

**Impact du syndrome de Cushing sur les graisses ectopiques et la
fonction ventriculaire gauche.**

Introduction

La corticothérapie au long cours est associée à une augmentation des événements cardio-vasculaires (1), elle induit une accumulation de graisse viscérale, des anomalies des métabolismes glucidique et lipidique, une hypertension artérielle et des troubles de la coagulation. Le Syndrome de Cushing (SC) résulte d'une exposition chronique à un excès de cortisol qui peut être induit soit par la prise exogène d'un traitement par glucocorticoïdes soit par une production endogène de cortisol (2). Le SC endogène est un bon modèle clinique pour étudier l'impact au niveau cardiaque et au niveau des tissus adipeux de l'excès de cortisol. Le SC est responsable d'une augmentation de la mortalité avec plus d'événements cardio-vasculaires : dans une étude de cohorte (3) les patients atteints de SC avaient une augmentation du risque d'infarctus du myocarde (Hazard ratio à 3,7) et d'insuffisance cardiaque (hazard ratio à 6,0) dans l'année suivant le diagnostic. Plusieurs études ont montré que les patients en rémission d'un SC ont un risque cardio-vasculaire qui reste plus élevé : une récente étude multicentrique rétrospective a trouvé un ratio de mortalité standardisé de 2,7 pour les maladies vasculaires chez des patients en rémission depuis plus de 10 ans (4), d'autres études ont montré une persistance des anomalies métaboliques même après 5 ans de rémission (5-7). Jusqu'à ce jour l'impact du SC sur la structure cardiaque et la fonction du ventricule gauche (VG) a été peu étudié en dehors de la cardiomyopathie dilatée et l'insuffisance cardiaque congestive. De plus, les données d'études en échographie ou en imagerie par résonance magnétique (IRM) sur la structure et la fonction cardiaque après rémission sont discordantes (8-10).

Il a été montré que la distribution de la masse grasse pour un indice de masse corporelle (IMC) donné est un marqueur d'insulino-résistance, de diabète de type 2 et d'événements cardiovasculaires à venir. L'incapacité du tissu adipeux sous-cutané à s'expandre de manière illimitée et à recruter de nouveaux adipocytes induit une accumulation de graisse dans des sites dits ectopiques (11,12). La graisse ectopique correspond à un stockage excessif de triglycérides dans des cellules non adipeuses (stéatose) et au développement de tissus adipeux particuliers comme le tissu adipeux viscéral (TAV) au niveau abdominal ou le tissu adipeux épicaudique (TAE) autour du cœur. Les dépôts de graisse ectopique peuvent être étudiés en globalité par des techniques d'imagerie volumétriques en 3 dimensions comme l'imagerie de résonance magnétique (IRM) 3 Tesla et la spectroscopie proton ($^1\text{H-MRS}$) (13,14). Les études suggèrent que l'adiposité cardiaque incluant le TAE et la stéatose myocardique (dépôts lipidiques dans les cellules myocardiques) est augmentée dans le diabète de type 2 et est associée à une augmentation de la masse et du travail du VG, un amincissement de la paroi septale et une

dysfonction diastolique (13, 15-17). De plus le TAE est un important facteur de risque de coronaropathie (18). La stéatose hépatique est étroitement liée à l'insulino-résistance et il a été suggéré qu'elle pouvait contribuer au moins en partie à la dysfonction cardiaque (19,20). Le SC est associé à une répartition facio-tronculaire de la graisse et une obésité centrale. Mais son impact sur le développement de dépôts de graisse ectopique n'est pas connu.

Nous faisons l'hypothèse que l'excès en glucocorticoïdes (GC) est responsable d'une accumulation de graisse ectopique.

Nous avons donc étudié la graisse ectopique et la fonction cardiaque grâce à l'IRM et la ¹H-MRS chez des patients atteints de SC ACTH-dépendant, des patients en rémission de SC ACTH-dépendant depuis au moins 2 ans, des témoins appariés sur l'âge et le sexe et des patients diabétiques de type 2 appariés pour le TAV.

Méthodes

Population

Les patients avec un SC ACTH-dépendant ont été recrutés entre Décembre 2014 et Juin 2017 dans les services d'endocrinologie et de neuro-chirurgie de l'APHM. Le groupe actif était composé de patients nouvellement diagnostiqués ou non contrôlés malgré plusieurs traitements. Le groupe en rémission comprenait des patients en rémission depuis au moins 2 ans et pas plus de 6 ans quelque soit le traitement réalisé. Les critères d'exclusion étaient : sujet mineur, femme enceinte ou allaitante, contre-indication à l'IRM.

Le SC ACTH-dépendant était diagnostiqué en accord avec les critères clinico-biologiques habituels incluant : 1) Augmentation du cortisol libre urinaire des 24 heures à 2 reprises ; 2) Augmentation des niveaux de cortisol plasmatique avec rupture du cycle nyctéméral et niveaux d'ACTH plasmatique inadaptés non freinés ; 3) Absence de freinage du cortisol après freinage faible par dexaméthasone (0,5mg toutes les 6h pendant 48 heures). Les patients étaient considérés en rémission après traitement s'ils présentaient une insuffisance surrénalienne secondaire (cortisol plasmatique bas le matin après 24 heures de sevrage en hydrocortisone) ou un axe corticotrope normalisé avec : 1) cortisol libre urinaire des 24 heures en dessous ou dans les valeurs normales au moins à 2 reprises ; 2) Niveaux de cortisol plasmatique en-dessous ou dans les valeurs normales avec restauration du cycle nyctéméral et niveaux d'ACTH plasmatique appropriés ; 3) Freinage du cortisol après freinage minute par dexaméthasone (1mg à minuit) ou s'ils étaient contrôlés par un traitement anti-cortisolique avec un cortisol libre

urinaire des 24h en-dessous ou dans les valeurs normales à chaque contrôle au cours du suivi depuis au moins 2 ans.

Les sujets contrôles étaient recrutés par annonce et appariés pour l'âge et le sexe avec le groupe actif. Ils devaient fournir un bilan biologique datant de moins d'un an avec au moins la glycémie à jeun et le profil lipidique. Sinon ils devaient le réaliser pour être inclus. Les critères d'exclusion étaient : sujet mineur, femme enceinte ou allaitante, contre-indication à l'IRM, traitement actuel ou passé prolongé par glucocorticoïdes, antécédents personnels ou familiaux de pathologies cardiovasculaires, un ou plusieurs critères du syndrome métabolique (NCEP-ATP-III) (21) ou un IMC supérieur à 25 kg/m².

Tous les patients et les volontaires avaient donné leur consentement écrit et le protocole de l'étude a été approuvée par les comités d'éthique local (Marseille, Comité de Protection des Personnes, Sud- Méditerranée II: identification 2014-A01302-45 and 2016-A00026-45, identification des essais cliniques: NCT02335996 and NCT02848703).

Des patients diabétiques de type 2 inclus précédemment par l'équipe dans une étude en IRM (identification: 2010-022792-57) (22) de même TAV que les patients avec un SC actif étaient aussi étudiés.

Evaluation biologique

Le cortisol libre urinaire des 24h était quantifié en utilisant un kit de dosage radio-immunologique spécifique (référence: IM1841, Beckman Coulter Diagnostics France). Les niveaux de cortisol et d'ACTH plasmatiques étaient mesurés par immunodosage électrochimiluminescent (Roche Diagnostics France). Un bilan sanguin à jeun comprenant glycémie, insulïnémie, cholestérol, hémoglobine glyquée (HbA_{1c}), fibrinogène, protéine C-réactive, ferritine, acide urique et enzymes hépatiques était réalisé chez les patients le jour de l'inclusion. Il était aussi réalisé une hyperglycémie provoquée orale avec mesures répétées de la glycémie plasmatique et de l'insulïnémie. L'HOMA IR et l'index de disposition orale étaient calculés.

Imagerie par résonance magnétique

L'examen d'IRM était réalisé sur un imageur 3 Tesla (Magnetom Verio, Siemens Healthineers, Erlangen, Allemagne) équipé de deux antennes de 32 canaux. Les sujets étaient placés sur le dos, tête en premier.

Mesure des compartiments abdominaux de tissu adipeux : Une séquence 3D Dixon 3points était utilisée pour acquérir le signal de la graisse ou de l'eau dans un volume allant de la vertèbre L4

au sacrum. Les surfaces des compartiments de tissus abdominaux étaient mesurées de manière semi-automatique sur une seule coupe positionnée au niveau de l'interdisque L4-L5 en utilisant un logiciel développé au laboratoire sous IDL (Interactive Data Language) (24). Le fascia séparant le tissu adipeux sous-cutané superficiel du profond était tracé manuellement. La surface du tissu adipeux sous-cutané total (TASCT) était calculée en additionnant la surface du tissu adipeux sous-cutané superficiel (TASCs) et la surface du tissu adipeux sous-cutané profond (TASCp).

Spectroscopie proton par résonance magnétique : La spectroscopie du cœur et du foie était réalisée avec une technique mono-voxel positionnée sur les images d'une séquence multi-coupes FLASH (taille de voxel : $7 \times 19 \times 19 \text{ mm}^3$ localisée au niveau du septum [cœur], $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ localisée au niveau du dôme [foie]) et une séquence réalisée en apnée synchronisée sur l'électrocardiogramme de type PRESS (point-resolved single-voxel proton spectroscopy sequence). Echo time= 35 ms, temps de répétition=340 ms pour le cœur, 1000 ms pour le foie, nombre d'excitations= 16, largeur de bande= 2000 Hz. Le contenu en triglycérides était quantifié comme précédemment décrit (22,25). Des spectres à 1 excitation étaient aussi réalisés pour servir de référence pour la correction de saturation. Les spectres étaient analysés en utilisant un logiciel développé au laboratoire sous IDL (Exelis Visual Information Solutions, Inc., Boulder, Colorado, USA) comme précédemment décrit (13). Les contenus en triglycérides intra-myocardique (CTGM) et intra-hépatique (CTGH) étaient déterminés en quantifiant pour chaque spectre le pic de résonance et en exprimant le résultat par un pourcentage (%triglycéride= triglycéride/eau x100).

Etude cardiaque : Les images nécessaires pour mesurer le volume du VG, du TAE et la surface de l'oreillette gauche étaient acquises en utilisant une séquence ciné de type SSFP (multislice steady-state free precession), pour la fonction diastolique du VG une séquence de codage de flux a été utilisé. Les images étaient analysées avec un logiciel de post-traitement (Argus, Siemens Medical Solutions). Le volume de TAE était mesuré manuellement comme précédemment décrit (25) par le même opérateur avec une bonne reproductibilité intra et inter-individuelle (coefficient de variation respectivement de 3,1% et 5,7%). Le TAE était remesuré pour tous les patients diabétiques pour assurer une bonne reproductibilité.

Analyses statistiques

Les statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (v 7.01). Les résultats quantitatifs sont exprimées en moyenne \pm SEM (standard error of mean) ou en médiane [25^{ème}, 75^{ème} percentile] en cas de distribution non paramétrique. Les résultats qualitatifs sont exprimés

en nombres et pourcentages. Une valeur de p inférieure à 5% a été considérée comme statistiquement significative. Les comparaisons des variables qualitatives ont été effectuées par le test de Fischer. Les comparaisons des variables quantitatives de distribution normale ont été effectuées par le t-test de Student et celles des variables non normales par le test de Mann-Whitney. L'ajustement pour le BMI a été réalisé avec JASPR. Un coefficient de corrélation de Pearson (variables paramétriques) ou de Spearman (variables non paramétriques) a été utilisé pour étudier les corrélations entre les dépôts de graisse ectopique et les données anthropométriques, biologiques et de structure et fonction cardiaque. Des analyses multivariées incluant l'âge, le sexe, l'IMC, les lipides, tension artérielle, la glycémie à jeun et les dépôts de graisse ectopique étaient réalisées pour mieux comprendre les liens avec la masse du VG et le rapport masse du VG sur volume en fin de diastole en utilisant Stat view (v 5.0).

Résultats

Caractéristiques cliniques

21 patients ont été inclus dans le groupe actif mais seulement 19 ont complétés l'étude (17 maladies de Cushing, 2 pathologies ectopiques), de la même manière 19 patients du groupe en rémission (17 maladies de Cushing, 2 pathologies ectopiques) ont complété l'étude (Figure 1). Dans le même temps 19 sujets contrôles ont été inclus. Leurs caractéristiques cliniques sont détaillées dans le tableau 1. Les 3 groupes ne différaient pas en âge et en sexe, les sujets avaient un âge moyen de $49,8 \pm 3,4$, $49,1 \pm 2,9$ et $48,9 \pm 2,5$ ans respectivement dans les groupes actif, en rémission et contrôle (p=NS). Les patients du groupe actif et en rémission ne différaient pas pour la durée de maladie non contrôlée et avaient des niveaux d'ACTH et de cortisol plasmatiques à minuit, de cortisol libre urinaire des 24h et d'IMC au diagnostic comparables. Dans le groupe en rémission, la durée moyenne de rémission était de $41,2 \pm 4,2$ mois. Quatorze patients (73,7%) avaient une insuffisance corticotrope au moment de l'IRM avec une supplémentation moyenne par hydrocortisone de $26,1 \pm 1,3$ mg/jour.

Les patients actifs avaient plus d'hypertension artérielle traitée que les patients du groupe en rémission (p=0,022).

Quatorze patients du groupe actif ont pu être appariés pour le TAV avec des patients diabétiques de type 2. Leurs caractéristiques cliniques sont détaillées dans le tableau 2. Les 2 groupes ne différaient pas pour le sexe ni l'âge mais les patients diabétiques avaient un IMC plus élevé ($34,6 \pm 1,7$ kg/m² versus $27,8 \pm 1,0$ kg/m² p<0,001).

Métabolisme glucidique et lipidique et inflammation

Les caractéristiques biologiques sont détaillées dans le tableau 1. Comme attendu les patients actifs présentaient des désordres du métabolisme glucidique et 50% étaient diabétiques : ils avaient des niveaux de glycémie plus élevés que les patients en rémission et les sujets contrôles (respectivement $p < 0,001$ et $p = 0,015$), un HOMA IR plus élevé ($p = 0,035$), un index de disposition orale plus bas au cours du test de tolérance au glucose. Les patients actifs avaient aussi des désordres lipidiques avec des niveaux de triglycérides plus élevés que les contrôles ($p = 0,002$).

Répartition du tissu adipeux abdominal

Les résultats sont présentés dans le Tableau 1. Les patients actifs avaient une accumulation de TAV (figure 2) en comparaison avec les sujets contrôles ($146,6 \pm 14,9 \text{ cm}^2$ versus $61,5 \pm 5,8 \text{ cm}^2$ $p < 0,001$) et présentaient une distribution néfaste du tissu adipeux abdominal avec des rapports TAV/TASCT et TASCp/TASCs élevés que les sujets contrôles. Les patients en rémission avaient une surface de TAV plus élevée que les sujets contrôles ($99,4 \pm 11,4 \text{ cm}^2$ $p = 0,012$) malgré une amélioration par rapport aux patients actifs ($p = 0,018$).

Quand on comparait les patients actifs avec les patients diabétiques (Figure 2) une distribution plus néfaste de la graisse abdominale avec un rapport TAV/TASCs plus élevé (Tableau 2) était observé dans le groupe actif (respectivement $1,53 \pm 0,23$ versus $0,79 \pm 0,09$ $p = 0,006$).

Dépôts de graisse ectopique

Une augmentation de la graisse ectopique (Figure 2) était retrouvée chez les patients actifs en comparaison avec les sujets contrôles avec un volume de TAE ($93 \pm 6 \text{ mL}$ versus $55 \pm 4 \text{ mL}$ $p < 0,001$), un CTGM ($0,81 \pm 0,17\%$ versus $0,55 \pm 0,14\%$ $p = 0,046$) et un CTGH ($7,99 \pm 1,83\%$ versus $2,83 \pm 0,73\%$ $p = 0,006$) plus élevé. Les patients en rémission présentaient toujours un volume de TAE plus élevé que les sujets contrôles ($68 \pm 5 \text{ ml}$ $p = 0,044$), le CTGM et le CTGH par contre n'étaient pas statistiquement différents des niveaux des sujets contrôles.

Quand on les comparait aux patients diabétiques (Figure 2) les patients du groupe actif avaient un volume de TAE significativement plus élevé ($100 \pm 7 \text{ mL}$ versus $75 \pm 5 \text{ mL}$ $p = 0,008$) alors que les stéatoses étaient plus basses : CTGM $0,63 \pm 0,10\%$ versus $2,51 \pm 0,49\%$ $p < 0,001$ and CTGH $9,74 \pm 2,30\%$ versus $22,28 \pm 4,11\%$ $p = 0,008$. Le pourcentage de stéatose hépatique était de 53% dans le groupe actif contre 93% dans le groupe diabétiques.

Structure et fonction cardiaque

Les patients actifs présentaient des anomalies de la structure et de la fonction du VG en comparaison avec les sujets contrôles (Tableau 3): ils présentaient une hypertrophie du VG avec une masse indexée du VG plus élevée ($55,3 \pm 2,6 \text{ g/m}^2$ versus $43,2 \pm 2,3 \text{ g/m}^2$ $p=0,001$), un volume du VG en fin de diastole indexé et en fin de systole indexé plus élevés conduisant à un remodelage du VG (Figure 3) avec un rapport masse du VG sur volume en fin de diastole plus élevé ($1,10 \pm 0,07 \text{ g/ml}$ versus $0,68 \pm 0,03 \text{ g/mL}$ $p<0,001$). De plus ils présentaient une anomalie de la relaxation précoce du VG (Figure 4) avec une diminution du rapport E/A ($1,34 \pm 0,07$ versus $1,66 \pm 0,09$ $p=0,011$). Cependant la fraction d'éjection du VG, les autres paramètres de fonction systolique et diastolique ne différaient pas entre les patients actifs et les sujets contrôles. Les patients en rémission ne différaient pas des sujets contrôles pour la masse du VG et le rapport E/A mais montraient un rapport masse du VG sur volume en fin de diastole plus élevé ($0,81 \pm 0,04$ $p=0,018$), malgré une amélioration significative en comparaison avec les patients actifs ($p<0,001$). Le volume du VG en fin de diastole indexé et en fin de systole indexé ne différait pas entre le groupe actif et en rémission.

La masse indexée du VG était associée positivement avec les niveaux de cortisol libre urinaire des 24 heures ($r=0,71$ $p=0,002$, la surface de TAV ($r=0,48$, $p=0,003$) et le volume de TAE ($r=0,54$, $p<0,001$). Le TAE, la surface de TAV et le CTGH étaient liés positivement avec le rapport masse du VG sur volume en fin de diastole et négativement avec le rapport E/A. Les analyses multivariées ont montré que le volume de TAE était associé indépendamment avec la masse indexée du VG (coefficient standard $\beta=0,40$, $p=0,008$) et le rapport masse du VG sur volume en fin de diastole ($\beta=0,41$, $p=0,011$).

Discussion

Notre étude est la première étude IRM à évaluer les dépôts de graisse ectopique dans le SC. Dans cette étude nous montrons que le TAE est plus élevé chez des patients présentant un SC ACTH-dépendant par rapport à des sujets contrôles de poids normal ayant le même âge et le même sexe mais aussi par rapport à des patients diabétiques de type 2 de même TAV. De plus nous avons trouvé que 41 mois après rémission le TAE était toujours plus élevé que chez les sujets contrôles.

Cette augmentation du TAE pourrait contribuer à l'incidence élevée de la coronaropathie chez les patients présentant un SC (25). En effet il a été mis en évidence un lien fort entre TAE et développement de la coronaropathie chez l'Homme (14). Les maladies cardio-vasculaires sont une cause majeure de décès chez les patients ayant un SC que ce soit lorsque la pathologie est

active ou après rémission (5). Neary *et al.*, ont trouvé une augmentation du volume des plaques coronariennes calcifiées et non calcifiées en utilisant le scanner coronaire chez les patients présentant un SC par rapport à des sujets contrôles ayant le même score de risque Framingham (26). Le TAE est un dépôt périvasculaire qui peut relarguer des médiateurs inflammatoires qui diffusent au travers de la paroi coronaire et interagissent avec les cellules endothéliales (27). Dans l'obésité et la coronaropathie, les adipokines du TAE induisent l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules, améliorent l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales et facilitent la migration des monocytes adhérents. (28). Le TAE prédit le risque d'événements coronariens fatals ou non à 5 ans indépendamment des facteurs de risque traditionnel (18). Le TAE est corrélé avec l'étendue et la sévérité de la coronaropathie, avec les douleurs thoraciques, l'angor instable et la réserve coronarienne (29). Seulement une seule autre étude a évalué le TAE en utilisant l'échographie cardiaque chez des patients ayant un incidentalome surrénalien et ont trouvé une augmentation de l'épaisseur du TAE chez des patients avec un SC modérée (n=6) en comparaison avec des sujets contrôles (n=30) (30). Nos travaux confirment que le SC est associé à une accumulation spécifique de la graisse viscérale avec une augmentation remarquable du TAE par rapport à des sujets contrôles et des patients diabétiques de type 2 appareillés sur le TAV. Cette augmentation du TAE persiste chez les patients en rémission malgré une amélioration significative des paramètres métaboliques. Notre hypothèse est que cette augmentation de TAE avec les autres facteurs de risque cardiovasculaires pourrait contribuer à cet excès de morbidité cardiovasculaire.

L'obésité centrale et l'exposition chronique aux GC sont tous les deux caractérisés par une accumulation de TAV et une augmentation du risque d'insulinorésistance et de maladies métaboliques. Les GC sont de puissants régulateurs de la différenciation adipocytaire in vitro. L'enzyme 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) joue un rôle crucial en déterminant les niveaux intracellulaires de GC par régénération locale des GC actifs (cortisol) à partir de métabolites inactifs (cortisone) et est très exprimé dans le TAV (31,32). Dans l'obésité et le diabète le TAV est supposé être le déterminant principal de de NAFLD du fait de la proximité de la circulation portale (33). Chez l'Homme l'expression de la 11 β HSD1 dans le TAV a été associé avec les maladies du foie non-alcooliques («non alcoholic fatty liver disease » NAFLD) (34). Cependant la prévalence de NAFLD chez les patients avec un SC a été retrouvée relativement basse (20% des patients) (35,36). Notre travail montre un pattern de développement de la graisse ectopique spécifique dans le SC. Notre étude montre que les patients atteints de SC sont relativement protégés contre la stéatose cardiaque et hépatique par

rapport à des patients diabétiques de type 2 appareillés pour le TAV. Ces résultats sont intéressants puisque les GC ont classiquement été considérés comme responsable d'une accumulation de lipides dans le foie par leur action sur le tissu adipeux (altération du relargage des acides non estérifiés et des adipokines) et sur le foie (augmentation de la lipogenèse et de la ré-estérification) (37). A notre connaissance aucune autre étude n'a évalué la stéatose myocardique dans le SC. Dans notre travail les stéatoses myocardique et hépatique revenaient à des niveaux habituels avec la rémission et étaient significativement plus bas que chez des patients diabétiques de type 2 de même TAV, suggérant que le SC est associé à un cloisonnement spécifique de l'accumulation des triglycérides.

Dans notre étude, nous avons montré que les patients du groupe actif avaient une masse indexée du VG plus élevée, un remodelage concentrique et des troubles de la relaxation précoce du VG par rapport aux sujets contrôles. Ces résultats sont concordants avec ce qui a été rapporté précédemment par des études utilisant l'échographie cardiaque et ayant révélé une dysfonction infra-clinique du VG dans le SC actif (8, 9, 38-40). L'augmentation de la masse du VG est un facteur de risque indépendant d'insuffisance cardiaque et le remodelage concentrique du VG a été associé à des événements cardiovasculaires malgré une fraction d'éjection normale (41, 42). La dysfonction diastolique reflétée par la relaxation précoce du VG a été corrélée significativement avec la morbidité et mortalité cardiaque (43). Au contraire la seule autre étude qui a utilisé l'IRM cardiaque (10) a des résultats divergents avec une absence d'augmentation significative de la masse du VG et du rapport masse sur volume en fin de diastole. Cependant leurs résultats montraient une augmentation régionale de l'épaisseur de la paroi du VG et une diminution significative de la masse indexée du VG avec le traitement du SC. En fait de nombreux mécanismes peuvent conduire à une augmentation de la masse du VG et à un remodelage concentrique au cours de l'hypercorticisme comme l'hypertension artérielle, les anomalies glucidiques, l'obésité viscérale et la dyslipidémie. Nous pensons que cela met en lumière l'importance de l'évaluation correcte de la morphologie et de la fonction cardiaque même chez des patients atteints de SC asymptomatiques en utilisant une imagerie quantitative de haute précision comme l'IRM 3T.

Chez les patients en rémission nous confirmons la persistance d'anomalies du VG (persistance d'un remodelage concentrique) malgré une amélioration significative par rapport aux patients actifs. Au contraire la masse indexée du VG s'est complètement normalisée par rapport aux sujets contrôles. D'autres études ont fait les mêmes observations : Pereira *et al.*, (8) avaient déjà trouvé une normalisation de la masse indexée du VG 14 mois après rémission mais pas

d'amélioration significative de la dysfonction diastolique. Kamenicky *et al.*, (10) ont évalué des patients atteints d'un SC 6 mois après rémission et ils ont encore montré la présence d'anomalies de la morphologie du VG. Ici nous démontrons que même après une longue période de rémission il persiste des anomalies du VG. Cela pourrait être lié à la persistance d'une élévation du volume de TAE. En effet, nous avons trouvé que le volume de TAE était indépendamment corrélé avec la masse indexée du VG et le rapport masse sur volume en fin de diastole.

Notre étude a plusieurs limites. C'est une étude transversale avec un nombre faible de patients ce qui limite notre capacité à déduire des causalités. Les résultats doivent être interprétés avec précaution et aucune conclusion définitive ne peut être réalisée. Des études prospectives incluant des patients suivis après leur rémission sont nécessaires pour confirmer nos résultats. Cependant, le SC est une maladie très rare, plus de deux ans ont été nécessaires pour recruter la population de l'étude, l'appariement de nos patients avec des sujets contrôles et des patients diabétiques de type 2 nous ont aidé à interpréter le volume relatif de chaque dépôt de graisse ectopique.

Conclusions

Dans cette étude, nous avons démontré qu'il existe un pattern de développement des dépôts de graisse ectopique unique chez les patients ayant un SC ACTH-dépendant avec une augmentation relative de la graisse épocardique qui persiste chez les patients en rémission par rapport à des sujets contrôles. Cette augmentation du TAE est associée à une dysfonction infra-clinique du VG. De plus nous avons trouvé que 41 mois en moyenne après rémission le TAE était toujours plus élevé que chez les sujets contrôles ce qui pourrait contribuer à la persistance du risque cardiovasculaire. Enfin, nous mettons en évidence une accumulation relativement modérée de triglycérides dans le cœur et dans le foie chez les patients présentant un SC actif par rapport à des patients diabétiques de type 2 ayant le même TAV remettant en question le rôle central du TAV dans l'ectopie.

Table 1: Caractéristiques clinico-biologiques des participants à l'étude

	Groupe actif (n=19)	Groupe en rémission (n=19)	Contrôles (n=19)	p
Sexe, femme/homme, n	12/7	15/4	14/5	NS
Age, années	49,8 ±3,4	49,1±2,9	48,9±2,5	NS
Durée du SC non contrôlé, mois	25,6 ±3,9	32,6±7,2	-	NS
Paramètres biologiques au diagnostic				
ACTH plasmatique à minuit, pg/mL	53 [35-100]	63 [27-85]	-	NS
Cortisol plasmatique à minuit, nmol/L	499,5 [319,5-671,3]	485 [335,0-629,3]	-	NS
Cortisol libre urinaire, mmol/L/24h	1260 [276-2128]	1012 [406-2520]	-	NS
Type de Cushing, n, %				
Hypophysaire	17 (89,5)	17 (89,5)	-	-
Ectopique	2 (10,5)	2 (10,5)	-	-
Comorbidités, n, %				
Hypertension	13 (68,4)	4 (21,0)	-	<0,05 ^a
<i>3traitements ou plus</i>	3 (15,8)	0	-	NS
Diabète ou intolérance au glucose	11 (57,9)	3 (15,8)	-	<0,05 ^a
Dyslipidémie	6 (31,6)	3 (15,8)	-	NS
Tabac, n, %	6 (31,6)	4 (21,0)	4 (21,0)	NS
Paquets-années	31 [6-43]	5 [3-19]	10 [7-25]	NS
Paramètres cliniques				
IMC actuel, kg/m ²	26,9±0,8	26,3±1,1	21,9±0,7	<0,05 ^{b,c}
Tour de taille, cm	98±3	92±3	80±2	<0,05 ^{b,c}
Rapport tour de taille sur hanche	0,97±0,02	0,95±0,03	0,89±0,02	<0,05 ^b
Tension artérielle systolique, mm Hg	130±5	112±3	119±4	<0,05 ^a
Tension artérielle diastolique, mm Hg	80±2	70±3	73±3	<0,05 ^{a,b}
Fréquence cardiaque, bpm	75±3	69±2	68±3	NS
*Paramètres biologiques				
<i>Paramètres métaboliques</i>				
Glycémie à jeun, mmol/L	5,67±0,29	4,42±0,16	4,79±0,10	<0,05 ^{a,b}
Insulinémie à jeun, mUI/L	11,34±1,38	10,41±2,42	-	NS
HOMA-IR	3,39±0,60	2,02±0,40	-	<0,05 ^a
HbA _{1c} , %	6,71±0,48	5,66±0,14	-	<0,05 ^a
Aire sous la courbe de la glycémie au cours du test de tolérance, mmol/L 120min	1262±93	810±64	-	<0,05 ^a
Aire sous la courbe de l'insulinémie au cours du test de tolérance, mmol/L 120min	6826±896	6902±1069	-	NS
Index de disposition orale	0,34 [0,19-1,36]	2,46 [1,36-5,74]	-	<0,05 ^a
triglycérides, mmol/L	1,59±0,23	1,26±0,19	0,87±0,06	<0,05 ^b
Cholestérol total, mmol/L	5,62±0,28	5,39±0,21	5,42±0,27	NS
LDL-cholestérol, mmol/L	3,35±0,23	3,06±0,14	3,13±0,21	NS
HDL-cholestérol, mmol/L	1,84±0,29	1,74±0,12	1,89±0,13	NS
Acide urique, µmol/L	316,2±21,8	334,3±26,3	-	NS
<i>Marqueurs inflammatoires</i>				
Fibrinogène, g/L	3,43±0,17	3,52±0,20	-	NS
Protéine C-réactive ultra-sensible, mg/L	1,4 [0,5-2,9]	1,6 [0,8-5,2]	-	NS
Ferritine, µg/L	135 [44-249]	78 [35-114]	-	NS
<i>Enzymes hépatiques</i>				
Gamma glutamyltranspeptidase, UI/L	36 [25-44]	17 [12-45]	-	NS
Alanine transaminase, UI/L	20 [18-28]	18 [16-25]	-	NS
Aspartate transaminase, UI/L	21 [19-25]	19 [17-24]	-	NS
<i>Répartition du tissu adipeux en IRM</i>				
TAV, cm ²	146,4±14,9	99,4±11,4	61,5±5,8	<0,05 ^{a,b,c}
TASCT, cm ²	276,8±27,8	297,7±33,5	167,1±25,2	<0,05 ^{b,c}
TAV/TASCT	0,63±0,09	0,37±0,04	0,45±0,05	<0,05 ^a
TASCs, cm ²	124,5±11,6	155,7±23,1	83,7±12,9	<0,05 ^{b,c}
TAV/TASCs	1,35±0,18	0,80±0,13	0,84±0,09	<0,05 ^a
TASCp, cm ²	152,3±17,9	142,0±16,1	83,4±14,3	<0,05 ^{b,c}
TASCp/TASCs	1,22±0,09	1,09±0,13	0,99±0,11	<0,05 ^b

Les données sont figurées en n (%) ou en moyenne ± SEM ou en médiane [25^{ème} percentile, 75^{ème} percentile]

NS: Non Significatif IMC: indice de masse corporelle TAV : Tissu adipeux viscéral TASCT : Tissu adipeux sous-cutané total TASCs : Tissu adipeux sous-cutané superficiel TASCp : Tissu adipeux sous-cutané profond ^a p<0,05 entre le groupe actif et en rémission, ^b p<0,05 entre le groupe actif et les sujets contrôles, ^c p<0,05 entre le groupe en rémission et les sujets contrôles

Figure 1 : Flow Chart

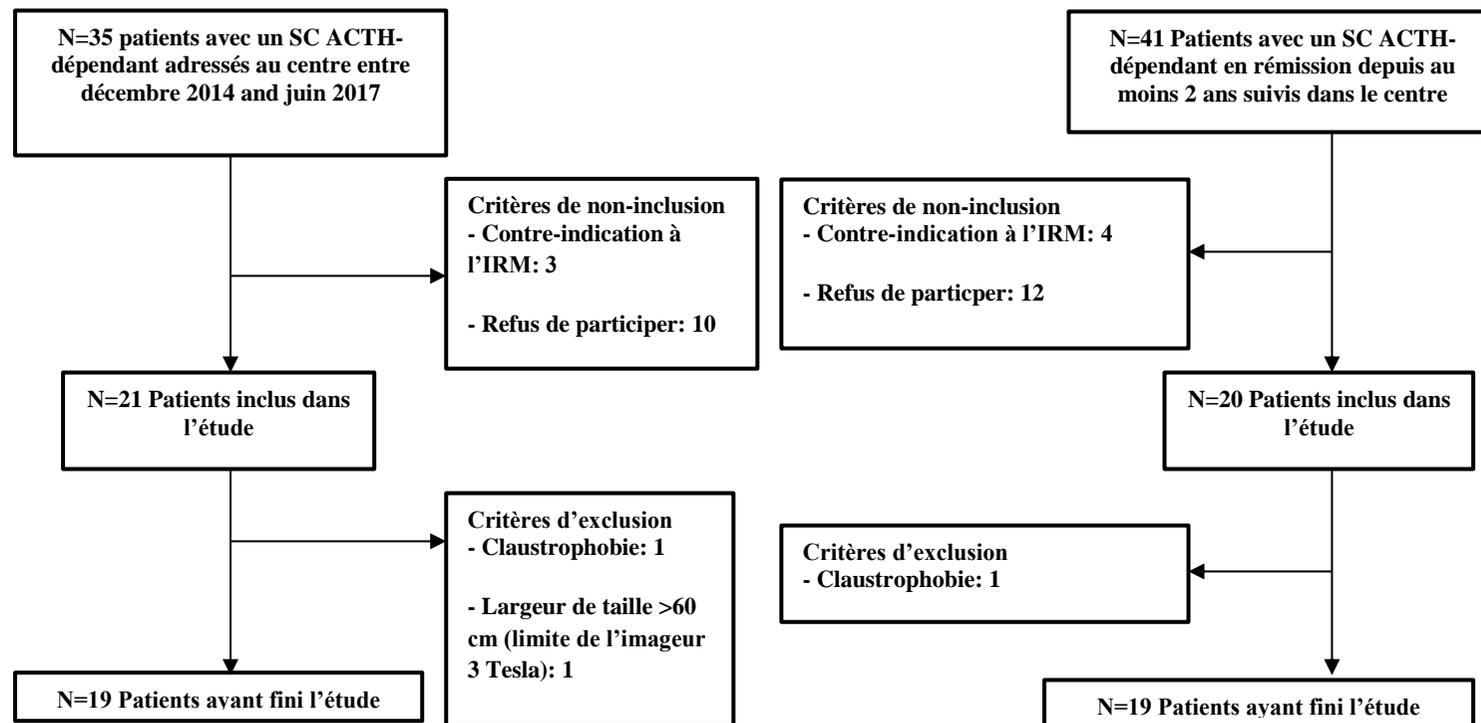


Tableau 2: Caractéristiques cliniques et répartition abdominale du tissu adipeux de la population utilisée dans la comparaison avec les patients diabétiques

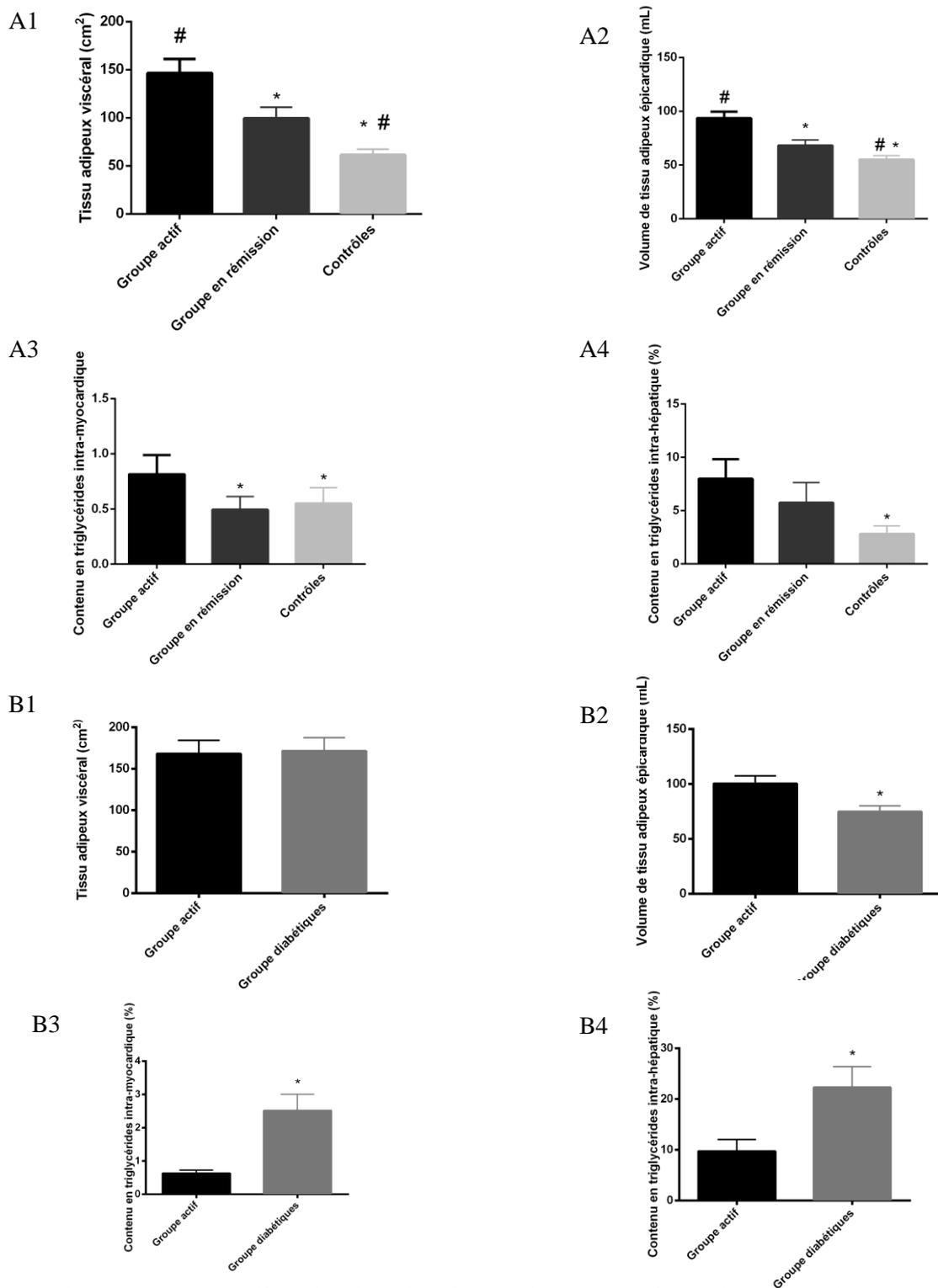
	Groupe actif (n=14)	Groupe diabétiques (n=14)	P
Sexe, femme/homme, n	9/5	12/2	NS
Age, années	49,7±3,5	49,0±3,4	NS
Comorbidités, n, %			
Hypertension	10 (71,4)	9 (64,3)	NS
Diabète	7 (50)	14 (100)	0,006
Intolérance au glucose	3 (21,4)	-	-
Dyslipidémie	4 (28,6)	9 (64,3)	NS
Tabac, n, %	4 (28,6)	10 (71,4)	NS
Paramètres cliniques			
IMC, kg/m ²	27,8±1,0	34,6±1,5	<0,001
Tour de taille, cm	101±3	110±3	NS
Tour de hanche, cm	103±2	115±3	0,007
Rapport tour de taille sur hanche	0,98±0,02	0,96±0,02	NS
Tour de cuisse, cm	51±1	59±1	0,001
Rapport tour de taille sur cuisse	1,99±0,07	1,90±0,08	NS
Répartition du tissu adipeux			
TAV, cm ²	168,2±16,3	171,5±16,3	NS
TASCT, cm ²	296,3±35,2	449,8±36,7	0,006
TAV/TASCT	0,70±0,12	0,40±0,03	0,069
TASCs, cm ²	131,4±14,8	247,6±27,7	0,001
TAV/TASCs	1,53±0,23	0,79±0,09	0,006
TASCp, cm ²	164,8±22,8	217,1±16,8	NS
TASCp/TASCs	1,26±0,12	1,02±0,13	NS

Les données sont figurées en n (%) ou en moyenne ± SEM ou en médiane [25^{ème} percentile, 75^{ème} percentile]

NS: Non Significatif IMC : indice de masse corporelle TAV : Tissu adipeux viscéral TASCT : Tissu adipeux sous-cutané total

TASCs : Tissu adipeux sous-cutané superficiel TASCp : Tissu adipeux sous-cutané profond

Figure 2: Accumulation spécifique des dépôts de graisse ectopique au cours du syndrome de Cushing



A: Comparaison entre le groupe actif, en rémission et les sujets contrôles pour la surface de tissu adipeux viscéral (A1), le volume de tissu adipeux épicaordique (A2), le contenu en triglycérides intra-myocardique (A3) et intra-hépatique (A4).

B: Comparaison entre le groupe actif et diabétiques pour la surface de tissu adipeux viscéral (B1), le volume de tissu adipeux épicaordique (B2), le contenu en triglycérides intra-myocardique (B3) et intra-hépatique (B4).

Les données sont présentées en moyenne \pm SEM

* $p < 0,05$ en comparaison avec le groupe actif # $p < 0,05$ en comparaison avec le groupe en rémission

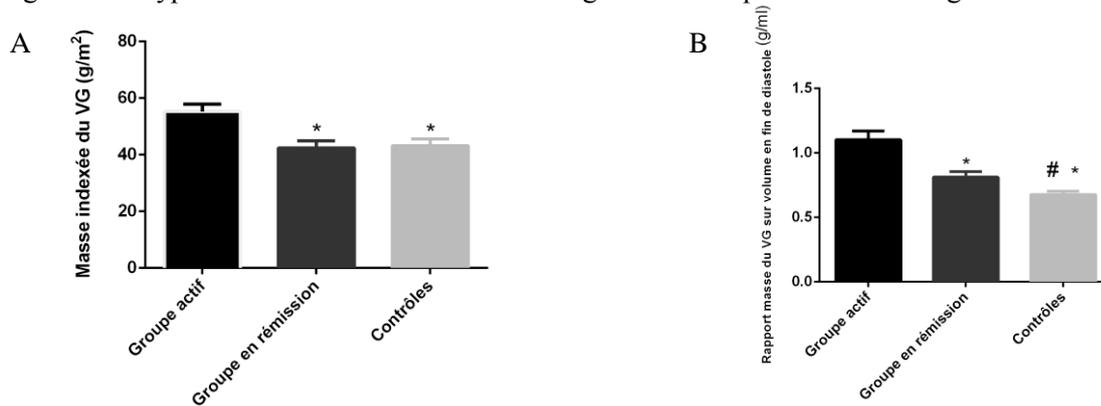
Tableau 3: Structure et fonction du ventricule gauche dans la population d'étude

	Groupe actif (n=19)	Groupe en rémission (n=19)	Contrôles (n=19)	p
<i>Dimensions du VG et fonction systolique</i>				
Fraction d'éjection, %	73,06±2,37	72,32±1,78	69,10±1,25	NS
Volume indexé de fin de diastole, ml/m ²	53,13±3,55	53,09±2,50	64,04±2,47	<0,05 ^{b,c}
Volume indexé de fin de systole, ml/m ²	14,92±1,87	14,86±1,33	19,76±1,04	<0,05 ^{b,c}
Stroke volume indexé, ml/m ²	38,22±2,53	38,21±1,98	44,30±2,02	<0,05 ^c
Index cardiaque, L/min/m ²	2,80±0,17	2,62±0,14	2,97±0,14	<0,05 ^c
Masse indexée du VG, g/m ²	55,3±2,6	42,4±2,6	43,2±2,3	<0,05 ^{a,b}
Masse sur volume de fin de diastole g/mL	1,10 ±0,07	0,81 ± 0,04	0,68±0,03	<0,05 ^{a,b,c}
<i>Fonction diastolique du VG</i>				
Rapport E/A	1,34±0,07	1,59±0,10	1,66±0,09	<0,05 ^b
Temps de décélération, ms	148,8±13,9	190,4±16,8	172,4±7,9	NS
Rapport E/Ea	3,85±0,47	3,25±0,48	4,02±0,58	NS
Surface de l'oreillette gauche, cm ²	19,25±0,89	17,67±0,80	19,07±1,48	NS

Les données sont présentées en moyenne ± SEM

^a p<0,05 entre le groupe actif et en rémission, ^b p<0,05 entre le groupe actif et les sujets contrôles, ^c p<0,05 entre le groupe en rémission et les sujets contrôles

Figure 3: L'hypercortisolisme induit un remodelage con centrique du ventricule gauche



A Masse indexée du VG (g/m²): comparaison entre le groupe actif, en rémission et les sujets contrôles.

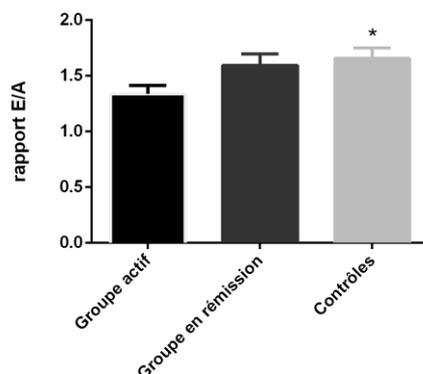
B Rapport masse du VG sur volume en fin de diastole (g/ml) : comparaison entre le groupe actif, en rémission et les sujets contrôles.

Données figurées en moyenne ± SEM

* p<0,05 comparaison au groupe actif

#p<0,05 comparaison au groupe en rémission

Figure 4: L'hypercortisolisme induit une dysfonction diastolique du ventricule gauche



Rapport E/A: comparaison entre le groupe actif, en rémission et les sujets contrôles.

Données figurées en moyenne ± SEM* p<0,05 comparaison au groupe actif

Cushing syndrome is associated with increased epicardial fat accumulation, concentric left ventricular remodeling, and less myocardial and liver fat than type 2 diabetes: a pilot 1H-MRS study

Flavia Maurice^{a,b}, Bénédicte Gaborit^{a,b}, Clara Vincentelli^{a,b}, Ines Abdesselam^{a,c}, Patricia Ancel^{a,c}, Monique Bernard^c, Alexis Jacquier^c, Henry Dufour^d, Lauriane Pini^c, Thomas Graillon^d, Frank Kober^c, Thierry Brue^b, Frédéric Castinetti^{b,*}, Anne Dutour^{a,b*}

*authors contributed equally to the work

^aAix Marseille Univ, INSERM, INRA, NORT, Marseille, France

^bDepartment of endocrinology, pôle ENDO, APHM, Marseille, France.

^cAix Marseille Univ, CNRS, CRMBM, Marseille, France.

^dDepartment of neurosurgery, APHM, CHU Timone, Marseille, France.

Introduction

Long-term glucocorticoid therapy is known to be associated with increased mortality and adverse cardiovascular outcomes (1). Glucocorticoids exposure induces visceral adiposity accumulation, impaired glucose tolerance, lipid metabolism disturbance, hypertension and hypercoagulability. Cushing's syndrome (CS) results from chronic exposure to excess glucocorticoids, which can be from either exogenous doses of corticosteroids, or from an endogenous source of cortisol (2). Pituitary corticotroph adenoma (Cushing's disease) is a rare pure model to study the impact of cardiac and adipose tissues exposure to glucocorticoids excess. It is well known that CS leads to increased mortality due to cardiovascular events: increased risk of acute myocardial infarction (hazard ratio (HR) 3.7) and heart failure (HR=6.0) have been reported in the year following the diagnosis (3). Emerging evidence suggests nonetheless persistent cardiovascular risk even after long-term cured disease. A recent retrospective study found indeed a standardized mortality ratio at 2.7 for circulatory disease in patients who were in remission for more than 10 years (4); other studies found remaining metabolic disorders even after 5 years remission (5–7). To date, the impact of CS on cardiac structure and left ventricular (LV) function apart from dilated cardiomyopathy and congestive heart failure have been scarcely studied. Besides, data from echocardiographic or magnetic resonance imaging (MRI) studies for cardiac changes after remission are conflicting (8–10).

Relative body fat distribution for a given body mass index (BMI) has been determined to be a marker of insulinresistance, type 2 diabetes, and future cardiovascular events. The limited expandability of subcutaneous adipose tissue, and its inability to recruit new adipose cells leads to the accumulation of

fat in ectopic sites (11, 12). Ectopic fat includes excess storage of triglycerides in non-adipose cells (steatosis), and development of specific adipose tissues such as visceral adipose tissue (VAT) in the abdomen, or epicardial adipose tissue (EAT) around the heart. Ectopic fat stores can be studied in a whole using non-invasive three-dimensional volumetric imaging techniques such as 3-T magnetic resonance imaging (MRI) and ¹H-spectroscopy (¹H-MRS) (13, 14). Evidence suggests that cardiac adiposity including EAT and myocardial (intra-myocellular) lipid deposition is increased in type 2 diabetics and is associated with greater LV mass and work, suppressed septal wall thickening, and impaired diastolic function (13, 15–17). Prospective studies have shown in addition that EAT amount is an independent predictor of coronary events (18). Liver steatosis is closely linked to insulin-resistance and has been suggested to contribute at least in part to left ventricular (LV) dysfunction (19, 20). CS is associated with upper body fat distribution and central obesity. Its impact on ectopic fat development is unknown.

We make the hypothesis that glucocorticoids (GC) excess is associated with ectopic fat accumulation.

Therefore we studied ectopic fat stores and LV function as assessed with MRI and ¹H-MRS in patients with active ACTH-dependent CS, in patients with remission of ACTH-dependent CS for at least two years, age- and sex-matched controls and VAT matched type 2 diabetics.

Methods

Subjects

Patients with ACTH-dependent CS were prospectively recruited from December 2014 to June 2017 in the Endocrinology and Neurosurgery departments of Marseille University Hospital, France. The active group consisted of newly diagnosed patients or patients uncontrolled despite multiple treatments. The remission group included patients that were in remission for at least 2 years but no more than 6 years, regardless of their treatment modality.

Exclusion criteria included an age below 18 years, pregnancy or breastfeeding, and contraindication for magnetic resonance imaging.

ACTH-dependent CS was diagnosed according to the usual clinical and biological criteria, including: 1) elevated twenty-four-hour urinary free cortisol for at least two times; 2) increase of basal plasma cortisol levels with a loss of the circadian pattern and inappropriate unsuppressed plasma ACTH levels; 3) lack of cortisol suppression after a low-dose dexamethasone test (0,5 mg every 6 hours for 48 hours). Patients were considered to be in remission after treatment if they presented either with secondary adrenal insufficiency based on the following criteria: low morning plasma cortisol levels after 24 hours of withdrawal of hydrocortisone or with eucortisolism based on the following criteria: 1) Twenty-four-hours urinary free cortisol below or within the normal range for at least two times; 2) Basal plasma cortisol levels below or within the normal range with restoration of a physiological circadian pattern and appropriate plasma ACTH levels; 3) cortisol suppression after the overnight 1-mg dexamethasone test

or if they were controlled with anti-cortisolic therapy based on the following criteria: twenty-four-hour urinary free cortisol below or within the normal range at every control during follow-up for at least two years.

Control subjects were recruited through advertisements and matched with active patients for age and sex. They had to provide a blood test for less than one year with at least a fasting plasma glucose and lipid profile. Otherwise, they had to perform it. Exclusion criteria included an age below 18 years, pregnancy or breastfeeding, contraindication for MRI, past or actual chronic treatment with glucocorticoids, personal or familial cardiovascular diseases, one or more metabolic syndrome criteria (NCEP-ATP-III) (21) or a BMI above 25 kg/m².

All the patients and volunteers gave their written informed consent, and the study protocol was approved by the local ethics committee (Marseille, Comité de Protection des Personnes, Sud-Méditerranée II: identification 2014-A01302-45 and 2016-A00026-45, clinical trial identification: NCT02335996 and NCT02848703).

Patients with type 2 diabetes previously included by the team in an MRI study (identification: 2010-022792-57) (22) were chosen to match each active CS patient for abdominal VAT.

A more detailed description of data recorded from subjects is available in the appendix.

Blood tests

Twenty-four-hour urinary free cortisol excretion was quantified using a specific radioimmunoassay (reference: IM1841, Beckman Coulter Diagnostics France). Plasma cortisol levels and plasma ACTH levels were measured with an electrochemiluminescent immunoassay (Roche Diagnostics France). Fasting blood tests for glucose, cholesterol, insulin, hemoglobin A1c (HbA_{1c}), fibrinogen, C-reactive protein, ferritin, uric acid and liver enzymes were taken in patients the day of the inclusion. Patients had also the day of inclusion an oral glucose tolerance test (OGTT) with repeated measures of plasma glucose and insulin levels. A complete description of calculation method for insulin resistance and oral disposition index are provided in the appendix.

Magnetic resonance imaging

The magnetic resonance imaging was performed on a 3-Tesla wide-bore magnet (Magnetom Verio, Siemens Healthineers, Erlangen, Germany) equipped with a 32-element phased array coil. The subjects were scanned in a head-first supine position.

Abdominal adipose tissue compartments A 3D three-point Dixon volume interpolated breath-hold gradient echo sequence (VIBE) was used to acquire fat and water images of the volume between vertebrae L4 and the sacrum. Areas of abdominal adipose tissue compartments were measured with a semi-automatic method at a single axial slice at the intervertebral disc L4-L5 using in-house software running under the Interactive Data Language environment (23). Fascia between superficial and deep subcutaneous adipose tissue was traced manually. Total subcutaneous adipose tissue (TSCAT) was

calculated by adding superficial subcutaneous adipose tissue (sSCAT) and deep subcutaneous adipose tissue (dSCAT). Details about the sequence are provided in the appendix.

Proton magnetic resonance spectroscopy ^1H -MRS of the heart and the liver were carried out using a single voxel technique positioned with a multi-slice FLASH image series (volume of interest: $7 \times 19 \times 19 \text{ mm}^3$ located in the septum [heart], $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ located in the anterior part [liver]) and an ECG-gated point-resolved single-voxel proton spectroscopy sequence during breath-hold. Echo time=35 ms, repetition time=340 ms for the heart, 1000 ms for the liver, number of excitations=16 and bandwidth=2000 Hz. Intra-tissue triglycerides were quantified as previously described (22, 24). Single scan spectra were also acquired as reference for saturation correction. Spectra were analyzed using home-developed software running under an Interactive Data Language environment (Exelis Visual Information Solutions, Inc., Boulder, Colorado, USA) as previously described (13). The myocardial (MTGC) and hepatic (HTGC) triglyceride contents were determined by integrating for each spectrum the frequency domain and expressing the result as a percentage of the water signal (%triglyceride= triglyceride/water x 100).

Cardiac study Images for LV volumes, EAT volumes and left atrial area were acquired using a multislice steady-state free precession cine sequence, for LV diastolic function a prospectively gated velocity-encoding technique was used. Images were then analyzed using a dedicated post-processing software (Argus, Siemens Medical Solutions). EAT volume was measured manually as previously described (24) by the same operator with good intraobserver and interobserver reproducibilities (variations of coefficient of 3.1% and 5.7% respectively). Measure of EAT volume was reassessed for all diabetic patients to ensure a good reproducibility. A more detailed description of the MRI methods and MR acquisition parameters is included in the appendix.

Statistical analysis

All statistics were performed using GraphPad Prism (v 7.01). All quantitative results are presented as the means \pm standard error of mean (SEM) or median [25th, 75th percentile] when the distribution was non-Gaussian, all qualitative results are presented as number and percentage. A p value less than 5% was considered to be statistically significant. All qualitative datasets were compared using Fischer's test. All normally distributed quantitative datasets were compared using Student's t-test, and non-normally distributed quantitative datasets were compared using Mann-Whitney. Pearson's (Gaussian distribution) or Spearman's (non-Gaussian distribution) correlations were used to evaluate associations between ectopic fat stores and anthropometrical, biological, cardiac structure and function data. Multivariate analysis including age, sex, BMI, lipid, blood pressure, fasting plasma glucose and ectopic fat stores was performed using Stat view (v 5.0) to explain left ventricular mass index and mass to end diastolic volume.

Results

Clinical characteristics

Twenty-one patients were included in active group but only 19 completed the study (17 Cushing's disease, 2 ectopic origin) similarly 19 patients from the remission group (17 Cushing's disease, 2 ectopic origin) completed the study. (Figure 1). Meanwhile, 19 controls were included. Their clinical characteristics are shown in Table 1. The 3 groups did not differ in age and sex, Subjects had a mean age of 49.8 ± 3.4 , 49.1 ± 2.9 and 48.9 ± 2.5 years in the active, remission and control groups, respectively ($p=NS$). Patients from both the active and remission groups did not differ in duration of uncontrolled disease, and had comparable plasma midnight ACTH and cortisol levels, 24 hours urinary free cortisol, and BMI at diagnosis. In the remission group, the mean duration of remission was 41.2 ± 4.2 months. Fourteen (73.7%) had glucocorticoid deficiency at the time of the MRI with a mean hydrocortisone dose of 26.1 ± 1.3 mg/day.

Active patients had more treated hypertension than patients in the remission group ($p=0.022$).

Fourteen active CS patients could be paired with type 2 diabetic patients matched for VAT. Their clinical characteristics are shown in Table 2. The 2 groups did not differ for sex and age but diabetic patients had higher BMI (34.6 ± 1.7 kg/m² versus 27.8 ± 1.0 kg/m² $p<0.001$).

Glucose metabolism and inflammation

Biological characteristics are shown in Table 1. As expected active patients had impaired glucose metabolism and 50% had diabetes: active patients had higher fasting plasma glucose levels than patients in remission and controls ($p<0.001$ and $p=0.015$ respectively), higher HOMA-IR ($p=0.035$), and lower oral disposition index during OGTT. Active patients had also lipid disorders with higher serum triglyceride levels than controls ($p=0.002$).

Abdominal adipose tissue distribution

The data are shown in Table 1. Active patients had an accumulation of VAT (Figure 2) compared to controls (146.6 ± 14.9 cm² versus 61.5 ± 5.8 cm² $p<0.001$) and showed an adverse distribution of abdominal fat with increased VAT/TSCAT and dSCAT/sSCAT ratio compared to controls. Patients in remission had higher VAT than controls (99.4 ± 11.4 cm² $p=0.012$), despite an improvement compared to active patients ($p=0.018$).

When compared to diabetic patients a more harmful distribution of abdominal fat with a higher VAT/sSCAT ratio (Table 2) was observed in the active group (1.53 ± 0.23 versus 0.79 ± 0.09 , respectively $p=0.006$).

Ectopic fat stores

Increased of ectopic fat (Figure 2) was found in active patients compared to controls with higher EAT volume (93 ± 6 mL versus 55 ± 4 mL $p<0.001$), MTGC ($0.81 \pm 0.17\%$ versus $0.55 \pm 0.14\%$ $p=0.046$)

and HTGC (7.99 ± 1.83 % versus 2.83 ± 0.73 % $p=0.006$). Patients in remission had still higher EAT volume than controls (68 ± 5 ml $p=0.044$), MTGC and HTGC for their part reached controls levels.

When comparing to diabetic patients (Figure 2) the active group showed significantly more EAT volume (100 ± 7 mL versus 75 ± 5 mL $p=0.008$) while steatoses were much lower in active patients than in diabetic patients: MTGC 0.63 ± 0.10 % versus 2.51 ± 0.49 % $p<0.001$ and HTGC 9.74 ± 2.30 % versus 22.28 ± 4.11 % $p=0.008$. Hepatic steatosis was present in 53% of active patients and 93% of diabetic patients.

Cardiac morphology and function

Active patients showed abnormalities of LV morphology and function compared to controls (Table 3): they had significantly more LV hypertrophy with higher LV mass index (55.3 ± 2.6 g/m² versus 43.2 ± 2.3 g/m² $p=0.001$), lower end-diastolic and end-systolic volume index leading to concentric remodeling of LV (Figure 3) with a higher mass to end-diastolic volume ratio (1.10 ± 0.07 g/ml versus 0.68 ± 0.03 g/ml $p<0.001$). In addition they had impaired early LV relaxation (Figure 4) with lower E/A ratio (1.34 ± 0.07 versus 1.66 ± 0.09 $p=0.011$). However LV ejection function, others parameters of systolic and diastolic function did not differ between active patients and controls. Patients in remission did not differ from the controls for LV mass index and E/A ratio, but they showed higher mass to end-diastolic volume ratio (0.81 ± 0.04 $p=0.018$), despite a significant improvement compared to the active patients ($p<0.001$). End-diastolic and end-systolic volume index were not different between active and remission groups.

LV mass index correlated positively with urinary free cortisol levels ($r=0.71$, $p=0.002$), VAT ($r=0.48$, $p=0.003$) and EAT volume ($r=0.54$, $p<0.001$). EAT, VAT and HTGC correlated positively with mass to end diastolic volume and negatively with E/A ratio (online table 1). Multivariate analysis revealed that EAT volume was independently associated with LV mass index (standardized coefficient $\beta=0.40$, $p=0.008$) and mass to end diastolic volume ($\beta=0.41$, $p=0.011$).

Discussion

This is the first MRI study evaluating ectopic fat stores in CS. In this study, we demonstrated that EAT was increased in patients with active ACTH-dependent CS compared to age and sex-matched normal-weight controls and also compared to VAT-matched type 2 diabetic patients. Furthermore, we found that after 41 months of remission, EAT was still higher than in controls.

This EAT increase may contribute to the high incidence of coronary artery disease (CAD) in patients with CS (25). Indeed a strong association of EAT with the onset and development of CAD in humans has been evidenced (14). Cardiovascular disease is the major cause of death in patients with CS, either during active disease or after remission (5). Neary *et al*, found increased coronary calcifications and noncalcified coronary plaque volumes using multidetector computerized tomographic coronary angiography in patients with CS compared to controls with comparable Framingham risk scores (26). EAT is a perivascular depot that has been shown to release inflammatory mediators that pass through

the coronary wall and interact with endothelial cells (27). In obesity and CAD, EAT adipokines induce cell surface expression of adhesion molecules, enhance adhesion of monocytes to endothelial cells, and facilitate migration of adherent monocytes (28). EAT predicts 8-years fatal and non-fatal coronary events independently of traditional risk factors (18). EAT correlates with the extent and severity of CAD, chest pain, unstable angina and coronary flow reserve (29). Only one other study evaluated EAT with echocardiography in patients with adrenal incidentaloma and found increased EAT thickness in patients with mild CS (n=6) compared to healthy controls (n=30) (30). Our findings confirm that CS is associated with specific visceral fat deposition, with a remarkable increase in EAT compared to controls and VAT-paired DT2. This EAT increase is persistent in patients with remission despite significant improvement of metabolic parameters. Our hypothesis is that increased EAT along with other cardiovascular risk factors could contribute to this excess cardiovascular morbidity.

Central obesity and long-term GC exposure are both characterized by VAT accumulation and increased risk for insulinresistance and metabolic diseases. GCs are potent regulators of adipocyte differentiation *in vitro*. The enzyme 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β HSD1) plays a crucial role in determining intracellular GC levels by locally regenerating active GC (cortisol) from inactive metabolites (cortisone) and is highly expressed in VAT (31, 32). In obesity and diabetes, VAT is supposed to be the main determinant of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) via the proximity of portal circulation(33). In humans, 11 β -HSD1 VAT expression was associated with the presence of NAFLD (34). However, the prevalence of NAFLD in patients with CS has been shown to be relatively low (20 % of patients) (35, 36). Our work demonstrated a specific pattern of ectopic fat development in CS. Our study shows that CS patients are relatively protected against liver and heart steatosis compared to VAT paired type 2 diabetics. These results are interesting since GC have been classically recognized as an important driver of hepatic lipid accumulation via their action on both adipose tissue (alteration of the release of non-esterified acids and adipokines) and liver (increase in *de novo* lipogenesis and re-esterification)(37). To our knowledge, no other study has evaluated myocardial fat in CS. In our work, myocardial and liver steatoses returned to baseline levels with remission, and were significantly lower than in VAT-matched type 2 diabetics suggesting that CS is associated with specific lipid partitioning and triglyceride accumulation.

In our study, we found that active patients had higher LV mass index, concentric remodeling and impaired early LV relaxation compared to controls. These results are consistent with previous echocardiographic reports revealing LV subclinical dysfunction during active CS (8, 9, 38–40). Increased LV mass is an independent risk factor for heart failure, and LV concentric remodeling has been linked to adverse cardiovascular events despite normal ejection fraction (41, 42). Diastolic dysfunction reflected by LV early relaxation has been significantly related to cardiac morbidity and mortality (43). By contrast, the only other study that used cardiac magnetic resonance imaging (10) had divergent results with no significant increase in LV mass and mass to end-diastolic volume ratio. But

their results showed increased regional LV wall thickness and significant decrease of LV mass index with CS treatment. In fact many mechanisms can lead to increase in LV mass and concentric remodeling during hypercortisolism such as arterial hypertension, glucose abnormalities, visceral obesity and dyslipidemia. To our thinking, this highlights the importance of accurately evaluating cardiac structure and function even in asymptomatic CS patients using high precision quantitative imaging such as 3T MRI.

In patients in remission we confirmed the persistence of LV abnormalities (ie persistent concentric remodeling) despite significant improvement compared to active patients. By contrast LV mass index completely normalized compared to controls. Other studies made the same observations: Pereira *et al.*, (8) already found normalization of LV mass index 14 months after remission, but no significant improvement in diastolic function. Kamenicky *et al.*, (10) evaluated patients with CS after 6 months of remission and they still showed abnormal LV structure. Here we demonstrate that even after long-term remission LV abnormalities remain. This could be linked to the persistence of increased EAT volume. Indeed, we found that EAT volume was independently correlated with LV mass index, and mass to end diastolic volume.

Our study has several limitations. This is a cross sectional study with a small number of patients, that limits our ability to infer any causality. Results must be interpreted with caution and no definite conclusion can be drawn. Prospective studies including patients that will be followed-up after remission are needed to strengthen our findings. However, CS is a very rare disease, more than two years were necessary to recruit this study population and matching of our patients with controls and type 2 diabetics helped us in interpreting the relative amount of each ectopic fat depot.

Conclusions

In this study, we demonstrated a unique pattern of ectopic fat deposition in patients with active ACTH-dependent CS, with relatively high epicardial fat accumulation that persisted in patients in remission compared to controls. This increase in EAT was associated with subtle LV dysfunction. Furthermore we found that after 41 months of remission on average, EAT was still higher than in controls, possibly contributing to persistent cardiovascular risk. Finally we provided evidence of a relatively low liver and myocardial triglyceride accumulation in patients with active CS compared to VAT-matched type 2 diabetic patients, calling into question the central role of VAT in ectopy.

Table 1: Clinical, biological characteristics and abdominal adipose tissue distribution of the study participants.

	Active group (n=19)	Remission group (n=19)	Controls (n=19)	p value
Gender, female/male, n	12/7	15/4	14/5	NS
Age, y	49.8 ±3.4	49.1±2.9	48.9±2.5	NS
Duration of uncontrolled CS, months	25.6 ±3.9	32.6±7.2	-	NS
Biological parameters at diagnosis				
Plasma midnight ACTH level, pg/mL	53 [35-100]	63 [27-85]	-	NS
Plasma midnight cortisol level, nmol/L	499.5 [319.5-671.3]	485 [335.0-629.3]	-	NS
Urinary cortisol level, mmol/L/24h	1260 [276-2128]	1012 [406-2520]	-	NS
Cushing type, n, %				
Pituitary	17 (89.5)	17 (89.5)	-	-
Ectopic	2 (10.5)	2 (10.5)	-	-
Comorbidities, n, %				
Hypertension	13 (68.4)	4 (21.0)	-	<0.05 ^a
Taking three or more medications	3 (15.8)	0	-	NS
Diabetes mellitus or impaired glucose tolerance	11 (57.9)	3 (15.8)	-	<0.05 ^a
Hypercholesterolemia	6 (31.6)	3 (15.8)	-	NS
Smoking, n, %	6 (31.6)	4 (21.0)	4 (21.0)	NS
Pack-years	31 [6-43]	5 [3-19]	10 [7-25]	NS
Clinical parameters				
BMI, kg/m ²	26.9±0.8	26.3±1.1	21.9±0.7	<0.05 ^{b,c}
Waist, cm	98±3	92±3	80±2	<0.05 ^{b,c}
Waist/Hip ratio	0.97±0.02	0.95±0.03	0.89±0.02	<0.05 ^b
Systolic BP, mm Hg	130±5	112±3	119±4	<0.05 ^a
Diastolic BP, mm Hg	80±2	70±3	73±3	<0.05 ^{a,b}
Heart rate, bpm	75±3	69±2	68±3	NS
Biological parameters				
<i>Metabolic parameters</i>				
Fasting plasma glucose, mmol/L	5.67±0.29	4.42±0.16	4.79±0.10	<0.05 ^{a,b}
Fasting serum insulin levels, mUI/L	11.34±1.38	10.41±2.42	-	NS
HOMA-IR	3.39±0.60	2.02±0.40	-	<0.05 ^a
HbA _{1c} , %	6.71±0.48	5.66±0.14	-	<0.05 ^a
Blood glucose area under curve during oral glucose tolerance test, mmol/L 120min	1262±93	810±64	-	<0.05 ^a
Serum insulin area under curve during oral glucose tolerance test, mmol/L 120min	6826±896	6902±1069	-	NS
Oral disposition index	0.34 [0.19-1.36]	2.46 [1.36-5.74]	-	<0.05 ^a
Serum triglyceride levels, mmol/L	1.59±0.23	1.26±0.19	0.87±0.06	<0.05 ^b
Total blood cholesterol levels, mmol/L	5.62±0.28	5.39±0.21	5.42±0.27	NS
LDL-cholesterol levels, mmol/L	3.35±0.23	3.06±0.14	3.13±0.21	NS
HDL-cholesterol levels, mmol/L	1.84±0.29	1.74±0.12	1.89±0.13	NS
Plasma uric acid, µmol/L	316.2±21.8	334.3±26.3	-	NS
<i>Inflammation biomarkers</i>				
Plasma fibrinogen levels, g/L	3.43±0.17	3.52±0.20	-	NS
High-sensitivity-C-reactive protein, mg/L	1.4 [0.5-2.9]	1.6 [0.8-5.2]	-	NS
Serum ferritin levels, µg/L	135 [44-249]	78 [35-114]	-	NS
<i>Liver enzymes</i>				
Gamma glutamyltranspeptidase, UI/L	36 [25-44]	17 [12-45]	-	NS
Alanine transaminase, UI/L	20 [18-28]	18 [16-25]	-	NS
Aspartate transaminase, UI/L	21 [19-25]	19 [17-24]	-	NS
<i>MRI Body composition</i>				
VAT, cm ²	146.4±14.9	99.4±11.4	61.5±5.8	<0.05 ^{a,b,c}
TSCAT, cm ²	276.8±27.8	297.7±33.5	167.1±25.2	<0.05 ^{b,c}
VAT/TSCAT	0.63±0.09	0.37±0.04	0.45±0.05	<0.05 ^a
sSCAT, cm ²	124.5±11.6	155.7±23.1	83.7±12.9	<0.05 ^{b,c}
VAT/sSCAT	1.35±0.18	0.80±0.13	0.84±0.09	<0.05 ^a
dSCAT, cm ²	152.3±17.9	142.0±16.1	83.4±14.3	<0.05 ^{b,c}
dSCAT/sSCAT	1.22±0.09	1.09±0.13	0.99±0.11	<0.05 ^b

Data presented as n(%) or mean ± SEM or median [25th percentile, 75th percentile]

NS: Not Significant BMI: Body mass index VAT: Visceral adipose tissue TSCAT: Total subcutaneous adipose tissue sSCAT : Superficial subcutaneous adipose tissue dSCAT : Deep subcutaneous adipose tissue

^a p<0.05 between active and remission groups CS, ^b p<0.05 between active group and controls, ^c p<0.05 between remission group and controls

Figure 1 Flow chart

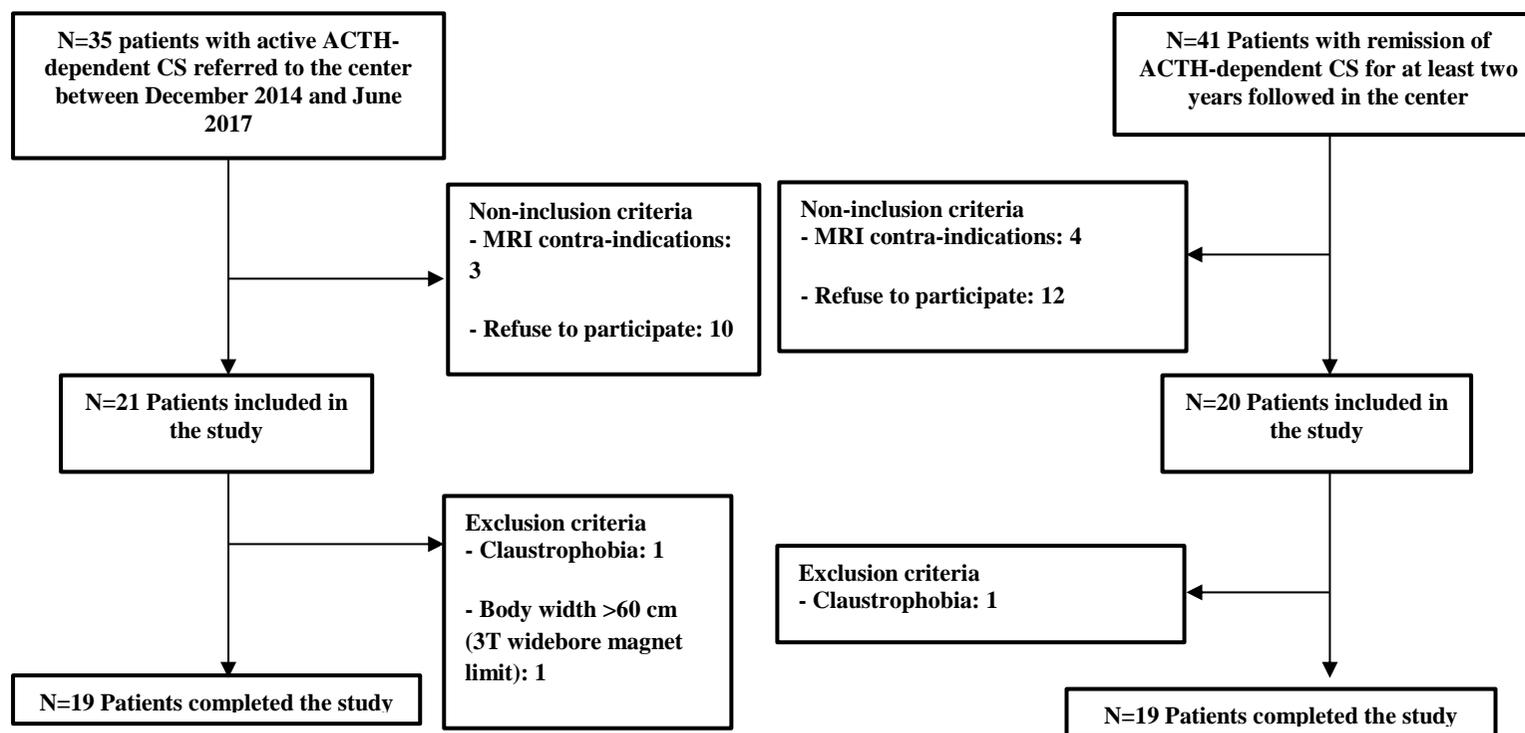


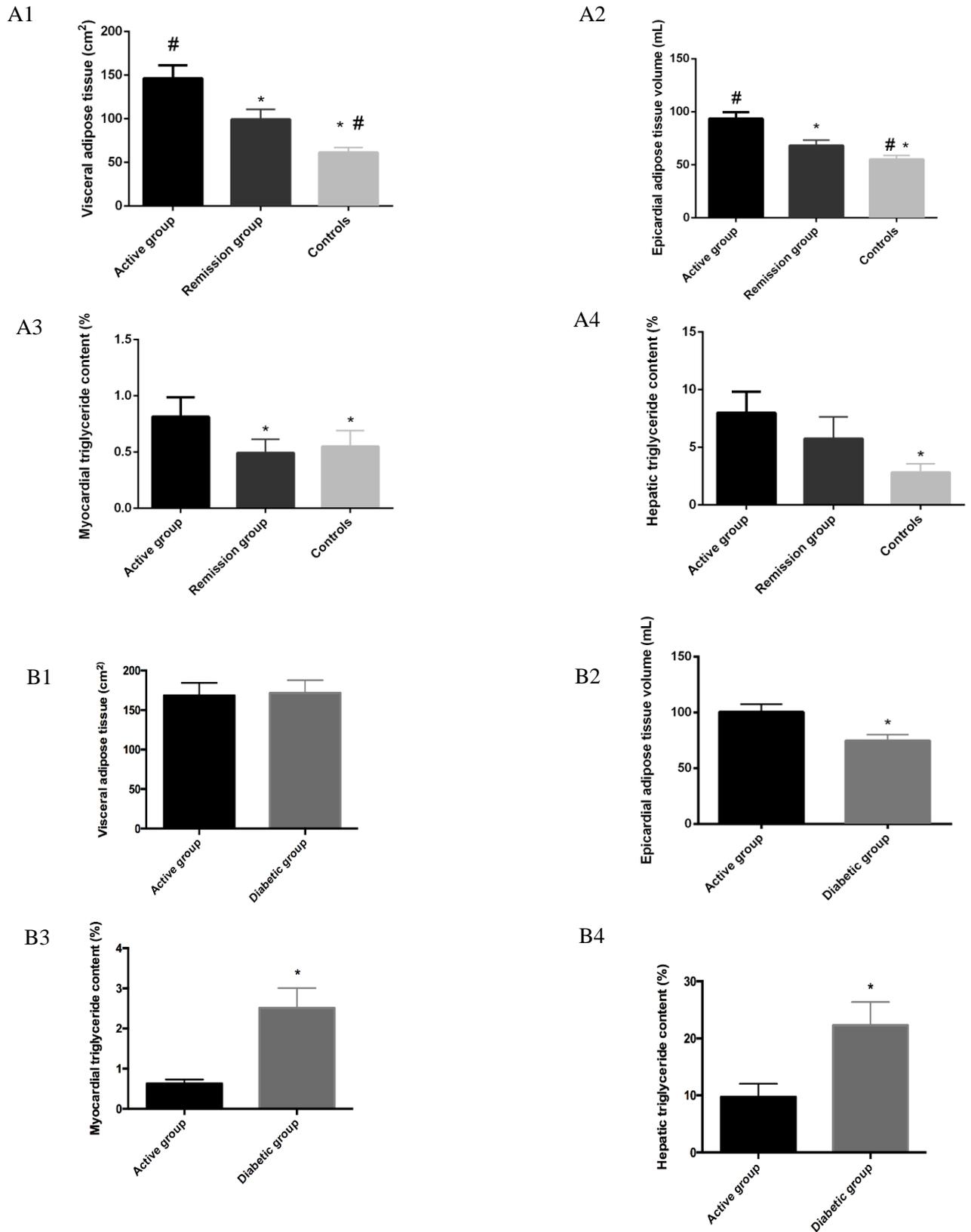
Table 2: Clinical characteristics and abdominal adipose tissue distribution of the population used for comparison with type 2 diabetic patients

	Active Group (n=14)	Diabetic group (n=14)	p value
Gender, female/male, n	9/5	12/2	NS
Age, y	49.7±3.5	49.0±3.4	NS
Comorbidities, n, %			
Hypertension	10 (71.4)	9 (64.3)	NS
Diabetes mellitus	7 (50)	14 (100)	0.006
Impaired glucose tolerance	3 (21.4)	-	-
Hypercholesterolemia	4 (28.6)	9 (64.3)	NS
Smoking, n, %	4 (28.6)	10 (71.4)	NS
Clinical parameters			
BMI, kg/m ²	27.8±1.0	34.6±1.5	<0.001
Waist, cm	101±3	110±3	NS
Hip, cm	103±2	115±3	0.007
Waist/Hip ratio	0.98±0.02	0.96±0.02	NS
Thigh, cm	51±1	59±1	0.001
Waist/Thigh ratio	1.99±0.07	1.90±0.08	NS
Body composition			
VAT, cm ²	168.2±16.3	171.5±16.3	NS
TSCAT, cm ²	296.3±35.2	449.8±36.7	0.006
VAT/TSCAT	0.70±0.12	0.40±0.03	0.069
sSCAT, cm ²	131.4±14.8	247.6±27.7	0.001
VAT/sSCAT	1.53±0.23	0.79±0.09	0.006
dSCAT, cm ²	164.8±22.8	217.1±16.8	NS
dSCAT/sSCAT	1.26±0.12	1.02±0.13	NS

Data presented as n (%) or mean ± SEM or median [25th percentile, 75th percentile]

NS: Not Significant BMI: body mass index VAT: Visceral adipose tissue TSCAT: Total subcutaneous adipose tissue sSCAT : Superficial subcutaneous adipose tissue dSCAT : Deep subcutaneous adipose tissue

Figure 2: Specific ectopic fat accumulation during Cushing Syndrome



A: Comparison between active group, remission group and controls for visceral adipose tissue surface (A1), epicardial adipose tissue volume (A2), myocardial triglyceride content (A3) and hepatic triglyceride content (A4).

B: Comparison between active group and diabetic group for visceral adipose tissue surface (B1), epicardial adipose tissue volume (B2), myocardial triglyceride content (B3) and hepatic triglyceride content (B4).

Data presented as mean \pm SEM

* p < 0.05 compared to active group # p < 0.05 compared to remission patients

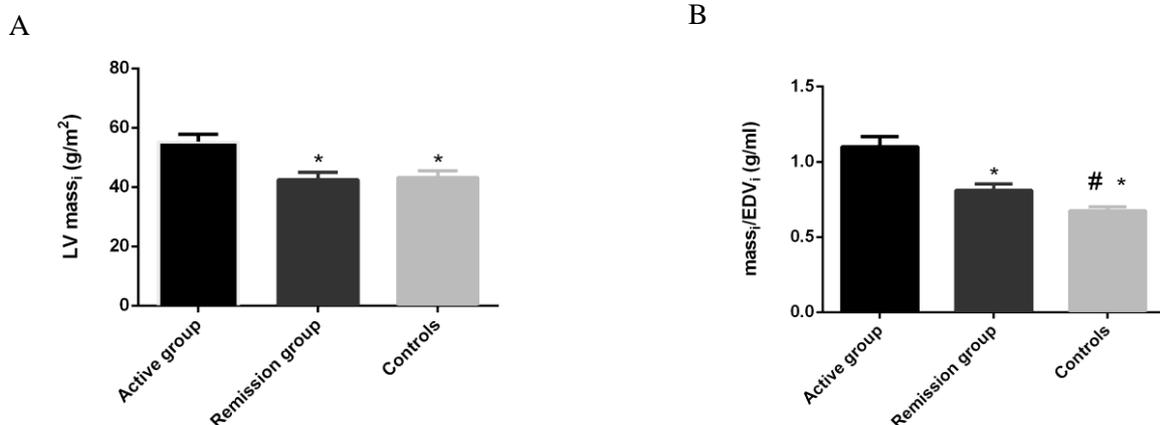
Table 3: Left ventricular morphology and function in the studied population

	Active group (n=19)	Remission group (n=19)	Controls (n=19)	p value
<i>LV dimensions and systolic function</i>				
Ejection fraction, %	73.06±2.37	72.32±1.78	69.1±1.25	NS
End-diastolic volume index, ml/m ²	53.13±3.55	53.09±2.50	64.04±2.47	<0.05 ^{b,c}
End-systolic volume index, ml/m ²	14.92±1.87	14.86±1.33	19.76±1.04	<0.05 ^{b,c}
Stroke volume index, ml/m ²	38.22±2.53	38.21±1.98	44.30±2.02	<0.05 ^c
Cardiac index, L/min/m ²	2.80±0.17	2.62±0.14	2.97±0.14	<0.05 ^c
LV Mass index, g/m ²	55.3±2.6	42.4±2.6	43.2±2.3	<0.05 ^{a,b}
LV Mass to end-diastolic volume g/mL	1.10 ±0.07	0.81± 0.04	0.68±0.03	<0.05 ^{a,b,c}
<i>LV diastolic function</i>				
E/A ratio	1.34±0.07	1.59±0.10	1.66±0.09	<0.05 ^b
E-wave deceleration time ,ms	148.8±13.9	190.4±16.8	172.4±7.9	NS
E/Ea ratio	3.85±0.47	3.25±0.48	4.02±0.58	NS
Left atrial area, cm ²	19.25±0.89	17.67±0.80	19,07±1.48	NS

Data presented as mean ± SEM

^a p<0.05 between active and remission groups, ^b p<0.05 between active group and controls, ^c p<0.05 between remission group and controls

Figure 3: Hypercortisolism induces concentric remodeling of the left ventricle



A Left ventricular mass index (g/m²) compared between active group, remission group and controls.

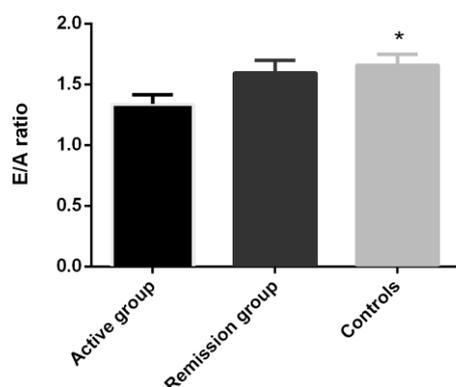
B Mass to end-diastolic volume index ratio (g/ml) compared between active group, remission group and controls.

Data presented as mean ± SEM

* p<0.05 compared to active group

#p<0.05 compared to remission group

Figure 4: Hypercortisolism induces LV diastolic dysfunction



E/A ratio compared between active group, remission group and controls.

Data presented as mean ± SEM* p<0.05 compared to active group

Online Table 1: Correlation analysis between LV parameters and main clinical, biological data and ectopic fat stores

	Left ventricular mass index		Mass to end-diastolic volume		E/A	
	r	p	r	p	r	p
<i>Markers of hypercortisolism severity</i>						
Duration of uncontrolled CS (active patients)	-0.09	0.703	0.21	0.398	0.28	0.289
Duration of uncontrolled CS (patients in remission)	0.32	0.164	0.05	0.825	0.25	0.415
Duration of hydrocortisone supplementation	0.21	0.376	0.25	0.292	-0.35	0.237
UFC levels (for active patients)	0.71	0.002	-0.12	0.646	0.07	0.802
<i>Clinical parameters</i>						
Body mass index	0.28	0.276	0.39	0.015	-0.27	0.154
Systolic blood pressure	0.26	0.125	0.12	0.475	0.04	0.825
Diastolic blood pressure	0.38	0.021	0.30	0.069	0.09	0.641
<i>Glucose profile</i>						
Blood glucose area under curve	0.38	0.028	0.41	0.018	-0.43	0.035
HbA _{1c}	0.32	0.126	0.27	0.206	-0.56	0.010
<i>Lipid profile</i>						
Serum triglyceride levels	0.43	0.007	0.45	0.006	-0.22	0.266
Total cholesterol levels	-0.17	0.322	-0.15	0.376	0.08	0.675
LDL-cholesterol	-0.15	0.375	-0.11	0.513	0.01	0.973
HDL-cholesterol	-0.37	0.022	-0.47	0.003	0.28	0.140
<i>Ectopic fat stores</i>						
Visceral adipose tissue	0.48	0.003	0.53	<0.001	-0.43	0.022
Epicardial adipose tissue	0.54	<0.001	0.45	0.005	-0.43	0.019
Myocardial triglyceride content	0.18	0.310	0.22	0.220	-0.14	0.503
Hepatic triglyceride content	0.32	0.057	0.39	0.019	-0.50	0.006

Central illustration. General scheme representing specific ectopic fat deposition in Cushing syndrome compared to type 2 diabetes paired for VAT.

