagna X. High plasma proopiomelanocortin in aggressive adrenocorticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4272-4277, 1996.
6. Benchenkroun G, de Fornel-Thibaud P, Dubord M, Dossin O, Fracassi F, Rannou B, Garnier F, Maurey-Guenec C, Daminet S, Rosenberg D. Plasma ACTH precursors in cats with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 26:575-581, 2012.
7. Feldman EC. Hyperadrenocorticism in cats. In: *Canine and Feline Endocrinology*. Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, and Scott-Moncrieff JC (Eds.), Saunders, Saint Louis, 2015, p. 452-484.

8. de Fornel P, Granger N, Segond S, Delisle F, Rosenberg D. Sécrétion de précurseurs de l'ACTH par une tumeur hypophysaire sans hypercorticisme : description chez deux chiens. Congrès National de l'Association Française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie, Paris . 2003.
9. Berman Y, Mzhavia N, Polonskaia A, Devi LA. Impaired prohormone convertases in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. J Biol Chem 276:1466-1473, 2001.
10. Berman Y, Mzhavia N, Polonskaia A, Devi LA. Impaired prohormone convertases in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. J Biol Chem 276:1466-1473, 2001.
11. Kaushal V, Barnes LD. Effect of zwitterionic buffers on measurement of small masses of protein with bicinchoninic acid. Anal Biochem 157:291-294, 1986.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685, 1970.
13. Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun 28:815-820, 1967.
14. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A 76:4350-4354, 1979.
15. Spee B, Penning LC, van den Ingh TS, Arends B, Ijzer J, van Sluijs FJ, Rothuizen J. Regenerative and fibrotic pathways in canine hepatic portosystemic shunt and portal vein hypoplasia, new models for clinical hepatocyte growth factor treatment. Comp Hepatol 4:7, 2005.

16. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Akashi T, Ohno K, Hirata Y. Defective expression of prohormone convertase 1/3 in silent corticotroph adenoma. *Endocr J* 54:777-782, 2007.
17. Ohta S, Nishizawa S, Oki Y, Yokoyama T, Namba H. Significance of absent prohormone convertase 1/3 in inducing clinically silent corticotroph pituitary adenoma of subtype I--immunohistochemical study. *Pituitary* 5:221-223, 2002.
18. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Yoshimoto T, Shichiri M, Inoshita N, Oyama K, Yamada S, Hirata Y. Differential gene expression in ACTH -secreting and non-functioning pituitary tumors. *Eur J Endocrinol* 157:717-724, 2007.
19. Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease. *Domest Anim Endocrinol* 36:3-12, 2009.
20. Kipperman BS, Feldman EC, Dybdal NO, Nelson RW. Pituitary tumor size, neurologic signs, and relation to endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 43 cases (1980-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201:762-767, 1992.

Table 1: Signalment, clinical signs, diagnostic test, pituitary height and plasma ACTH precursors concentration in dogs included in Group 1 (microadenoma group)

	Age	Sex	Breed	Clinical signs
1	11	M	Yorkshire Terrier	PUPD, increased appetite, cutaneous signs
2	8	M	Cross breed	PUPD and cutaneous signs
3	7	M	Dachshund	PUPD, polyphagia, cutaneous signs and lethargy
4	8	F	Labrador Retriever	Cutaneous signs, obesity
5	12	F	Yorkshire Terrier	Abdominal distension, PUPD, polyphagia
6	9	M	Cross Breed	PUPD, alopecia, polyphagia

	Confirmatory diagnostic test (cortisol, nmol/L)	Pituitary Height	Plasma ACTH precursors (pmol/L)	Treatment administered before pituitary gland sampling
1	LDDST 200-16-60	2	18	None
2	ACTH ST 83-800	2	28	Trilostane
3	ACTH ST 145-1084	5	16	Mitotane
4	LDDST 185-82-60	6	70	None
5	ACTH ST 85-845	ND*	-	Mitotane
6	LDDST 43-71-90	ND*	-	Mitotane

*M: Male, F: Female, * CT scan not performed, LDDST: low dose dexamethasone suppression test, ACTH ST: ACTH stimulation test*

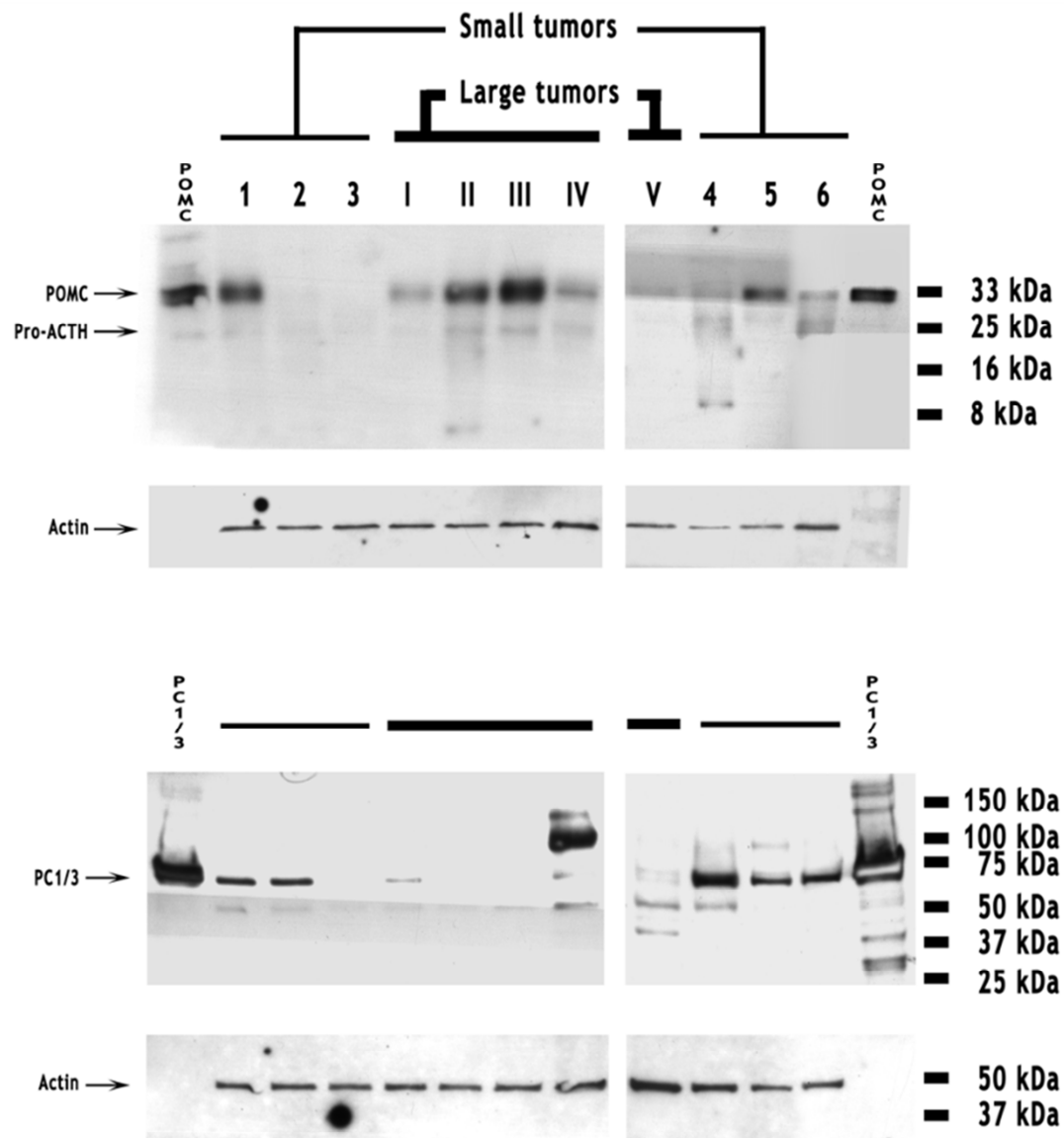
Table 2: Signalment, clinical signs, diagnostic test, pituitary height and plasma ACTH precursors concentration in dogs included in Group 2 (macroadenoma group)

	Age	Sex	Breed	Clinical signs
I	12	M	Vendeen Griffon	Cutaneous signs, decreased appetite
II	7	F	Cross breed	Polyphagia, PUPD, cutaneous signs, lethargy
III	10	F	Coton de Tulear	Anorexia, adypsia
IV	12	SF	Standard Poodle	Not recorded
V	10	F	Scottish Collie	PUPD, polyphagia, abdominal distension, cutaneous signs

	Confirmatory diagnostic test, cortisol (nmol/L)	Pituitary Height	Plasma ACTH precursors (pmol/L)	Treatment
I	ACTH ST 299-1750	9	300	None
II	ACTH ST 176-778	15	292	Radiation therapy and mitotane
III	ACTH ST 88-1146	20	1010	Trilostane
IV	ACTH ST 172-578	22	275	Radiation therapy
V	ACTH ST 152-1370	9	15	Mitotane

M: Male, F: Female, SF: Spayed Female, LDDST: low dose dexamethasone suppression test, ACTH ST: ACTH stimulation test

Figure 1: Western blot characterisation of POMC processing in 6 corticotropic microadenomas (1-6) and macroadenomas (I-V). Micro and macroadenomas were mixed in each gel to guarantee process comparability. After stripping, each membrane was reprobed to detect β -actin, used as an internal control.



DISCUSSION GENERALE

1. Optimisation du diagnostic étiologique de l'hypercorticisme par des examens d'imagerie médicale et biologiques

Notre travail a permis d'optimiser l'interprétation des résultats de certains outils biologiques et d'imagerie médicale pour la distinction des deux formes d'hypercorticisme. En effet, cette distinction est cruciale pour son pronostic et son traitement chez le chien.

1.1.Optimisation du diagnostic étiologique par des outils biologiques

1.1.1. Dosage de l'ACTH plasmatique

L'emploi du dosage d'ACTH a été étudié chez 109 chiens atteints d'hypercorticisme. Pour la première fois, la méthode de dosage utilisée a permis de discriminer les deux formes d'hypercorticisme avec une très grande précision. Il est probable que la limite inférieure de quantification de la technique (5 pg/ml), inférieure aux méthodes de dosages précédemment décrites ait contribué à ce résultat (29; 136). Une des limites de cette étude est l'absence de confirmation histologique de l'allocation correcte des chiens dans le groupe dépendant de l'ACTH et l'utilisation d'un unique critère de discrimination pour certains cas. En particulier, si nous considérons les formes d'hypercorticisme dépendants de l'alimentation, il est possible que des cas puissent avoir été classés comme dépendant de l'ACTH lors d'emploi de critères d'imagerie compte tenu de la symétrie surrénale recensée (5). Cette forme semble très rare, ce qui réduit la probabilité de ce classement erroné. Il est important de noter que les valeurs

d'ACTH consignées dans cette étude ont été obtenues selon des conditions préanalytiques strictes. Le sang prélevé sur EDTA était toujours immédiatement centrifugé à froid (4 °C) puis congelé (-80 °C). Le transport jusqu'au laboratoire permettait de maintenir le prélèvement dans son état congelé. Il est probable que de telles conditions préanalytiques soient difficilement reproductibles dans la vie courante de praticiens vétérinaires, d'une part à cause de l'absence d'accès à une centrifugeuse à froid mais également à un congélateur à -80 °C. Il serait donc intéressant de vérifier ces données après prélèvement sur tube EDTA-aprotinine afin de s'affranchir de la centrifugation à froid, de congeler à -20 °C et d'utiliser un moyen de transport classique. D'après une étude, l'emploi de l'aprotinine pourrait générer un biais négatif sur la quantification de la concentration plasmatique en ACTH. Ainsi, sous réserve de confirmation, des cas avec des valeurs de concentration plasmatique en ACTH proche de la fenêtre seuil décisionnelle (entre 5 et 10 pg/ml) pourraient être mal classés pour des raisons techniques. Une étude publiée en 2011 utilisant un analyseur Immulite 1000 a montré une sensibilité et une spécificité de ce dosage pour diagnostiquer un syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH de 82% et 100% pour un seuil à 10 pg/mL. En effet, 9 chiens avec un syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH avait une valeur d'ACTH inférieure à 10 pg/mL (198).

1.1.2. Dosage des précurseurs de l'ACTH

Dans le cadre de cette thèse, le travail publié par Granger et ses collaborateurs (34) a été poursuivi et les données précédemment publiées ont été confirmées sur 120 chiens. Ainsi, le dosage de précurseurs de l'ACTH semble un outil intéressant pour l'identification de tumeurs hypophysaires de grande taille. De plus, notre équipe a montré qu'un prélèvement centrifugé et transporté à température ambiante suffisait pour obtenir un résultat fiable, mettant ce test

diagnostique à la portée des vétérinaires à distance d'un laboratoire (199). Nous regrettons le retrait du marché de la trousse OCTEIA qui réduit la possibilité de réaliser ce dosage simplement. Cependant, les anticorps de cette trousse restent disponibles pour les laboratoires qui souhaiteraient offrir cet outil diagnostique. Chez l'homme, ce dosage a montré son utilité non seulement dans la détection des macroadénomes hypophysaires (197) mais également dans le diagnostic de syndrome de Cushing dépendant de l'ACTH d'origine ectopique (200). Ce bénéfice reste à évaluer chez l'animal.

1.2.Optimisation du diagnostic étiologique par examens d'imagerie

Deux autres études ont été réalisées avec le même objectif d'optimisation des critères de distinction des formes de syndrome de Cushing, en s'appuyant cette fois sur des critères d'imagerie médicale.

1.2.1. Echographie des glandes surrénales

La première étude s'est intéressée à l'échographie des glandes surrénales. L'échographie est souvent incontournable dans la prise en charge des patients atteints d'hyperadrénocorticisme. Outre l'examen des glandes surrénales, elle permet d'évaluer au cours du même examen le parenchyme hépatique et les voies biliaires, les structures adjacentes aux glandes surrénales notamment en cas de masse surrénale ainsi que le parenchyme rénal et les voies urinaires. Elle permet ainsi en théorie non seulement de distinguer les deux formes d'hypercorticisme, mais aussi d'évaluer l'extension locale et à distance d'une lésion tumorale ou de mettre en évidence les complications de la maladie telles que le mucocèle biliaire ou les calculs urinaires. Ce précieux examen morphologique et morphométrique a néanmoins une limite : sa fiabilité se

heurte à des situations dites équivoques dont l'une est l'asymétrie surrénalienne sans atrophie controlatérale. Cette situation peut se retrouver lors de tumeurs surrénales bilatérales (64-66), lors de tumeur surrénale unilatérale associé à une hyperplasie surrénale controlatérale non sécrétante ou lors d'hyperplasie nodulaire adrénocorticale uni- ou bilatérale. Notre étude a permis de définir un seuil de discrimination pour le diagnostic des formes d'hypercorticisme indépendants de l'ACTH lors d'asymétrie surrénalienne équivoque. Ainsi, l'observation d'une surrénale dont l'épaisseur maximale en coupe longitudinale (le chien étant placé en décubitus dorsal) est inférieure à 5 mm témoigne d'un hypercorticisme indépendant de l'ACTH. Ces données ne sont applicables que chez un chien n'ayant pas reçu de traitement médical (Trilostane ou Mitotane) compte tenu de l'influence de ces traitements sur le cortex surrénalien et donc sur l'apparence échographique des glandes surrénales (201; 202). L'absence d'analyse histologique des glandes surrénales des cas inclus dans cette étude a constitué une limite importante à la robustesse indéniable de nos résultats. Depuis ce travail, une autre limite a été soulignée dans un article publié en 2013, montrant une différence significative entre deux races de chien de format opposé (Yorkshire terrier et labrador retriever) de toutes les mesures des glandes surrénales effectuées par échographie (203). En particulier, l'épaisseur maximale du pôle caudal mesurée sur coupe longitudinale était de 5,4 mm pour la surrénale gauche chez le Yorkshire Terrier, une valeur très proche de notre seuil établi. Ce résultat invite à interpréter avec prudence les résultats d'une échographie abdominale montrant une asymétrie surrénale avec la plus petite surrénale d'épaisseur inférieure à 5 mm, en particulier hors d'un contexte clinique et biologique évocateurs d'hypercorticisme et chez un chien de petite race.

Il est probable que la vascularisation des surrénales est remaniée chez le chien atteint d'hypercorticisme dépendant de l'ACTH (204). Récemment, la faisabilité de l'échographie de

contraste des surrénales du chien a été démontrée ; elle permet d'évaluer la vascularisation des glandes surrénales de manière répétable (205). L'hypothèse principale d'une étude récente impliquant notre équipe était que la sécrétion excessive de glucocorticoïdes modifierait la vascularisation des glandes surrénales, apportant de nouveaux critères de distinction entre les formes dépendantes ou indépendantes de l'ACTH (206). Cette étude préliminaire doit être prolongée par une étude sur plus grand effectif visant à comparer l'échographie de contraste sur des hypercorticismes dépendants ou indépendants de l'ACTH, particulièrement lors de situation d'asymétrie équivoque. L'intérêt de cet examen est renforcé par la mise en évidence qu'une différence de perfusion est détectable entre les principaux différents types tumoraux affectant les glandes surrénales (adénome, carcinome et phéochromocytome) et différents degrés de malignité (207). Toutefois, le faible nombre de cas n'a pas encore permis d'établir avec robustesse les critères discriminants de perfusion propres à chaque type tumoral et à chaque degré de malignité.

1.2.2. Examen tomодensitométrique des glandes surrénales et de la glande hypophysaire

L'intérêt de l'examen tomодensitométrique de la glande hypophysaire et des glandes surrénales a également été étudié dans le même but de discrimination des deux formes d'hypercorticisme dépendant ou indépendant de l'ACTH. Son avantage par rapport à l'échographie réside essentiellement dans la réalisation d'une part d'un bilan précis d'extension locale et à distance en cas de tumeur surrénalienne, d'autre part d'une évaluation de la taille de la lésion hypophysaire lors d'hypercorticisme dépendant de l'ACTH.

Dans notre étude, plusieurs paramètres ont été étudiés. Un recouvrement important de l'ensemble des critères d'orientation testés a été identifié entre formes dépendante et

indépendante de l'ACTH. On retiendra que la spécificité du ratio du diamètre maximal de la surrénale de la plus grande taille sur le diamètre maximal de la surrénale de la plus petite taille pour la distinction des formes indépendantes de l'ACTH a été jugée acceptable avec un seuil décisionnel positionné à 2,08. L'absence d'analyse histologique systématique des lésions supports des hypercorticisme des cas collectés constitue cependant une limite actuelle à cette étude. Par ailleurs, les méthodes de mesure des glandes surrénales en tomодensitométrie n'ont pas été standardisées en médecine vétérinaire et l'absence de méthode et de valeurs de référence rend l'application de ces résultats difficile.

L'examen de la glande hypophysaire n'a en revanche pas permis de différencier les deux formes ; en cas de microadénome hypophysaire, l'examen de la glande hypophysaire était similaire entre les deux formes lorsque celle-ci n'était pas de taille augmentée ($P/B < 0.31.10^{-2} \text{ mm}^{-1}$). Chez les patients humains, la détection d'un microadénome hypophysaire est optimisée par la réalisation d'un examen d'imagerie par résonance magnétique dynamique (208; 209). En cas d'adénome de petite taille, ces examens ne permettent cependant pas toujours de détecter la lésion hypophysaire. En médecine vétérinaire, l'examen tomодensitométrique dynamique a été étudié et comparé aux résultats histologiques après adénohypophysectomie. Il a permis dans certains cas de détecter l'adénome hypophysaire, même de petite taille (141; 210). La réalisation d'un examen dynamique n'a pas été réalisée systématiquement dans notre étude et ne permet donc pas d'établir de comparaison sur cet aspect entre les deux formes d'hypercorticisme.

L'intérêt de l'examen tomодensitométrique des glandes surrénales dans le diagnostic étiologique de l'hypercorticisme a été étudié par d'autres équipes, notamment dans le but de comparer la nature histologique de la masse surrénalienne avec l'apparence

tomodensitométrie des glandes surrénales. Ainsi dans l'étude de Gregori (211) le schéma de rehaussement des tumeurs surrénaliennes a été étudié. Les auteurs rapportent une hétérogénéité caractéristique lors de tumeur maligne alors qu'un rehaussement en couronne est observé lors d'adénomes. Contrairement à l'homme chez qui la densité spontanée au scanner permet de reconnaître les adénomes (212), il n'y avait pas de différence de densité spontanée entre adénome, adénocarcinome et phéochromocytome dans cette étude (211). Néanmoins, une autre étude a montré l'influence de nombreux facteurs pouvant modifier la perfusion des surrénales chez le chien normal (213). De ce fait, une comparaison de résultats obtenus avec différents protocoles d'administration de contraste en tomodensitométrie ne peut être entreprise pour l'instant.

2. Validation chez le chat d'un dosage de précurseurs de l'ACTH : intérêt et implication

L'hypercorticisme est une dysendocrinie rare chez le chat. Cette rareté est majorée par la difficulté d'établir le diagnostic, en raison d'une présentation clinique non spécifique souvent dominée par la symptomatologie d'un diabète sucré et d'un manque de spécificité des outils diagnostiques. Une autre particularité du chat est la proportion plus élevée de tumeurs corticotropes agressives, de grande taille. Pour toutes ces raisons, il nous a paru intéressant d'évaluer si la concentration plasmatique en POMC pouvait être utile chez le chat au diagnostic de l'hypercorticisme dépendant de l'ACTH. L'étude réalisée dans le cadre de ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une augmentation des précurseurs de l'ACTH chez huit chats sur neuf, en comparaison avec des chats sains, des chats diabétiques non acromégales et des chats diabétiques acromégales. Parmi les huit chats, sept avaient une tumeur hypophysaire de grande taille, à rapprocher de résultats similaires décrits

préalablement. En effet, il a été démontré qu'une concentration plasmatique élevée de précurseurs de l'ACTH témoigne d'un phénotype agressif chez le chien (34) et l'homme (197). Toujours chez l'homme, la maturation anormale de la POMC entraînant une hausse de la sécrétion de POMC a été au départ décrite principalement lors de syndrome de Cushing ectopique (214). Aujourd'hui, la sécrétion excessive de POMC est considérée comme un marqueur d'agressivité et de manque de différenciation des tumeurs corticotropes, qu'elles soient d'origine hypophysaire ou ectopique (215). Chez le chat, notre étude a conduit au même constat malgré le faible nombre de cas recrutés, malgré un recrutement multicentrique. Il est toutefois intéressant de noter que la concentration plasmatique de précurseurs en ACTH était élevée chez tous les chats dont la lésion hypophysaire était de grande taille (hauteur de 6 à 27 mm) mais également chez un chat dont la lésion hypophysaire n'était pas visualisable à l'examen tomодensitométrique. Un autre cas similaire a été décrit dans une étude de sept cas de syndrome de Cushing hypophysaire traité par hypophysectomie (191). Un manque de différenciation des cellules tumorales, voir une détection précoce de ces lésions hypophysaires avant qu'elle n'atteigne une grande taille pourrait expliquer ces résultats. Il aurait été intéressant de disposer d'une analyse histologique des tumeurs hypophysaires des neuf chats, pour notamment établir une éventuelle association entre la valeur de précurseurs de l'ACTH et le statut de différenciation de la tumeur. Malheureusement, l'hypophysectomie n'est que très rarement pratiquée dans notre centre hospitalier et aucun examen nécropsique n'a été réalisé sur les chats de cette étude. Une étude à plus grande échelle permettrait de confirmer l'intérêt diagnostique des précurseurs de l'ACTH dans le cadre du syndrome de Cushing du chat et d'étudier son intérêt potentiel comme marqueur d'agressivité. Pour cela, le rapprochement avec des centres vétérinaires pratiquant communément l'hypophysectomie serait nécessaire. Ces investigations complémentaires souhaitables sont compliquées par la

disparition du marché du kit de dosage utilisé (OCTEIA POMC kit). Il serait cependant possible de valider un moyen de dosage similaire à partir des même anticorps, de manière analogue à l'espèce humaine pour laquelle ce dosage continue d'être utilisé (200)

Malgré cette réserve et la limite du manque d'analyse histopathologique des tumeurs dans cette série de cas, ces résultats témoignent de l'observation de concentrations plasmatiques élevées de précurseurs de l'ACTH dans une 3^{ème} espèce. Cette convergence suggère une conservation de l'association entre la perte de maturation de l'ACTH dans les cellules corticotropes tumorales et leur phénotype agressif. Le lien de cause à effet entre ces deux phénomènes reste cependant à établir avec précision, au niveau cellulaire et moléculaire.

3. Mécanisme pathologique des tumeurs corticotropes agressives et maturation de la POMC : un rôle de la proconvertase 1/3 ?

Suite aux résultats précédemment décrits confirmant sur une cohorte de 120 chiens et neuf chats atteints d'hypercorticisme l'augmentation de la concentration plasmatique des précurseurs de l'ACTH, nous avons analysé dans une dernière étude la maturation de la POMC au sein de tumeurs corticotropes de grande taille en comparaison avec des tumeurs de petite taille. Nous avons donc développé une technique d'immunodétection de la POMC et de ses dérivés (pro-ACTH et ACTH) ainsi qu'une technique d'immunodétection de PC1/3. La protéine PC1/3 est majoritairement exprimée dans le lobe antérieur où son activité protéolytique conduit à la production d'ACTH. Notre hypothèse était que l'altération de l'expression de PC1/3 au sein des tumeurs hypophysaires agressives pouvait causer l'absence de maturation de la POMC à l'échelle hypophysaire. L'immunodétection de la POMC et de

ses dérivés a montré un signal indétectable pour deux microadénomes, faible pour deux autres et fort pour les deux derniers. Le signal était très fort pour deux macroadénomes et intermédiaire pour trois. L'ACTH n'a pas pu être identifiée par cette technique, ce qui a constitué une limite à notre étude.

Concernant l'immunoélectrophorèse de la PC1/3, le signal est fort pour cinq microadénomes sur six, faible pour trois macroadénomes et indétectable pour les deux autres macroadénomes. De manière intéressante, le signal POMC était inversement proportionnel à celui de la PC1/3 chez les cinq macroadénomes étudiés. Cette observation est en accord avec l'hypothèse qu'une baisse d'expression de la protéine PC1/3 au sein de certaines tumeurs hypophysaires est à l'origine d'un défaut de maturation de la POMC. Les résultats hétérogènes sont en revanche plus difficiles à interpréter au sein des microadénomes, sans doute parce qu'il est difficile de préjuger de l'agressivité de la tumeur en se basant uniquement sur sa taille. Chez l'homme, des observations similaires ont été réalisées à l'aide de technique d'immunohistochimie sur des adénomes corticotropes silencieux n'exprimant pas PC1/3 (216). Les auteurs ont suggéré qu'un défaut de son expression explique la sécrétion de précurseurs de l'ACTH biologiquement inactifs, en lien avec l'absence de signes cliniques et biologiques d'hypercorticisme lors de certains adénomes corticotropes silencieux. Cependant, une autre étude incluant trois adénomes corticotropes silencieux a mis en évidence par immunohistochimie une expression de PC1/3 au sein de la tumeur (217). Il est probable que le degré de différenciation des cellules tumorales intervienne dans le niveau d'expression et donc de détection de la protéine PC1/3.

Une prochaine étape de ce travail serait par exemple d'évaluer quantitativement les ARN messagers codant la POMC et la PC1/3 au sein de tumeurs corticotropes de grande et de petite

taille d'agressivité variable. Pour cela, l'accès à des prélèvements de tissus compatibles avec une analyse transcriptionnelle est nécessaire. Aujourd'hui, le centre pratiquant couramment l'hypophysectomie est le centre d'Utrecht. Il serait donc envisageable de comparer les ARN messagers codant pour la POMC et la PC1/3 sur les hypophyses prélevées, de comparer les résultats en fonction de la taille de la tumeur ainsi que son degré d'agressivité évalué par analyse histologique. Chez le chien, la quantité d'ARNm codant pour la POMC a été évaluée au sein de 10 tumeurs corticotropes (47). Dans cette étude, le niveau d'ARNm de POMC des chiens atteints d'hypercorticisme était 5,5 fois supérieur à celui du groupe contrôle. Au sein des chiens atteints d'hypercorticisme, trois avaient une lésion hypophysaire de grande taille mais les auteurs n'ont pas comparé les résultats entre les micro et macroadénomes. La confirmation de l'implication de l'expression de PC1/3 dans la pathogenèse des tumeurs corticotropes hypophysaires pourrait constituer une piste thérapeutique. Le blocage ciblé au tissu hypophysaire de son activité protéolytique empêcherait la maturation de la POMC en ACTH et donc les effets biologiques et cliniques de l'excès de sécrétion d'ACTH.

CONCLUSION

Diagnostiqué chez trois chiens sur mille, le syndrome de Cushing ou hypercorticisme est la dysendocrinie la plus prévalente chez le chien. Deux formes sont décrites, l'hypercorticisme dépendant de l'ACTH et l'hypercorticisme indépendant de l'ACTH. La distinction étiologique de ces deux formes et au sein de chacune d'elles l'appréciation de l'agressivité de la tumeur quand elle est présente constituent deux paramètres primordiaux pour la précision du pronostic et l'optimisation du traitement. Notre travail a permis d'apporter aux vétérinaires, médecins et scientifiques des critères biologiques et morphologiques fiables de classification de l'hypercorticisme chez le chien et dans une moindre mesure chez le chat. Au sein des formes d'hypercorticisme dépendant de l'ACTH (maladie de Cushing), le diagnostic précoce d'une tumeur hypophysaire de grande taille est crucial pour une prise en charge optimale du patient. Notre travail a confirmé l'intérêt du dosage des précurseurs de l'ACTH chez le chien mais a également montré son intérêt chez le chat. Ces résultats confirment l'intérêt de développer le dosage des précurseurs de l'ACTH en médecine vétérinaire. Nos résultats ont également mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine PC1/3 dans les tumeurs corticotropes de grande taille. Ce dernier résultat renforce l'hypothèse qu'un mécanisme de la tumorigénèse à l'œuvre dans la cellule corticotrope implique le défaut de maturation de la POMC et serait conservé chez les mammifères. De plus, ce résultat ouvre une perspective dans la stratégie de lutte thérapeutique ciblée et précoce de l'hypercorticisme dépendant de l'ACTH.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cushing HW. The basophil adenomas of the pituitary and their clinical manifestations. Bull Johns Hopkins Hosp 50:137-195, 1932.
2. Galac S, Kooistra HS, Voorhout G, van den Ingh TSGAM, Mol JA, van den Berg G, Meij BP. Hyperadrenocorticism in a dog due to ectopic secretion of adrenocorticotrophic hormone. Domest Anim Endocrinol 28:338-348, 2005.
3. Churcher RK. Hepatic carcinoid, hypercortisolism and hypokalaemia in a dog. Aust Vet J 77:641-645, 1999.
4. Burgener IA, Gerold A, Tomek A, Konar M. Empty sella syndrome, hyperadrenocorticism and megaesophagus in a dachshund. J Small Anim Pract 48:584-587, 2007.
5. Galac S, Kars VJ, Voorhout G, Mol JA, Kooistra HS. ACTH-independent hyperadrenocorticism due to food-dependent hypercortisolemia in a dog: a case report. Vet J 177:141-143, 2008.
6. Shahani S, Nudelman RJ, Nalini R, Kim HS, Samson SL. Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature. Diagn Pathol 5:56, 2010.
7. Verstraete A, Thoonen J. Twee nieuwe gevallen van hypofysaire stoornissen bij den hond. Vlaams diergeneesk Tijdschr 8:304-314, 1939.
8. Hullinger RL. The endocrine system. In: Anatomy of the dog. Evans HE (Ed.), Saunders, Saint Louis, 1993, p. 559-585.

9. Musumeci G, Castorina S, Castrogiovanni P, Loreto C, Leonardi R, Aiello FC, Magro G, Imbesi R. A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. *Acta Histochem* 117:355-366, 2015.
10. Skowronska D.K., Rosenfeld MG. Development of the pituitary. In: *Endocrinology, adult and pediatric*. Jameson JL (Ed.), Saunders, Saint Louis, 2010, p. 146-164.
11. Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG. Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol* 19:605-611, 2007.
12. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87:933-963, 2007.
13. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295:2231-2235, 2002.
14. Zerbe CA. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Pathophysiology of Hyperadrenocorticism. *Comp Cont Educ Pract* 21:1134-1161, 1999.
15. Behrend EN. Canine hyperadrenocorticism. In: *Canine and Feline Endocrinology*. Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, and Scott-Moncrieff JC (Eds.), Saunders, Saint Louis, 2015, p. 377-451.
16. Stevens A, White A. Adrenocorticotrophic hormone. In: *Endocrinology*. Jameson JL and De Groot LJ (Eds.), Philadelphia, 2010, p. 179-198.

17. kemppainen RJ, Clark TP, Sartin JL, Zerbe CA. Regulation of adrenocorticotropin secretion from cultured canine anterior pituitary cells. *Am J Vet Res* 53:2355-2358, 1992.
18. Pivonello R, Waaijers M, Kros JM, Pivonello C, de AC, Cozzolino A, Colao A, Lamberts SW, Hofland LJ. Dopamine D2 receptor expression in the corticotroph cells of the human normal pituitary gland. *Endocrine* 2016.
19. kemppainen RJ, Sartin JL. In vivo evidence for dopaminergic regulation of the canine pituitary intermediate lobe. *Acta Endocrinol (Copenh)* 113:471-478, 1986.
20. Kooistra HS, Greven SH, Mol JA, Rijnberk A. Pulsatile secretion of alpha-MSH and the differential effects of dexamethasone and haloperidol on the secretion of alpha-MSH and ACTH in dogs. *J Endocrinol* 152:113-121, 1997.
21. Halmi NS, Peterson ME, Colurso GJ, Liotta AS, Krieger DT. Pituitary intermediate lobe in dog: two cell types and high bioactive adrenocorticotropin content. *Science* 211:72-74, 1981.
22. kemppainen RJ, Zerbe CA, Sartin JL. Regulation and secretion of proopiomelanocortin peptides from isolated perfused dog pituitary pars intermedia cells. *Endocrinology* 124:2208-2217, 1989.
23. kemppainen RJ, Sartin JL. In vivo evidence for dopaminergic regulation of the canine pituitary intermediate lobe. *Acta Endocrinol (Copenh)* 113:471-478, 1986.

24. kemppainen RJ, Sartin JL. Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *J Endocrinol* 103:219-226, 1984.
25. Castillo VA, Cabrera Blatter MF, Gomez NV, Sinatra V, Gallelli MF, Ghersevich MC. Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Res Vet Sci* 86:223-229, 2009.
26. Joels M. Functional actions of corticosteroids in the hippocampus. *Eur J Pharmacol* 583:312-321, 2008.
27. Tasker JG, Di S, Malcher-Lopes R. Rapid central corticosteroid effects: evidence for membrane glucocorticoid receptors in the brain. *Integr Comp Biol* 45:665-671, 2005.
28. Bicknell AB. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 20:692-699, 2008.
29. Feldman EC. Distinguishing dogs with functioning adrenocortical tumors from dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 183:195-200, 1983.
30. Puente S. Pituitary carcinoma in an Airedale terrier. *Can Vet J* 44:240-242, 2003.
31. Peterson ME, Krieger DT, Drucker WD, et al. Immunocytochemical study of the hypophysis in 25 dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism. *Acta Endocrinol* 101:15-24, 1982.

32. Kipperman BS, Feldman EC, Dybdal NO, Nelson RW. Pituitary tumor size, neurologic signs, and relation to endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 43 cases (1980-1990). *J Am Vet Med Assoc* 201;762-767, 1992.
33. Auriemma E, Barthez PY, van der Vlugt-Meijer RH, Voorhout G, Meij BP. Computed tomography and low-field magnetic resonance imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 11 cases (2001-2003). *J Am Vet Med Assoc* 235:409-414, 2009.
34. Granger N, De Fornel P, Devauchelle P, Segond S, Delisle F, Rosenberg D. Plasma pro-opiomelanocortin, pro-adrenocorticotropin hormone, and pituitary adenoma size in dogs with Cushing's disease. *J Vet Intern Med* 19:23-28, 2005.
35. Kooistra HS, Voorhout G, Mol JA, Rijnberk A. Correlation between impairment of glucocorticoid feedback and the size of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism. *J Endocrinol* 152:387-394, 1997.
36. Hanson JM, van 't Hoofd MM, Voorhout Geal. Efficacy of transsphenoidal hypophysectomy in treatment of dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* . 2005.

Ref Type: In Press

37. Castillo VA, Gallelli MF. Corticotroph adenoma in the dog: pathogenesis and new therapeutic possibilities. *Res Vet Sci* 88:26-32, 2010.

38. Asa SL, Ezzat S. The cytogenesis and pathogenesis of pituitary adenomas. *Endocr Rev* 19:798-827, 1998.
39. Trouillas J. [Pathology and pathogenesis of pituitary corticotroph adenoma]. *Neurochirurgie* 48:149-162, 2002.
40. Van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Voorhout G, Sprang EP, Mol JA. Corticotropin-releasing hormone and adrenocorticotrophic hormone concentrations in cerebrospinal fluid of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Endocrinology* 131:2659-2662, 1992.
41. Hanson JM, Teske E, Voorhout G, Galac S, Kooistra HS, Meij BP. Prognostic factors for outcome after transsphenoidal hypophysectomy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Neurosurg* 107:830-840, 2007.
42. Ma ZY, Song ZJ, Chen JH, Wang YF, Li SQ, Zhou LF, Mao Y, Li YM, Hu RG, Zhang ZY, Ye HY, Shen M, Shou XF, Li ZQ, Peng H, Wang QZ, Zhou DZ, Qin XL, Ji J, Zheng J, Chen H, Wang Y, Geng DY, Tang WJ, Fu CW, Shi ZF, Zhang YC, Ye Z, He WQ, Zhang QL, Tang QS, Xie R, Shen JW, Wen ZJ, Zhou J, Wang T, Huang S, Qiu HJ, Qiao ND, Zhang Y, Pan L, Bao WM, Liu YC, Huang CX, Shi YY, Zhao Y. Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing's disease. *Cell Res* 25:306-317, 2015.
43. Perez-Rivas LG, Theodoropoulou M, Ferrau F, Nusser C, Kawaguchi K, Stratakis CA, Faucz FR, Wildemberg LE, Assie G, Beschorner R, Dimopoulou C, Buchfelder M, Popovic V, Berr CM, Toth M, Ardisasmita AI, Honegger J, Bertherat J, Gadelha MR, Beuschlein F, Stalla G, Komada M, Korbonits M, Reincke M. The Gene of the

Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 100:E997-1004, 2015.

44. Van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Meij BP, Mol JA. Effects of corticotrophin-releasing hormone, vasopressin and insulin-like growth factor-I on proliferation of and adrenocorticotrophic hormone secretion by canine corticotrophic adenoma cells in vitro. *Eur J Endocrinol* 138:309-315, 1998.
45. Van Wijk PA, Rijnberk A, Croughs RJ, Meij BP, van Leeuwen IS, Sprang EP, Mol JA. Molecular screening for somatic mutations in corticotropic adenomas of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Endocrinol Invest* 20:1-7, 1997.
46. Bosje JT, Rijnberk A, Mol JA, Voorhout G, Kooistra HS. Plasma concentrations of ACTH precursors correlate with pituitary size and resistance to dexamethasone in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Domest Anim Endocrinol* 22:201-210, 2002.
47. Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease. *Domest Anim Endocrinol* 36:3-12, 2009.
48. Drouin J. 60 YEARS OF POMC: Transcriptional and epigenetic regulation of POMC gene expression. *J Mol Endocrinol* 56:T99-T112, 2016.
49. Roussel-Gervais A, Couture C, Langlais D, Takayasu S, Balsalobre A, Rueda BR, Zukerberg LR, Figarella-Branger D, Brue T, Drouin J. The Cables1 Gene in

Glucocorticoid Regulation of Pituitary Corticotrope Growth and Cushing Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 101:513-522, 2016.

50. Hanson JM, Mol JA, Leegwater PA, Bilodeau S, Drouin J, Meij BP. Expression and mutation analysis of Tpit in the canine pituitary gland and corticotroph adenomas. *Domest Anim Endocrinol* 34:217-222, 2008.
51. Hanson JM, Mol JA, Meij BP. Expression of leukemia inhibitory factor and leukemia inhibitory factor receptor in the canine pituitary gland and corticotrope adenomas. *Domest Anim Endocrinol* 38:260-271, 2010.
52. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev* 26:533-544, 2015.
53. Fukuoka H, Cooper O, Ben-Shlomo A, Mamelak A, Ren SG, Bruyette D, Melmed S. EGFR as a therapeutic target for human, canine, and mouse ACTH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Invest* 121:4712-4721, 2011.
54. van Rijn SJ, Grinwis GC, Penning LC, Meij BP. Expression of Ki-67, PCNA, and p27kip1 in canine pituitary corticotroph adenomas. *Domest Anim Endocrinol* 38:244-252, 2010.
55. Ishino H, Hara Y, Takekoshi S, Teshima T, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Ki-67 and minichromosome maintenance-7 (MCM7) expression in canine pituitary corticotroph adenomas. *Domest Anim Endocrinol* 41:207-213, 2011.

56. Orth DN, Kovacs WJ. The adrenal cortex. In: Williams textbook of endocrinology. Wilson JD, Foster DW, and Kronenberg HMLPR (Eds.), W.B. Saunders Compagny, Philadelphia, 1998, p. 517-664.
57. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. Trends Endocrinol Metab 13:200-208, 2002.
58. Ishimura K, Fujita H. Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. Microsc Res Tech 36:445-453, 1997.
59. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. Endocr Rev 25:947-970, 2004.
60. Sanders K, Mol JA, Kooistra HS, Slob A, Galac S. New Insights in the Functional Zonation of the Canine Adrenal Cortex. J Vet Intern Med 30:741-750, 2016.
61. Peterson ME, Orth DN, Halmi NS, Zielinski AC, Davis DR, Chavez FT, Drucker WD. Plasma immunoreactive proopiomelanocortin peptides and cortisol in normal dogs and dogs with Addison's disease and Cushing's syndrome: basal concentrations. Endocrinology 119:720-730, 1986.
62. Rosol T, Gröne A. Endocrine glands. In: Jubb, Kennedy and Palmer's pathology of domestic animals. Maxie MG (Ed.), Saunders Elsevier, St Louis, 2016, p. 270-357.
63. Labelle P, Kyles AE, Farver TB, De Cock HE. Indicators of malignancy of canine adrenocortical tumors: histopathology and proliferation index. Vet Pathol 41:490-497, 2004.

64. Ford SL, Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism caused by bilateral adrenocortical neoplasia in dogs: four cases (1983-1988). *J Am Vet Med Assoc* 202:789-792, 1993.
65. Hoerauf A, Reusch CE. Ultrasonographic characteristics of both adrenal glands in 15 dogs with functional adrenocortical tumors. *J Am Anim Hosp Assoc* 51:193-199, 1999.
66. Anderson CR, Birchard SJ, Powers BE, Belandria GA, Kuntz CA, Withrow SJ. Surgical treatment of adrenocortical tumors: 21 cases (1990-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 37:93-97, 2001.
67. Kyles AE, Feldman EC, De Cock HE, Kass PH, Mathews KG, Hardie EM, Nelson RW, Ilkiw JE, Gregory CR. Surgical management of adrenal gland tumors with and without associated tumor thrombi in dogs: 40 cases (1994-2001). *J Am Vet Med Assoc* 223:654-662, 2003.
68. Adissu HA, Hayes G, Wood GA, Caswell JL. Cardiac myxosarcoma with adrenal adenoma and pituitary hyperplasia resembling Carney complex in a dog. *Vet Pathol* 47:354-357, 2010.
69. Stenske KA, Bemis DA, Hill K, Krahwinkel DJ. Acute polyarthritis and septicemia from *Mycoplasma edwardii* after surgical removal of bilateral adrenal tumors in a dog. *J Vet Intern Med* 19:768-771, 2005.
70. Galac S, Kool MM, Naan EC, Daminet S, Mol JA, Kooistra HS. Expression of the ACTH receptor, steroidogenic acute regulatory protein, and steroidogenic enzymes in

- canine cortisol-secreting adrenocortical tumors. *Domest Anim Endocrinol* 39:259-267, 2010.
71. Kool MM, Galac S, Spandauw CG, Kooistra HS, Mol JA. Activating mutations of GNAS in canine cortisol-secreting adrenocortical tumors. *J Vet Intern Med* 27:1486-1492, 2013.
72. Galac S, Kars VJ, Klarenbeek S, Teerds KJ, Mol JA, Kooistra HS. Expression of receptors for luteinizing hormone, gastric-inhibitory polypeptide, and vasopressin in normal adrenal glands and cortisol-secreting adrenocortical tumors in dogs. *Domest Anim Endocrinol* 39:63-75, 2010.
73. Rosenberg D, de Fornel-Thibaud P, Bencheekroun G. Syndrome de Cushing canin (hypercorticisme spontané). *Encyclopédie vétérinaire* 0700: 2006.
74. O'Neill DG, Scudder C, Faire JM, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC. Epidemiology of hyperadrenocorticism among 210,824 dogs attending primary-care veterinary practices in the UK from 2009 to 2014. *J Small Anim Pract* 57:365-373, 2016.
75. Ling GV, Stabenfeldt GH, Corner KM, Gribble DH, Schechter RD. Canine Hyperadrenocorticism: Pretreatment Clinical and Laboratory Evaluation of 117 cases. *J Am Vet Med Assoc* 174:1211-1215, 1979.
76. Reusch CE, Feldman EC. Canine Hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. *J Vet Intern Med* 5:3-10, 1991.

77. Kintzer PP, Peterson ME. Mitotane (o,p'-DDD) treatment of 200 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 5:182-190, 1991.
78. Kintzer PP, Peterson ME. Mitotane treatment of 32 dogs with cortisol-secreting adrenocortical neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 205:54-61, 1994.
79. Wood FD, Pollard RE, Uerling MR, Feldman EC. Diagnostic imaging findings and endocrine test results in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism that did or did not have neurologic abnormalities: 157 cases (1989-2005). *J Am Vet Med Assoc* 231:1081-1085, 2007.
80. Bellumori TP, Famula TR, Bannasch DL, Belanger JM, Oberbauer AM. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs: 27,254 cases (1995-2010). *J Am Vet Med Assoc* 242:1549-1555, 2013.
81. Reusch CE, Feldman EC. Canine hyperadrenocorticism due to adrenocortical neoplasia. Pretreatment evaluation of 41 dogs. *J Vet Intern Med* 5:3-10, 1991.
82. Behrend EN, Kooistra HS, Nelson R, Reusch CE, Scott-Moncrieff JC. Diagnosis of spontaneous canine hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM consensus statement (small animal). *J Vet Intern Med* 27:1292-1304, 2013.
83. White SD, Ceragiolo KL, Bullock LP, Mason GD, Stewart LJ. Cutaneous Markers of Canine Hyperadrenocorticism. *Comp Cont Educ Pract* 11:446-464, 1989.
84. Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Endocrine and metabolic disease. In: Muller and Kirk's small animal dermatology. Scott DW, Miller WH, and Griffin CE (Eds.), Saunders, Philadelphia, 2001, p. 780-885.

85. Smets PM, Lefebvre HP, Meij BP, Croubels S, Meyer E, Van dM, I, Daminet S. Long-term follow-up of renal function in dogs after treatment for ACTH-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 26:565-574, 2012.
86. Raff H. Glucocorticoid inhibition of neurohypophyseal vasopressin secretion. *Am J Physiol* 252:635, 1987.
87. Hughes D. Polyuria and Polydipsia. *Comp Cont Educ Pract* 14:1161-1175, 1992.
88. Berry CR, Hawkins EC, Hurley KJ, Monce K. Frequency of pulmonary mineralization and hypoxemia in 21 dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 14:151-156, 2000.
89. Dow SW, Olson PN, Rosychuk RA, Withrow SJ. Perianal adenomas and hypertestosteronemia in a spayed bitch with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 192:1439-1441, 1988.
90. Ortega TM, Feldman EC, Nelson RW, Willits N, Cowgill LD. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 209:1724-1729, 1996.
91. Goy-Thollot I, Pechereau D, Keroack S, Dezempte JC, Bonnet JM. Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *J Small Anim Pract* 43:489-492, 2002.
92. Smets PM, Lefebvre HP, Aresu L, Croubels S, Haers H, Piron K, Meyer E, Daminet S. Renal function and morphology in aged Beagle dogs before and after hydrocortisone administration. *PLoS One* 7:e31702, 2012.

93. Forrester SD, Martinez NI, Panciera DL, Moon ML, Pickett CR, Ward DL. Absence of urinary tract infection in dogs with experimentally induced hyperadrenocorticism. *Res Vet Sci* 74:179-182, 2003.
94. Lien YH, Hsiang TY, Huang HP. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary- and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. *Acta Vet Scand* 52:61, 2010.
95. Feldman EC, Nelson RW. Hyperadrenocorticism (Cushing's syndrome). In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Feldman EC (Ed.), WB Saunders, Philadelphia, PA, 2004, p. 252-357.
96. Hess RS, Saunders HM, Van Winkle TJ, Ward CR. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *J Am Vet Med Assoc* 217:1166-1173, 2000.
97. Kaplan AJ, Peterson ME, kemppainen RJ. Effects of disease on the results of diagnostic tests for use in detecting hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 207:445-451, 1995.
98. LaRue MJ, Murtaugh RJ. Pulmonary thromboembolism in dogs: 47 cases (1986-1987). *J Am Vet Med Assoc* 197:1368-1372, 1990.
99. Teshima T, Hara Y, Taoda T, Koyama H, Takahashi K, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Nishida K, Osamura RY, Teramoto A, Tagawa M. Cushing's disease complicated with thrombosis in a dog. *J Vet Med Sci* 70:487-491, 2008.
100. Sobel KE, Williams JE. Pneumothorax secondary to pulmonary thromboembolism in a dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 19:120-126, 2009.

101. Jacoby RC, Owings JT, Ortega TM, Gosselin R, Feldman EC. Biochemical basis for the hypercoagulable state seen in Cushing's syndrome. *Arch Surg* **136**:1007, 2001.
102. Klose TC, Creevy KE, Brainard BM. Evaluation of coagulation status in dogs with naturally occurring canine hyperadrenocorticism. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* **21**:625-632, 2011.
103. Park FM, Blois SL, Abrams-Ogg AC, Wood RD, Allen DG, Nykamp SG, Downie A. Hypercoagulability and ACTH-dependent hyperadrenocorticism in dogs. *J Vet Intern Med* **27**:1136-1142, 2013.
104. Rose L, Dunn ME, Bedard C. Effect of canine hyperadrenocorticism on coagulation parameters. *J Vet Intern Med* **27**:207-211, 2013.
105. Pace SL, Creevy KE, Krimer PM, Brainard BM. Assessment of coagulation and potential biochemical markers for hypercoagulability in canine hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* **27**:1113-1120, 2013.
106. Boswood A, Lamb CR, White RN. Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *J Small Anim Pract* **41**:109-114, 2000.
107. Nelson RW, Ihle SL, Feldman EC. Pituitary macroadenomas and macroadenocarcinomas in dogs treated with mitotane for pituitary-dependent hyperadrenocorticism: 13 cases (1981-1986). *J Am Vet Med Assoc* **194**:1612-1617, 1989.
108. Pike FS, Berg J, King NW, Penninck DG, Webster CR. Gallbladder mucocele in dogs: 30 cases (2000-2002). *J Am Vet Med Assoc* **224**:1615-1622, 2004.

109. Mesich ML, Mayhew PD, Paek M, Holt DE, Brown DC. Gall bladder mucocoeles and their association with endocrinopathies in dogs: a retrospective case-control study. *J Small Anim Pract* 50:630-635, 2009.
110. Gookin JL, Correa MT, Peters A, Malueg A, Mathews KG, Cullen J, Seiler G. Association of Gallbladder Mucocele Histologic Diagnosis with Selected Drug Use in Dogs: A Matched Case-Control Study. *J Vet Intern Med* 29:1464-1472, 2015.
111. Scott DW. Hyperadrenocorticism (hyperadrenocorticoidism, hyperadrenocorticalism, Cushing's disease, Cushing's syndrome). *Vet Clin North Am* 9:3-28, 1979.
112. Sanecki RK, Hoffmann WE, Gelberg HB, Dorner JL. Subcellular location of corticosteroid-induced alkaline phosphatase in canine hepatocytes. *Vet Pathol* 24:296-301, 1987.
113. Peterson ME. Hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 14:731-749, 1984.
114. Schwarz T, Stork CK, Mellor D, Sullivan M. Osteopenia and other radiographic signs in canine hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 41:491-495, 2000.
115. Feldman EC, Mack RE. Urine cortisol:creatinine ratio as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 200:1637-1641, 1992.
116. Rijnberk A, van Wees A, Mol JA. Assessment of two tests for the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Rec* 122:178-180, 1988.

117. Galeandro L, Sieber-Ruckstuhl NS, Riond B, Hartnack S, Hofmann-Lehmann R, Reusch CE, Boretti FS. Urinary corticoid concentrations measured by 5 different immunoassays and gas chromatography-mass spectrometry in healthy dogs and dogs with hypercortisolism at home and in the hospital. *J Vet Intern Med* 28:1433-1441, 2014.
118. Hansen BL, kemppainen RJ, Mc Donald JM. Synthetic ACTH (Cosyntropin) stimulation tests in normal dogs: comparaison of intravenous and intramuscular administration. *J Am Anim Hosp Assoc* 30:38-41, 1994.
119. Norman EJ, Thompson H, Mooney CT. Dynamic adrenal function testing in eight dogs with hyperadrenocorticism associated with adrenocortical neoplasia. *Vet Rec* 144:551-554, 1999.
120. Van Liew CH, Greco DS, Salman MD. Comparison of results of adrenocorticotrophic hormone stimulation and low-dose dexamethasone suppression tests with necropsy findings in dogs: 81 cases (1985-1995). *J Am Vet Med Assoc* 211:322-325, 1997.
121. Garnier F, Benoit E, Virat M, Ochoa R, Delatour P. Adrenal cortical response in clinically normal dogs before and after adaptation to a housing environment. *Lab Anim* 24:40-43, 1990.
122. Prittie JE, Barton LJ, Peterson ME, kemppainen RJ, Herr LG, Fox PR. Pituitary ACTH and adrenocortical secretion in critically ill dogs. *J Am Vet Med Assoc* 220:615-619, 2002.

123. Beerda B, Schilder MB, Janssen NS, Mol JA. The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Horm Behav* 30:272-279, 1996.
124. Beerda B, Schilder MB, Bernadina W, van Hooff JA, de Vries HW, Mol JA. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Physiol Behav* 66:243-254, 1999.
125. Gieger TL, Feldman EC, Wallack ST, Dank G. Lymphoma as a model for chronic illness: effects on adrenocortical function testing. *J Vet Intern Med* 17:154-157, 2003.
126. Chapman PS, Mooney CT, Ede J, Evans H, O'Connor J, Pfeiffer DU, Neiger R. Evaluation of the basal and post-adrenocorticotrophic hormone serum concentrations of 17-hydroxyprogesterone for the diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. *Vet Rec* 153:771-775, 2003.
127. Ristic JM, Ramsey IK, Heath EM, Evans HJ, Herrtage ME. The use of 17-hydroxyprogesterone in the diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 16:433-439, 2002.
128. Syme HM, Scott-Moncrieff JC, Treadwell NG, Thompson MF, Snyder PW, White MR, Oliver JW. Hyperadrenocorticism associated with excessive sex hormone production by an adrenocortical tumor in two dogs. *J Am Vet Med Assoc* 219:1725-1728, 2001.

129. Hill KE, Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Glickman LT, Glickman NW, Nelson RW, Blevins WE, Oliver JW. Secretion of sex hormones in dogs with adrenal dysfunction. *J Am Vet Med Assoc* 226:556-561, 2005.
130. Monroe WE, Panciera DL, Zimmerman KL. Concentrations of noncortisol adrenal steroids in response to ACTH in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism, pituitary-dependent hyperadrenocorticism, and nonadrenal illness. *J Vet Intern Med* 26:945-952, 2012.
131. Behrend EN, kemppainen RJ, Clark TP, Salman MD, Peterson ME. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs: a survey of internists and dermatologists. *J Am Vet Med Assoc* 220:1643-1649, 2002.
132. Feldman EC, Nelson RW, Feldman MS. Use of low- and high-dose dexamethasone tests for distinguishing pituitary-dependent from adrenal tumor hyperadrenocorticism in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 209:772-775, 1996.
133. kemppainen RJ, Zenoble RD. Non-dexamethasone-suppressible, pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 187:276-278, 1985.
134. Bugbee AC, Smith JR, Ward CR. Effect of dexamethasone or synthetic ACTH administration on endogenous ACTH concentrations in healthy dogs. *Am J Vet Res* 74:1415-1420, 2013.
135. kemppainen RJ, Clark TP, Peterson ME. Preservative effect of aprotinin on canine plasma immunoreactive adrenocorticotropin concentrations. *Domest Anim Endocrinol* 11:355-362, 1994.

136. Scott-Moncrieff JC, Koshko MA, Brown JA, Refsal KR. Validation of a chemiluminescent enzyme immunometric assay for plasma adrenocorticotrophic hormone in the dog. *Vet Clin Pathol* 32:180-187, 2003.
137. Gould SM, Baines EA, Mannion PA, Evans H, Herrtage ME. Use of endogenous ACTH concentration and adrenal ultrasonography to distinguish the cause of canine hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 42:113-121, 2001.
138. Behrend EN, Kemppainen RJ. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31:985-1003, viii, 2001.
139. Barthez PY, Nyland TG, Feldman EC. Ultrasonographic evaluation of the adrenal glands in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 207:1180-1183, 1995.
140. Grooters AM, Biller DS, Theisen SK, Miyabayashi T. Ultrasonographic characteristics of the adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism: comparison with normal dogs. *J Vet Intern Med* 10:110-115, 1996.
141. van der Vlugt-Meijer RH, Meij BP, van den Ingh TS, Rijnberk A, Voorhout G. Dynamic computed tomography of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 17:773-780, 2003.
142. Voorhout G, Stolp R, Lubberink AA, van Waes PF. Computed tomography in the diagnosis of canine hyperadrenocorticism not suppressible by dexamethasone. *J Am Vet Med Assoc* 192:641-646, 1988.

143. Bertolini G, Furlanello T, Drigo M, Caldin M. Computed tomographic adrenal gland quantification in canine adrenocorticotroph hormone-dependent hyperadrenocorticism. *Vet Radiol Ultrasound* 49:449-453, 2008.
144. Bertolini G, Furlanello T, De LD, Caldin M. Computed tomographic quantification of canine adrenal gland volume and attenuation. *Vet Radiol Ultrasound* 47:444-448, 2006.
145. Emms SG, Wortman JA, Johnston DE, Goldschmidt MH. Evaluation of canine hyperadrenocorticism, using computed tomography. *J Am Vet Med Assoc* 189:432-439, 1986.
146. Morandi F, Mays JL, Newman SJ, Adams WH. Imaging diagnosis--bilateral adrenal adenomas and myelolipomas in a dog. *Vet Radiol Ultrasound* 48:246-249, 2007.
147. Nelson AA, Woodard G. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2 bis (parachlorophenyl) 1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Arch Pathol* 48:337-410, 1949.
148. Schechter RD, Stabenfeldt GH, Gribble DH, Ling GV. Treatment of Cushing's syndrome in the dog with an adrenocorticolytic agent (o,p'DDD). *J Am Vet Med Assoc* 162:629-639, 1973.
149. Behrend EN, kemppainen RJ, Clark TP, Salman MD, Peterson ME. Treatment of hyperadrenocorticism in dogs: a survey of internists and dermatologists. *J Am Vet Med Assoc* 215:938-943, 1999.

150. Bricaire H, Luton JP. Cushing's syndrome. Medical treatment of adrenal hypercorticism. *Horm Res* 13:317-324, 1980.
151. Dewis P, Anderson DC, Bu'lock DE, Earnshaw R, Kelly WF. Experience with trilostane in the treatment of Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 18:533-540, 1983.
152. Semple CG, Beastall GH, Gray CE, Thomson JA. Trilostane in the management of Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh)* 102:107-110, 1983.
153. Chapman PS, Kelly DF, Archer J, Brockman DJ, Neiger R. Adrenal necrosis in a dog receiving trilostane for the treatment of hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 45:307-310, 2004.
154. Neiger R, Ramsey I, O'Connor J, Hurley KJ, Mooney CT. Trilostane treatment of 78 dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism. *Vet Rec* 150:799-804, 2002.
155. Ruckstuhl NS, Nett CS, Reusch CE. Results of clinical examinations, laboratory tests, and ultrasonography in dogs with pituitary-dependant hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Am J Vet Res* 63:506-512, 2002.
156. Wenger M, Sieber-Ruckstuhl NS, Muller C, Reusch CE. Effect of trilostane on serum concentrations of aldosterone, cortisol, and potassium in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Am J Vet Res* 65:1245-1250, 2004.
157. Vaughan MA, Feldman EC, Hoar BR, Nelson RW. Evaluation of twice-daily, low-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 232:1321-1328, 2008.

158. Alenza DP, Arenas C, Lopez ML, Melian C. Long-term efficacy of trilostane administered twice daily in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Anim Hosp Assoc* 42:269-276, 2006.
159. Cho KD, Kang JH, Chang D, Na KJ, Yang MP. Efficacy of low- and high-dose trilostane treatment in dogs (< 5 kg) with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med* 27:91-98, 2013.
160. Feldman EC. Evaluation of twice-daily lower-dose trilostane treatment administered orally in dogs with naturally occurring hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 238:1441-1451, 2011.
161. Braddock JA, Church DB, Robertson ID, Watson AD. Trilostane treatment in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Aust Vet J* 81:600-607, 2003.
162. Clemente M, De Andres PJ, Arenas C, Melian C, Morales M, Perez-Alenza MD. Comparison of non-selective adrenocorticolysis with mitotane or trilostane for the treatment of dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Vet Rec* 161:805-809, 2007.
163. Galac S, Buijtels JJ, Kooistra HS. Urinary corticoid: creatinine ratios in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism during trilostane treatment. *J Vet Intern Med* 23:1214-1219, 2009.
164. Meij BP, Voorhout G, van den Ingh TSGAM, Hazewinkel HAW, Teske E, Rijnberk A. Results of transphenoidal hypophysectomy in 52 dogs with pituitary dependant hyperadrenocorticism. *Vet Surg* 27:246-261, 1998.

165. Sarfaty D, Carrillo JM, Peterson ME. Neurologic, endocrinologic, and pathologic findings associated with large pituitary tumors in dogs: eight cases (1976-1984). *J Am Vet Med Assoc* 193:854-856, 1988.
166. Goossens MM, Feldman EC, Theon AP, Koblik PD. Efficacy of cobalt 60 radiotherapy in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 212:374-376, 1998.
167. Kent MS, Bommarito D, Feldman E, Theon AP. Survival, neurologic response, and prognostic factors in dogs with pituitary masses treated with radiation therapy and untreated dogs. *J Vet Intern Med* 21:1027-1033, 2007.
168. Theon AP, Feldman EC. Megavoltage irradiation of pituitary macrotumors in dogs with neurologic signs. *J Am Vet Med Assoc* 213:225-231, 1998.
169. De Fornel P, Delisle F, Devauchelle P, Rosenberg D. Effects of radiotherapy on pituitary corticotroph macrotumors in dogs: a retrospective study of 12 cases. *Can Vet J* 48:481-486, 2007.
170. Dow SW, LeCouteur RA, Rosychuk RAW, Powers BE, kemppainen RJ, Gilette EL. Response of dogs with functional pituitary macroadenomas and macrocarcinomas to radiation. *J Small Anim pract* 31:287-294, 1990.
171. Barrera JS, Bernard F, Ehrhart EJ, Withrow SJ, Monnet E. Evaluation of risk factors for outcome associated with adrenal gland tumors with or without invasion of the caudal vena cava and treated via adrenalectomy in dogs: 86 cases (1993-2009). *J Am Vet Med Assoc* 242:1715-1721, 2013.

172. Schwartz P, Kovak JR, Koprowski A, Ludwig LL, Monette S, Bergman PJ. Evaluation of prognostic factors in the surgical treatment of adrenal gland tumors in dogs: 41 cases (1999-2005). *J Am Vet Med Assoc* 232:77-84, 2008.
173. Lang JM, Schertel E, Kennedy S, Wilson D, Barnhart M, Danielson B. Elective and emergency surgical management of adrenal gland tumors: 60 cases (1999-2006). *J Am Anim Hosp Assoc* 47:428-435, 2011.
174. Massari F, Nicoli S, Romanelli G, Buracco P, Zini E. Adrenalectomy in dogs with adrenal gland tumors: 52 cases (2002-2008). *J Am Vet Med Assoc* 239:216-221, 2011.
175. Axlund TW, Behrend EN, Winkler JT. Surgical treatment of canine hyperadrenocorticism. *Comp Cont Educ Pract* 25:334-347, 2003.
176. Helm JR, McLauchlan G, Boden LA, Frowde PE, Collings AJ, Tebb AJ, Elwood CM, Herrtage ME, Parkin TD, Ramsey IK. A comparison of factors that influence survival in dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism treated with mitotane or trilostane. *J Vet Intern Med* 25:251-260, 2011.
177. Benckekroun G, de Fornel-Thibaud P, Lafarge S, Gomez E, Begon D, Delisle F, Moraillon R, Heripret D, Maurey C, Rosenberg D. Trilostane therapy for hyperadrenocorticism in three dogs with adrenocortical metastasis. *Vet Rec* 163:190-192, 2008.
178. Arenas C, Melian C, Perez-Alenza MD. Long-term survival of dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism: a comparison between mitotane and twice daily trilostane treatment. *J Vet Intern Med* 28:473-480, 2014.

179. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, . Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 322:1195-1201, 1990.
180. Feldman EC. Hyperadrenocorticism in cats. In: *Canine and Feline Endocrinology*. Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, and Scott-Moncrieff JC (Eds.), Saunders, Saint Louis, 2015, p. 452-484.
181. Watson PJ, Herrtage ME. Hyperadrenocorticism in six cats. *J Small Anim Pract* 39:175-184, 1998.
182. Valentin SY, Cortright CC, Nelson RW, Pressler BM, Rosenberg D, Moore GE, Scott-Moncrieff JC. Clinical findings, diagnostic test results, and treatment outcome in cats with spontaneous hyperadrenocorticism: 30 cases. *J Vet Intern Med* 28:481-487, 2014.
183. Daniel G, Mahony OM, Markovich JE, Appleman E, Monaghan KN, Lawrence YA, Fiocchi EH, Weaver K, Johnston A, Barton B. Clinical findings, diagnostics and outcome in 33 cats with adrenal neoplasia (2002-2013). *J Feline Med Surg* 2015.
184. Boord M, Griffin C. Progesterone secreting adrenal mass in a cat with clinical signs of hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc* 214:666-669, 1999.
185. Fracassi F, Mandrioli L, Diana A, Hilbe M, Grinwis G, Gandini G. Pituitary macroadenoma in a cat with diabetes mellitus, hypercortisolism and neurological signs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54:359-363, 2007.

186. Lien YH, Huang HP, Chang PH. Iatrogenic hyperadrenocorticism in 12 cats. *J Am Anim Hosp Assoc* 42:414-423, 2006.
187. Brown AL, Beatty JA, Lindsay SA, Barrs VR. Severe systemic hypertension in a cat with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Small Anim Pract* 53:132-135, 2012.
188. de Lange MS, Galac S, Trip MR, Kooistra HS. High urinary corticoid/creatinine ratios in cats with hyperthyroidism. *J Vet Intern Med* 18:152-155, 2004.
189. Peterson ME, Graves TK. Effects of low dosages of intravenous dexamethasone on serum cortisol concentrations in the normal cat. *Res Vet Sci* 44:38-40, 1988.
190. Chiaramonte D, Greco DS. Feline adrenal disorders. *Clin Tech Small Anim Pract* 22:26-31, 2007.
191. Meij BP, Voorhout G, van den Ingh TS, Rijnberk A. Transsphenoidal hypophysectomy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in 7 cats. *Vet Surg* 30:72-86, 2001.
192. Skelly BJ, Petrus D, Nicholls PK. Use of trilostane for the treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in a cat. *J Small Anim Pract* 44:269-272, 2003.
193. Neiger R, Witt AL, Noble A, German AJ. Trilostane therapy for treatment of pituitary-dependent hyperadrenocorticism in 5 cats. *J Vet Intern Med* 18:160-164, 2004.
194. Mellett Keith AM, Bruyette D, Stanley S. Trilostane therapy for treatment of spontaneous hyperadrenocorticism in cats: 15 cases (2004-2012). *J Vet Intern Med* 27:1471-1477, 2013.

195. Duesberg CA, Nelson RW, Feldman EC, Vaden SL, Scott-Moncrieff CR. Adrenalectomy for treatment of hyperadrenocorticism in cats: 10 cases (1988-1992). *J Am Vet Med Assoc* 207:1066-1070, 1995.
196. Lacroix A, Felders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet* 386:913-927, 2015.
197. Gibson S, Ray DW, Crosby SR, Dornan TL, Jennings AM, Bevan JS, Davis JR, White A. Impaired processing of proopiomelanocortin in corticotroph macroadenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 81:497-502, 1996.
198. Zeugswetter F, Pagitz M, Hittmair K, Schwendenwein I. Diagnostic efficacy of plasma ACTH-measurement by a chemiluminometric assay in canine hyperadrenocorticism. *Schweiz Arch Tierheilkd* 153:111-116, 2011.
199. de Fornel-Thibaud P, Granger N, Rosenberg D. Effect of aprotinin, centrifugation and storage temperatures on stability of canine plasma adrenocorticotrophic hormone precursors prior to analysis. *J Vet Intern Med* 19[3], 423. 2005.

Ref Type: Abstract

200. Page-Wilson G, Freda PU, Jacobs TP, Khandji AG, Bruce JN, Foo ST, Meece K, White A, Wardlaw SL. Clinical utility of plasma POMC and AgRP measurements in the differential diagnosis of ACTH-dependent Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 99:E1838-E1845, 2014.

201. Mantis P, Lamb CR, Witt AL, Neiger R. Changes in ultrasonographic appearance of adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism treated with trilostane. *Vet Radiol Ultrasound* 44:682-685, 2003.
202. Horauf A, Reusch C. [Effects of mitotane therapy in dogs with pituitary dependent Cushing syndrome on the adrenal gland size--an ultrasonographic study]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 141:239-245, 1999.
203. de Chalus T., Combes A, Bedu AS, Pey P, Daminet S, Duchateau L, Saunders JH. Ultrasonographic adrenal gland measurements in healthy Yorkshire Terriers and Labrador Retrievers. *Anat Histol Embryol* 42:57-64, 2013.
204. Haers H, Saunders JH. Review of clinical characteristics and applications of contrast-enhanced ultrasonography in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 234:460-70, 430, 2009.
205. Pey P, Vignoli M, Haers H, Duchateau L, Rossi F, Saunders JH. Contrast-enhanced ultrasonography of the normal canine adrenal gland. *Vet Radiol Ultrasound* 52:560-567, 2011.
206. Pey P, Daminet S, Smets PM, Duchateau L, de Fornel-Thibaud P, Rosenberg D, Saunders JC. Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of adrenal glands in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *Am J Vet Res* 74:417-425, 2013.
207. Pey P, Rossi F, Vignoli M, Duchateau L, Marescaux L, Saunders JH. Use of contrast-enhanced ultrasonography to characterize adrenal gland tumors in dogs. *Am J Vet Res* 75:886-892, 2014.

208. Bonneville JF, Cattin F, Moussa-Bacha K, Portha C. Dynamic computed tomography of the pituitary gland: the "tuft sign". *Radiology* 149:145-148, 1983.
209. Lindsay JR, Nieman LK. Differential diagnosis and imaging in Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 34:403-421, 2005.
210. Del MS, Grinwis GC, Voorhout G, Meij BP. Dynamic computed tomography of the pituitary gland using a single slice scanner in dogs with pituitary-dependent hypercortisolism. *Res Vet Sci* 107:42-49, 2016.
211. Gregori T, Mantis P, Benigni L, Priestnall SL, Lamb CR. Comparison of computed tomographic and pathologic findings in 17 dogs with primary adrenal neoplasia. *Vet Radiol Ultrasound* 56:153-159, 2015.
212. Blake MA, Cronin CG, Boland GW. Adrenal imaging. *AJR Am J Roentgenol* 194:1450-1460, 2010.
213. Blaser A, Dennler M, Mosing M, Gent TC, Santner G, Imhasly S, Boretti FS, Reusch CE, Kircher P, Sieber-Ruckstuhl NS. Effects of contrast medium injection technique on attenuation values of adrenal glands in healthy dogs during contrast-enhanced computed tomography. *Am J Vet Res* 77:144-150, 2016.
214. Stewart PM, Gibson S, Crosby SR, Penn R, Holder R, Ferry D, Thatcher N, Phillips P, London DR, White A. ACTH precursors characterize the ectopic ACTH syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 40:199-204, 1994.

215. Raffin-Sanson ML, Massias JF, Dumont C, Raux-Demay MC, Proeschel MF, Luton JP, Bertagna X. High plasma proopiomelanocortin in aggressive adrenocorticotropin-secreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4272-4277, 1996.
216. Tateno T, Izumiyama H, Doi M, Akashi T, Ohno K, Hirata Y. Defective expression of prohormone convertase 1/3 in silent corticotroph adenoma. *Endocr J* 54:777-782, 2007.
217. Iino K, Oki Y, Matsushita F, Yamashita M, Hayashi C, Miura K, Nishizawa S, Nakamura H. Immunohistochemical properties of silent corticotroph adenoma and Cushing's disease. *Pituitary* 10:35-45, 2007.