



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

INCI-UPR 3212

THÈSE

Présentée par

Pauline CROISE

Soutenue le **09 Janvier 2015**

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Sciences du vivant

Sécrétion des phéochromocytomes : impact sur le développement tumoral et rôle des GTPases Rho

THÈSE dirigée par :

Mr le Dr. Stéphane GASMAN (Université de Strasbourg)

RAPPORTEURS :

Mme le Dr. Maité HADJADJE-MONTERO (Université de Rouen)

Mr le Dr. Frédéric SALTEL (Université de Bordeaux)

EXAMINATEURS :

Mme le Dr. Catherine-Laure TOMASETTO (Université de Strasbourg)

Mr le Dr. Laurent BRUNAUD (Université de Nancy-Brabois)

MEMBRE INVITÉ :

Mr le Dr. Stéphane ORY (Université de Strasbourg)

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier **Marie-France Bader** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pour réaliser ma thèse. J'ai beaucoup apprécié la relation de confiance qui s'est créée et qui a permis à l'équipe de doctorants dont je faisais partie, d'organiser de nombreux évènements « Doctoneuros ».

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, **Catherine-Laure Tomasetto**, **Frédéric Saltel**, **Maité Hadjadje-Montero** et **Laurent Brunaud**. Je suis très reconnaissante du temps que vous m'avez consacré et de l'intérêt que vous avez porté à mon travail.

Un grand merci à **Stéphane Gasman**, mon directeur de thèse, d'avoir encadré mon projet de thèse. Merci pour ta rigueur, tes conseils et tout le temps passé à la relecture des nombreux documents. J'ai été très sensible à tes qualités humaines : tu es à l'écoute de tes doctorants, compréhensif quant à leurs questionnements...il fait bon vivre dans la Gas Team ! Et 主な訳語 (arigato gosaimasu) pour la découverte du saké chaud !

Merci infiniment à **Stéphane Ory**, mon directeur de thèse « non officiel », pour tout : de l'encadrement à la paillassé aux débats scientifiques. Merci pour ta disponibilité, ta patience incroyable et ton optimisme débordant ! En période de doute sur mon travail, les discussions avec « Papa Ory », m'ont toujours redonné confiance !

Merci à **Valérie Calco**, pour toutes les connaissances que tu m'as apportées, sur la culture cellulaire, les clonages, et j'en passe ! Quelques galères de manip (ces primers qui ne veulent pas amplifier et ce cytomètre qui nous en a fait voir de toutes les couleurs !) mais surtout beaucoup de fous rires partagés en pause café avec le grand blond. Et je crois que je préfère retenir les fous rires ;)

Un grand merci à **Petra Tryoen**, pour ton humilité et ta bonne humeur. Je te remercie de m'avoir donné le goût de l'enseignement et j'ai été ravie de travailler avec toi, Ginette et ses copines punks, dans une ambiance riche en isoflurane !

J'adresse également un remerciement à toutes les personnes qui ont permis de mener à bien mon travail : **Sophie Reibel-Foisset, Nicolas Lethenet, Mohamed Banni** et **Laurence Huck** pour votre aide précieuse dans mon projet xénogreffes ; **Adrien Lacaud** pour ta disponibilité et ta capacité à dompter l'appareil de qPCR ; **Anne-Marie Haerberle** pour la microscopie électronique et **Denis Wagner**, qui a sauvé la vie de mon ordinateur (et la mienne par la même occasion) à plusieurs reprises !

Enfin, merci à toute l'équipe de Rouen INSERM U982, **Marion, Christophe** et **Maité**, pour cette « collaboration xéno » riche en rebondissements !

Je tiens aussi à remercier tous les membres de l'équipe « Gasman-Vitale », **Gabi, Nancy, Sylvette, Claudine, Tam, Cathy, Nicolas** et **Marion**, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à partager mes trois ans de thèse.

Merci aux doctorants (et amis) du laboratoire, **Marion, Anaïs, Elise, David**, et **Audrey**, pour tous les moments partagés au laboratoire et surtout en dehors du laboratoire ! Un merci particulier à **Edith** pour avoir partagé ce moment tant redouté de la rédaction ! Merci également à tous les anciens doctorants du laboratoire : **Antoine, Laetitia, Joseph** et **Alex**. Je tiens à remercier particulièrement le « grand blond », **Sébastien**, qui m'a permis une intégration éclairée dans l'organisation des rencontres du vendredi !

Je remercie aussi tous mes amis Nantais, Strasbourgeois et Parisiens pour leur soutien, avec une pensée particulière pour **Marine, Marion, Basile, Manale, Tristan** et **Toto**.

Un merci tout particulier à **Julien** d'avoir fait semblant d'être intéressé lorsque je me lançais avec passion dans l'histoire des phéochromocytomes et des GTPases Rho.

Pour finir, merci infiniment à mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu réaliser ces nombreuses années d'études ! Un grand merci également à mon frère et ma sœur, **Sylvain** et **Mathilde**, pour votre soutien inconditionnel.

LISTE DES ABREVIATIONS

A-C

| | |
|-------------|---------------------------|
| α KG | α ketoglutarate |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ARN | Acide ribonucléique |
| CgA, CgB | Chromogranine A, B |

D-F

| | |
|-------|-------------------------------------|
| Dbl | Diffuse B-cell Lymphoma |
| DH | Dbl Homology |
| DLC | Deleted in Liver Cancer |
| FH | Fumarate Hydroxylase |
| ELISA | Enzyme-linked Immunosorbent assay |
| EGFR | Récepteur de croissance épidermique |

G-I

| | |
|------------|--|
| GAP | GTPase Activating Protein |
| GDI | Guanine Dissociation Inhibitor |
| GDP | Guanosine diphosphate |
| GEF | Guanine nucleotide Exchange Factor |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| hGH | Hormone de croissance humaine |
| HIF, HIF2A | Hypoxia Inducible Factor, Hypoxia Inducible Factor2A |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique |
| ITSN-1L | Intersectine, forme longue |

J-L

| | |
|------|----------------------------|
| LARG | Leukemia Associated RhoGEF |
|------|----------------------------|

M-O

| | |
|----------------|--|
| MantGTP | N-methylanthraniloyl-GTP |
| MAX | Myc-Associated factor X |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| NEM2 A et B | Néoplasie endocrinienne multiple de type 2, A et B |
| NF1 | Neurofibromin ; Neurofibromatose de type 1 |
| NF- κ B | Nuclear Factor-kappaB |

P-R

| | |
|-----|---------------------------|
| PCR | Polymerase chain reaction |
|-----|---------------------------|

| | |
|----------|--|
| PGL | Paragangliome |
| PH | Pleckstrin Homology |
| PHD1,2,3 | Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein 1,2,3 |
| PHEO | Phéochromocytome |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4-5-diphosphate |
| PNMT | Phenylethanolamine-N-Methyl-Transferase |
| Ras | Rat Sarcoma |
| RCPG | Récepteurs Couplés aux Protéines G |
| RE | Réticulum endoplasmique |
| REST | RE-1 Silencing Transcription Factor |
| RET | Rearranged during Transcription |
| Rho | Ras Homologous |
| RRP | Readily Releasable Pool |

S-U

| | |
|----------------|--|
| SDH A, B, C, D | Succinate déshydrogénase, sous unité A, B, C, D |
| SDHAF2 | SDH complex Assembly Factor 2 |
| SgII, SgIV | Sécrétogranine II, IV |
| SNAP25 | Synaptosomal Associated Protein 25 |
| SNARE | Soluble Néthylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor |
| SRP | Slowly Releasable Pool |
| SyT | Synaptotagmine |
| TEM | Transition épithélio-mésenchymateuse |
| TeNT | Toxines tétaniques |
| TfR | Récepteur à la transferrine |
| TGN | RéseautransGolgien |
| Tiam1 | Tcell Invasion And Metastasis 1 |
| TIMPs | Tissus Inhibitor of Metalloprotéinases |
| TMEM127 | Transmembrane protein 127 |
| TNE | Tumeur neuroendocrine |
| TUNEL | Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling |
| UPP | UnPrimed Pool |

V-Z

| | |
|-------|---------------------------------------|
| VAMP2 | Vesicle-Associated Membrane Protein 2 |
| VEGF | Vascular Endothelium Growth factor |
| VHL | Von Hippel Lindau |
| VMAT | Vesicular Monoamine Transporter |

SOMMAIRE

| | |
|-------------------|---|
| AVANT-PROPOS..... | 1 |
|-------------------|---|

CHAPITRE UN

| | |
|---|----------|
| Rôle de la sécrétion neuroendocrine dans le développement tumoral..... | 4 |
|---|----------|

| | |
|--------------------|---|
| INTRODUCTION | 5 |
|--------------------|---|

| | |
|--|----|
| 1. Généralités sur le système neuroendocrine | 5 |
| 1.1. Les cellules neuroendocrines..... | 5 |
| 1.2. Le réseau de tumeurs neuroendocrines..... | 8 |
| 2. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale | 9 |
| 2.1. Anatomie de la médullosurrénale | 9 |
| 2.2. Processus de sécrétion dans les cellules chromaffines | 12 |
| 2.3. Physiologie des catécholamines médullaires | 24 |
| 3. Les phéochromocytomes | 26 |
| 3.1. Généralités..... | 26 |
| 3.2. Diagnostic | 28 |
| 3.3. Génétique | 29 |
| 3.4. Thérapeutique | 36 |
| 3.5. Prise en charge des PHEO/PGL malins..... | 37 |

| | |
|----------------|----|
| RÉSULTATS..... | 38 |
|----------------|----|

| | |
|---|----|
| 1. Rappels des Objectifs | 38 |
| 2. Étude du rôle de la sécrétion dans la croissance tumorale | 38 |
| 2.1. Modèles expérimentaux utilisés..... | 38 |
| 2.2. Comparaison de la croissance tumorale des cellules PC12, C-27 et A35C <i>in vivo</i> | 42 |
| 2.3. Mise au point d'un modèle cellulaire non sécrétant dépourvu de la Chromogranine A | 45 |
| 2.4. Comparaison de la croissance tumorale des cellules PC12 ^{CgA(1)-} et PC12 ^{CgA(2)-} <i>in vivo</i> | 49 |
| 2.5. Corrélation entre l'activité sécrétrice et la croissance tumorale | 51 |

| | |
|------------------|----|
| DISCUSSION | 53 |
|------------------|----|

| | |
|---|----|
| 1. Approches méthodologiques utilisées..... | 53 |
| 1.1. Modèle de xénogreffes et étude de la sécrétion régulée | 53 |
| 1.2. Le challenge du « phénotype non sécrétant » | 54 |
| 2. L'hypersécrétion peut influencer la croissance des PHEO..... | 61 |

| | |
|--|----|
| 2.1. Origines mécanistiques de l'hypersécrétion | 61 |
| 2.2. Rôle des catécholamines dans la croissance tumorale | 63 |
| 2.3. Rôles des granines dans la croissance tumorale | 65 |

CHAPITRE DEUX

Rôles des GTPases Rho et de leurs régulateurs dans les PHEO

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| 1. Généralités sur les GTPases de la famille Rho | 68 |
| 1.1. La superfamille Ras | 68 |
| 1.2. Les protéines de la famille Rho | 69 |
| 2. Les voies régulatrices des GTPases Rho | 75 |
| 2.1. Les facteurs d'échange nucléotidiques (GEF) | 75 |
| 2.2. Les protéines activant l'hydrolyse du GTP (GAP) | 80 |
| 2.3. Les protéines inhibitrices de la dissociation des guanines (GDI) | 81 |
| 3. Fonctions et rôles des GTPases Rho | 83 |
| 3.1. Les GTPases Rho, protéines multifonctionnelles | 83 |
| 3.2. Les GTPases Rho et le trafic vésiculaire | 86 |
| 3.3. Implication des GTPases Rho dans les cancers | 90 |

RÉSULTATS

| | |
|--|-----|
| 1. Rappels des objectifs | 99 |
| 2. Etude des GTPases Rho et de leurs régulateurs dans les PHEO | 99 |
| 2.1. Modèle expérimental utilisé | 99 |
| 2.2. Modulation de l'activité et de l'expression des GTPases Rho | 100 |
| 2.3. Modulation des voies régulatrices des GTPases Rho | 101 |
| 2.4. Etude de la spécificité des régulateurs envers les GTPases Rho | 105 |
| 2.5. La modulation d'ARHGEF1 et de FARP1 est-elle spécifique des PHEO humains ? | 107 |
| 2.6. Effet de la modulation de FARP1 et ARHGEF1 sur la sécrétion <i>in vitro</i> | 109 |
| 2.7. Conclusion | 109 |

DISCUSSION

| | |
|--|-----|
| 1. Approche méthodologique utilisée | 111 |
| 2. Inhibition de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans les Phéo | 113 |
| 2.1. Modulation de l'activité de Rac1 et Cdc42 par FARP1 et ARHGEF1 | 113 |
| 2.2. Rôles de la diminution de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO | 120 |
| 2.3. Quel(s) rôle(s) pour ARHGAP36 ? | 122 |
| 2.4. GTPases Rho, régulateurs et sécrétion : quel lien potentiel ? | 123 |

| | |
|--|-----|
| CONCLUSION GÉNÉRALE | 126 |
| MATERIEL ET METHODES | 127 |
| 1. Matériel utilisé | 127 |
| 1.1. Outils de biologie moléculaire | 127 |
| 1.2. Lignées cellulaires | 128 |
| 1.3. Echantillons de PHEO humains | 130 |
| 2. Méthodes et techniques d'analyse | 132 |
| 2.1. Quantification par PCR en temps réel (RTqPCR) | 132 |
| 2.2. Mesure de l'activité sécrétrice des cellules <i>in vitro</i> | 133 |
| 2.3. Dosage de la chromogranine A par Western Blot | 136 |
| 2.4. Dosage de l'activité des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 | 137 |
| 2.5. Mesure de la vitesse de prolifération <i>in vitro</i> | 139 |
| 2.6. Mesure de la vitesse de prolifération en absence d'adhérence | 139 |
| 2.7. Xénogreffes sous-cutanées de cellules PC12 chez des souris Nude | 140 |
| 2.8. Analyse ultrastructurale en microscopie électronique | 141 |
| 2.9. Immunofluorescence et microscopie confocale | 142 |
| 2.10. Analyse protéomique des échantillons de PHEO humains | 143 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 145 |
| ANNEXES | 171 |

AVANT-PROPOS

Le système neuroendocrine régule de multiples fonctions de l'organisme, *via* la sécrétion d'hormones et de neuropeptides dans la circulation sanguine. La sécrétion est assurée par un processus d'exocytose régulé par le calcium au cours duquel des granules de sécrétion, qui stockent ces hormones et neuropeptides, s'acheminent vers la périphérie cellulaire pour fusionner avec la membrane plasmique et libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. Cet évènement est rapidement suivi par un mécanisme d'endocytose compensatrice qui permet de recapturer et recycler la membrane des granules de sécrétion. Ce cycle permanent et hautement régulé d'exocytose-endocytose assure le bon fonctionnement de la sécrétion neuroendocrine.

Malheureusement, des tumeurs sont susceptibles de naître à partir de chaque cellule, tissu ou glande neuroendocrines. L'ensemble de ces tumeurs est regroupé sous le terme de tumeurs neuroendocrines et sont caractérisées par leur capacité à sécréter des hormones. Bien que constituant un groupe très hétérogène, la plupart des tumeurs neuroendocrines sont associées à une perturbation du processus de sécrétion, le plus souvent une hypersécrétion. Cependant, les mécanismes moléculaires qui induisent de telles perturbations de la sécrétion ainsi que l'impact de l'activité sécrétrice sur le développement des tumeurs neuroendocrines ne sont actuellement pas élucidés.

L'équipe du Dr. Stéphane Gasman s'attache depuis plusieurs années à étudier les mécanismes moléculaires qui régissent et contrôlent la sécrétion neuroendocrine en utilisant les cellules chromaffines de la glande surrénale comme modèle expérimental. En octobre 2011, j'ai obtenu une allocation doctorale ministérielle dans cette équipe afin de participer à un nouveau projet visant à explorer les causes et les conséquences du dysfonctionnement de la sécrétion dans les tumeurs neuroendocrines. Etant donné son expertise dans les mécanismes qui régulent le cycle d'exo-endocytose des granules de sécrétion dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale, l'équipe a choisi d'utiliser les tumeurs dérivant de ces cellules, les phéochromocytomes, comme modèle d'étude des tumeurs neuroendocrines.

Les données antérieures de l'équipe ont montré que la sécrétion hormonale par les cellules chromaffines de la médullosurrénale est étroitement régulée par les GTPases de la famille Rho, et notamment RhoA, Rac1 et Cdc42. Lorsque je suis arrivée en doctorat, j'ai tout d'abord débuté un projet visant à élucider le rôle potentiel d'un nouvel acteur de la famille des GTPases, la GTPase RhoU, au cours de la sécrétion, dans les cellules chromaffines de glandes surrénales saines et tumorales. J'ai mené de front plusieurs stratégies et approches expérimentales pendant les premiers mois de ma thèse mais les résultats obtenus se sont avérés peu concluants. En plus des nombreuses difficultés techniques rencontrées, nous avons conclu que RhoU n'est probablement pas impliquée dans la régulation de la sécrétion dans les cellules chromaffines. Cependant, en collaboration avec Olga Gubar, une doctorante de l'équipe, nous nous sommes rendu compte que RhoU était importante pour certaines étapes du trafic vésiculaire intracellulaire et nous avons pu proposer que, conjointement avec l'intersectine, RhoU joue un rôle dans le recyclage des endosomes. Bien que ce projet se soit finalement éloigné de son objectif de départ, ces résultats seront très prochainement soumis à publication dans un article que je signe en co-premier auteur avec Olga Gubar et que vous pouvez lire en Annexe. Après environ neuf mois de travail, j'ai abandonné l'idée d'un rôle de RhoU dans la sécrétion hormonale et les tumeurs neuroendocrines et j'ai recentré mon travail de thèse autour de deux grands axes. La première partie de mon projet vise à étudier l'impact de la sécrétion sur le développement des phéochromocytomes tandis que la deuxième partie est dédiée à l'étude des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 et de leurs voies régulatrices dans les phéochromocytomes humains. Ce sont ces deux aspects de mon travail que j'ai choisi de détailler dans ce mémoire de thèse.

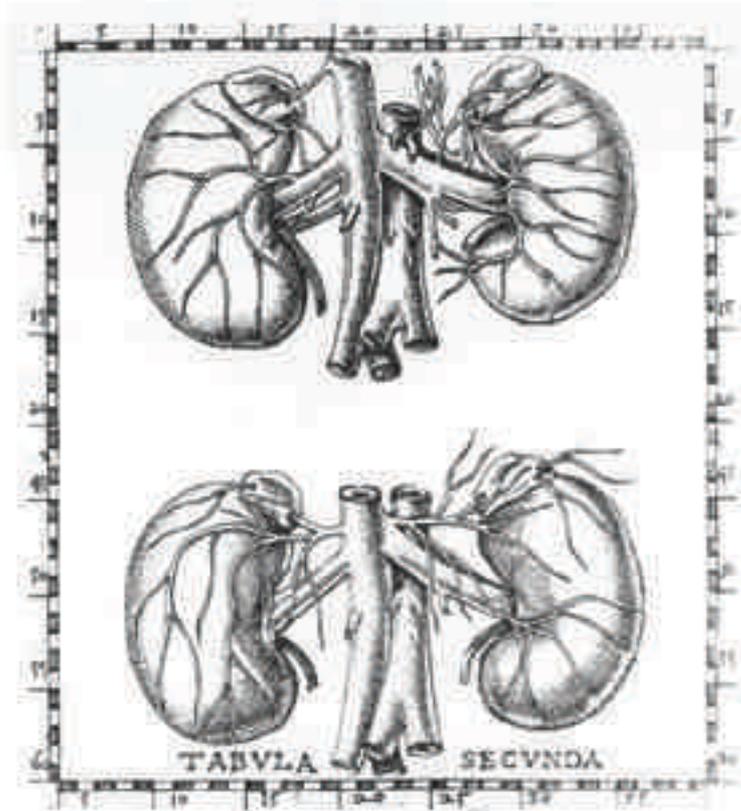
Mon manuscrit est organisé en deux grands chapitres. Dans le premier chapitre intitulé « Rôle de la sécrétion neuroendocrine dans le développement tumoral », une introduction générale est consacrée au système neuroendocrine afin de présenter le réseau de cellules neuroendocrines et les tumeurs qui en dérivent. Je poursuis ensuite cette introduction avec la présentation des cellules chromaffines de la médullosurrénale, mon modèle d'étude. Après une description anatomique et histologique de la glande médullosurrénale, je décris la fonction de sécrétion dans les cellules chromaffines en présentant brièvement les différentes étapes du processus d'exocytose régulée. Enfin, j'y décris les phéochromocytomes, en insistant sur les données actuelles concernant le diagnostic, la

génétique, la tumorigénèse et la thérapeutique de ces cancers. Dans la seconde partie de ce chapitre, je présente mes résultats concernant l'impact potentiel de l'activité sécrétrice sur le développement des phéochromocytomes avant de poursuivre par une discussion des données obtenues. Le deuxième chapitre est dédié à mes données concernant les GTPases Rho et leurs régulateurs dans les phéochromocytomes humains. Je démarre ce chapitre par une introduction dans laquelle je présente les propriétés générales de la famille des GTPases Rho ainsi que les différentes protéines qui régulent leur cycle d'activation et d'inactivation. J'ai également profité de cette partie pour faire un aparté sur le rôle de la GTPase RhoU sur laquelle j'ai travaillé. Enfin, je termine cette introduction en décrivant les fonctions connues des GTPases Rho, en me focalisant sur leur implication dans l'exocytose régulée et les processus de tumorigénèse. La partie résultat est consacrée à mes données concernant la modulation des voies de régulation des GTPases Rho dans les phéochromocytomes humains, et est suivie d'une discussion des données obtenues.

A la fin de ces deux chapitres, je propose une conclusion générale de mes travaux de thèse, suivie d'une partie qui décrit le matériel et les méthodes utilisés au cours de mon projet. Enfin, en annexe de ce manuscrit, vous trouverez la liste de l'ensemble de mes publications et interventions relatives à ma formation doctorale. J'y ai également joint l'ensemble des articles et revues rédigés auxquels j'ai contribué pendant mes trois ans de doctorat avec une brève introduction pour chacun d'entre eux.

Je vous souhaite une agréable lecture.

Rôle de la sécrétion neuroendocrine dans le développement tumoral



Bartholomeus Eustachius (1520-1574)

INTRODUCTION

1. Généralités sur le système neuroendocrine 5
2. Les cellules chromaffines de la médullosurrénale 9
3. Les phéochromocytomes 26

RÉSULTATS

1. Rappels des objectifs 38
2. Etude du rôle de la sécrétion dans la croissance tumorale 38

DISCUSSION

1. Approches méthodologiques utilisées 53
2. L'hypersécrétion peut influencer la croissance des PHEO 61

1. GÉNÉRALITÉS SUR LE SYSTEME NEUROENDOCRINE

1.1. Les cellules neuroendocrines

La majorité des cellules de notre organisme libère des protéines et autres composés biologiques *via* un processus cellulaire fondamental, la sécrétion constitutive, permettant l'approvisionnement et le renouvellement des membranes. En plus de cette fonction ubiquitaire, des cellules spécialisées telles que les cellules neuroendocrines possèdent un système de sécrétion hautement contrôlé par des signaux extracellulaires. Ce processus, appelé sécrétion régulée, permet une réponse appropriée à la demande de l'organisme. De cette façon, le système neuroendocrine contrôle de nombreuses fonctions physiologiques en libérant dans la circulation sanguine des hormones et neuropeptides qui vont agir spécifiquement sur des organes cibles.

De par leur organisation anatomique, mais aussi par leur origine et leurs rôles biologiques divers, les cellules neuroendocrines constituent un groupe extrêmement hétérogène. Pourtant, si elles peuvent être classées sous la même dénomination de « cellules neuroendocrines », c'est parce qu'elles partagent des propriétés biochimiques, cytologiques et sécrétoires communes.

1.1.1. Localisations et origines embryologiques diverses

Le réseau de cellules neuroendocrines a été décrit pour la première fois au 19^{ème} siècle, dans le revêtement épithélial de l'estomac et de l'intestin (*R. Heidenhain, 1870*). Par la suite, la mise en évidence de cellules par des colorations argentiques dans de nombreux organes comme la thyroïde, le thymus ou encore l'appareil respiratoire a conduit Friedrich Feyrther à décrire un « système diffus » (*F. Feyrter 1938*). En effet, la présence des cellules neuroendocrines dans l'organisme adulte est ubiquitaire et contrairement aux cellules endocrines, les cellules neuroendocrines ne sont pas toujours confinées dans des organes. Ainsi, une partie des cellules neuroendocrines forme des organes, tels que l'hypothalamus ou la médullosurrénale tandis qu'une partie est dispersée à l'intérieur d'un organe ou tissu,

formant le système neuroendocrine diffus. Ce sont les cellules neuroendocrines associées à la thyroïde ou au tube digestif par exemple (Scaozec, 2005) (FIGURE 1). Il est communément admis, à la suite des travaux de N. Le Douarin et collaborateurs sur les chimères embryonnaires, que les cellules neuroendocrines digestives, pancréatiques et pulmonaires sont d'origine endodermiques alors que les cellules thyroïdiennes et les cellules de la médullosurrénale dérivent de la crête neurale (Montuenga et al., 2003; Le Douarin et al., 2008).

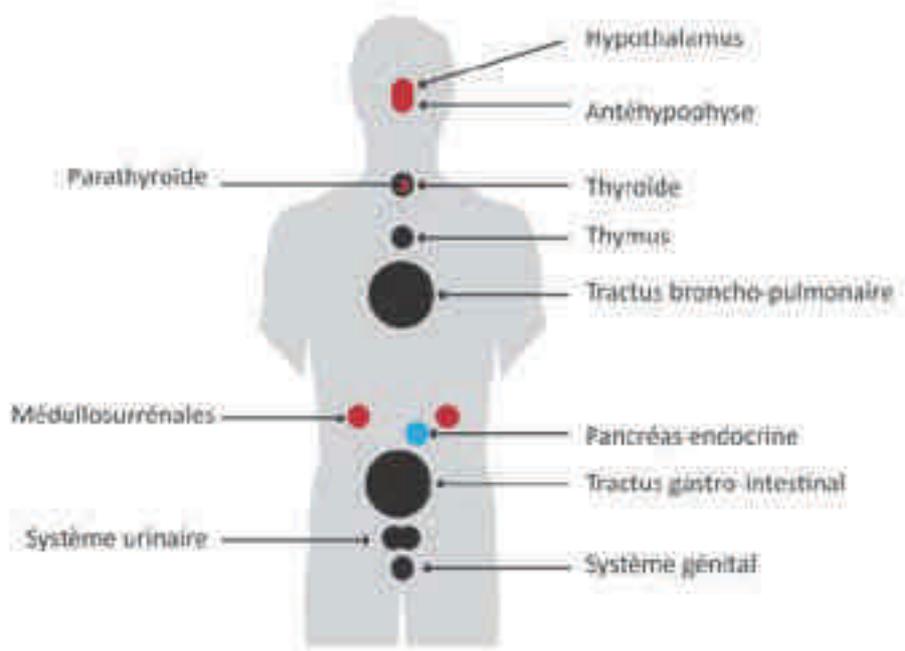


FIGURE 1. Le système neuroendocrine. Localisation des cellules neuroendocrines dans l'organisme humain. Rouge : cellules formant des organes ou des parties d'organes ; bleu : cellules individualisées à l'intérieur d'un organe ; noir : cellules dispersées à l'intérieur d'un organe ou tissu.

1.1.2. Des propriétés fonctionnelles et phénotypiques communes

Bien que d'origines diverses et dispersées dans l'ensemble de l'organisme, la fonction intrinsèque commune à l'ensemble des cellules neuroendocrines est de stocker et sécréter des hormones et neuropeptides. Dans les années 1970, Pearse et Takor ont montré que ces cellules partageaient la capacité biochimique de capter des précurseurs d'amines, ce qui les a conduit à les regrouper dans un ensemble appelé APUD (Amine Precursor Uptake and Subsequent Decarboxylation) (Pearse and Takor, 1976). En effet, il est couramment admis que toutes les cellules neuroendocrines sécrètent des hormones de nature peptidiques ou dérivés d'amines (TABLEAU 1). Stockées à l'intérieur de la cellule dans des granules de sécrétion, elles sont libérées par un processus d'exocytose régulée.

Le concept de neurosécrétion a été proposé pour la première fois dans les années 1930 par Ernst et Bertha Scharrer après avoir découvert que les neurones de l'hypothalamus présentaient des propriétés sécrétrices (*Scharrer, 1954*). Durant les dernières décennies, de nombreuses caractéristiques cytologiques et biochimiques partagées par les neurones et les cellules endocrines ont été identifiées, conduisant à l'émergence du terme « phénotype neuroendocrine », caractérisé par l'expression de marqueurs neuroendocrines. Plusieurs groupes de marqueurs neuroendocrines peuvent être cités : les marqueurs vésiculaires tels que la synaptophysine, les marqueurs cytosoliques comme l'énolase spécifique des neurones, les marqueurs associés aux grains de sécrétion, tels que les chromogranines et enfin les marqueurs membranaires, le mieux connu étant N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molécule) (*Montuenga et al., 2003*). Notons que certains de ces marqueurs sont utilisés pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines.

| Cellules/organes | Hormones et peptides sécrétés |
|--|---|
| Hypophyse | ACTH, LH, FSH, PRL, TSH, MSH, catécholamines, calcitonine |
| Médullosurrénale, cellules crêtes neurales | Catécholamines, enképhalines, VIP, SRIF |
| Pancréas | Insuline, glucagon, SRIF, PP, VIP, gastrine, catécholamines, sérotonine |
| Tractus gastro-intestinal | Gastrine, SRIF, GRP, VIP, PP, sécrétine, enteroglucagon, catécholamines, sérotonine, insuline, cholécystokinine, glucagon |
| Tractus broncho-pulmonaire | GRP, ACTH, b-endorphine, calcitonine, catécholamines, sérotonine |
| Thyroïde, cellules C | Calcitonine, SRIF, ACTH, CGRP, catécholamines |
| Parathyroïde | PTH, catécholamines |
| Tractus biliaire et foie | Sérotonine, catécholamines, peptides |
| Cellules Merkel de la peau | Calcitonine, catécholamines, PP, VIP |
| Cellules sein, prostate, rein, ovaire... | Divers peptides, sérotonine, catécholamines |

TABLEAU 1. Diversité des composés sécrétés par les cellules neuroendocrines. Malgré leurs propriétés communes, un grand nombre de composés est sécrété par les cellules neuroendocrines. Abréviations : ACTH=AdenoCorticoTrophic Hormone ; LH=Luteinizing Hormone ; FSH=Follicle Stimulating Hormone ; PRL=Prolactin ; TSH=Thyroid Stimulating Hormone ; MSH=Melanocyte Stimulating Hormone ; VIP=Vasoactif Intestinal Peptide ; SRIF=Somatotropine Release Inhibiting Factor ; PP=Pancreatic Polypeptide ; GRP=Gastrin Release Peptide ; CGRP=Calcitonin Gene Related Peptide ; PTH=ParaThyroid Hormone.

1.2. Le réseau de tumeurs neuroendocrines

Les tumeurs neuroendocrines (TNE) regroupent l'ensemble des tumeurs dérivant des cellules neuroendocrines de l'organisme. Leur localisation très variée comprend les tumeurs de l'antéhypophyse, thyroïde, parathyroïde, thymus, poumons, pancréas, tube digestif, médullo-surrénale et paraganglions, mais aussi de la peau, prostate, ovaires, ou encore du col utérin. Une diversité est aussi observée au niveau de leurs profils évolutifs. Même si la grande majorité présente une évolution lente et locale, certaines TNE se comportent comme des tumeurs malignes, avec des capacités de dissémination métastatiques et pouvant entraîner une évolution fatale. Cette hétérogénéité engendre une grande difficulté quant à la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de ces cancers.

Cependant, les TNE présentent des caractéristiques communes, puisque les cellules tumorales neuroendocrines conservent l'expression des marqueurs neuroendocrines ainsi que la capacité à stocker et sécréter des hormones. Ainsi, la majorité des TNE produisent et sécrètent un grand nombre d'hormones peptidiques et d'amines et sont associées à une hypersécrétion hormonale (*Lamberts et al., 2001; Gratzl et al., 2004*). Par exemple, un carcinome gastro-intestinal dérivant de cellules entérochromaffines est lié à une hypersécrétion de sérotonine et de gastrine (*Onaitis et al., 2000*). Une libération excessive de catécholamines est caractéristique des phéochromocytomes tandis qu'un adénome corticotrope hypophysaire entraîne généralement une hypersécrétion de corticotropine (*Lenders et al., 2005; De Martin et al., 2006*). Cette hypersécrétion hormonale, à l'origine des manifestations cliniques des TNE pourrait être la conséquence d'un dysfonctionnement des mécanismes de libération hormonale dans les cellules neuroendocrines.

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans un projet général visant à comprendre l'origine et les conséquences de cette hypersécrétion dans les TNE, en utilisant les phéochromocytomes, tumeurs dérivant des cellules chromaffines de la médullosurrénale, comme modèle d'étude des TNE. Le prochain paragraphe est consacré aux cellules chromaffines, avec une description anatomique et histologique de la glande surrénale, puis une présentation du processus de sécrétion. Les phéochromocytomes, quant à eux, seront décrits en détail dans la dernière partie de ce chapitre.

2. LES CELLULES CHROMAFFINES DE LA MÉDULLOSURRÉNALE

Les cellules chromaffines doivent leur nom à la célèbre « réaction chromaffine », nommée ainsi par Alfred Kohn dès le début du 20^{ème} siècle, au cours de laquelle les cellules chromaffines prennent une coloration brune en présence de sels de chrome suite à l'oxydation des catécholamines qu'elles contiennent.

2.1. Anatomie de la médullosurrénale

2.1.1. Organisation générale de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont des glandes endocrines paires et non symétriques situées au dessus des reins, nées de la fusion de deux tissus glandulaires d'origines embryologiques différentes : la corticosurrénale (dérivant du mésoderme) et la médullosurrénale (dérivant de l'ectoderme). La structure interne se compose d'une zone centrale, la médullosurrénale encerclée par un cortex, ou corticosurrénale (**FIGURE 2**). Cette dernière se compose de trois couches concentriques ayant chacune une structure histologique et une fonction sécrétoire propre. De la périphérie vers le centre, la zone glomérulée sécrète les minéralocorticoïdes, la zone fasciculée assure la production de glucocorticoïdes, et enfin la zone réticulée, les androgènes. En revanche, la médullosurrénale est composée essentiellement de cellules chromaffines sécrétant notamment des catécholamines (*Aunis and Langley, 1999*).

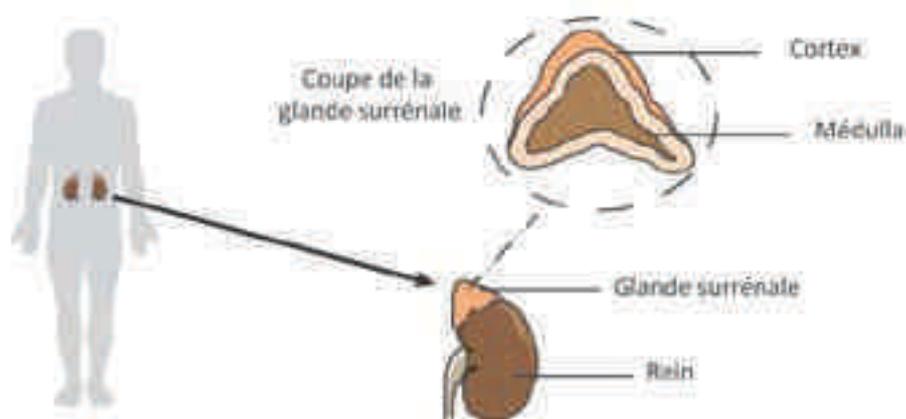


FIGURE 2. Localisation des glandes surrénales. Détail sur une coupe transversale de la glande surrénale : le cortex est localisé à la périphérie et la médulla est située au centre de la glande.

2.1.2. Histogénèse des cellules chromaffines

Les cellules chromaffines dérivent des cellules du neuroectoderme primitif : les cellules de la crête neurale. Lors de la formation du tube neural, les cellules de la crête neurale migrent vers la périphérie. Au cours de leur migration, de multiples facteurs du microenvironnement interviennent, régulant ainsi leur orientation et leur différenciation en précurseurs de différentes lignées (*Dutt et al., 2006*). C'est ainsi que certaines des cellules de la crête neurale se différencient en précurseur commun des cellules nerveuses et glandulaires, les sympathogonies. Ces cellules se différencient ensuite en sympathoblastes à l'origine des neurones ganglionnaires sympathiques et en phéochromoblastes à l'origine des cellules chromaffines constituant le système paraganglionnaire. Nous y retrouvons les cellules chromaffines du paraganglion le plus volumineux de l'organisme : la médullosurrénale, mais aussi des cellules chromaffines extra-surréaliennes (*Díaz-Flores et al., 2008*). En effet, des îlots cellulaires chromaffines ou paraganglions existent le long des grands axes vasculaires, sur les itinéraires de migration de cellules neuroectodermiques. Nous pouvons citer par exemple les ganglions tympaniques, glomiques, paracardiaques ou encore de l'artère mésentérique inférieure.

2.1.3. Histologie du tissu médullaire

Les cellules chromaffines sont disposées en amas autour des capillaires, organisation leur permettant d'assurer la sécrétion des catécholamines dans la circulation sanguine. Selon leur capacité à synthétiser, stocker et sécréter deux types de catécholamines, l'adrénaline et la noradrénaline, les cellules chromaffines forment deux populations cellulaires distinctes : les cellules adrénérgiques et les cellules noradrénérgiques. L'immense majorité des cellules sécrète de l'adrénaline alors qu'une petite proportion présente un phénotype noradrénérgique. Les proportions exactes peuvent varier selon l'espèce considérée, mais par exemple, dans la médullosurrénale du rat adulte, 80 à 85% des cellules sécrètent de l'adrénaline, et seulement 15 à 20% sécrètent de la noradrénaline (*Coupland et al., 1964; Díaz-Flores et al., 2008*). Bien que chaque cellule chromaffine semble contenir un seul type de catécholamine, la possibilité de l'expression simultanée d'adrénaline et de noradrénaline a été décrite dans la même cellule chez la souris (*Grabner et al., 2005*).

Les cellules chromaffines étant polarisées, leur pôle apical est connecté avec des terminaisons nerveuses tandis que leur pôle basal est en contact avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Les glandes surrénales bénéficient d'un apport vasculaire très riche. Un réseau artériel se répartit à la surface de la glande, formant un plexus capsulaire par lequel sont drainés deux types de vaisseaux : les artérioles corticales et les artérioles médullaires permettant d'irriguer le cortex et la médulla. La circulation veineuse, constituant le conduit sécrétoire de la glande, est organisée selon un drainage veineux sur une veine principale, qui gagne ensuite la circulation systémique permettant la libération des composés dans la circulation sanguine (*Kikuta and Murakami, 1982*).

La libération hormonale est sous l'influence du système nerveux sympathique. En effet, l'innervation de la médullosurrénale est principalement réalisée par les axones des neurones pré-ganglionnaires du système sympathique, *via* le nerf splanchnique (*Mravec, 2005*). L'organisation des neurones pré-ganglionnaires sympathiques en deux groupes de neurones innervant soit les cellules adrénargiques, soit les cellules noradrénargiques indique qu'il y a une régulation différente de la sécrétion des deux catécholamines suite à une stimulation (*Morrison and Cao, 2000; de Diego et al., 2008*). L'influx nerveux transmis *via* le nerf splanchnique induit une libération d'acétylcholine qui va se fixer sur les récepteurs cholinergiques nicotinique post-synaptiques de la cellule chromaffine. L'entrée d'ions sodium entraîne une dépolarisation de la membrane de la cellule, et par conséquent une activation des canaux calciques voltage dépendant entraînant une entrée d'ions calcium qui constituent l'élément déclencheur de l'exocytose (**FIGURE 3**).

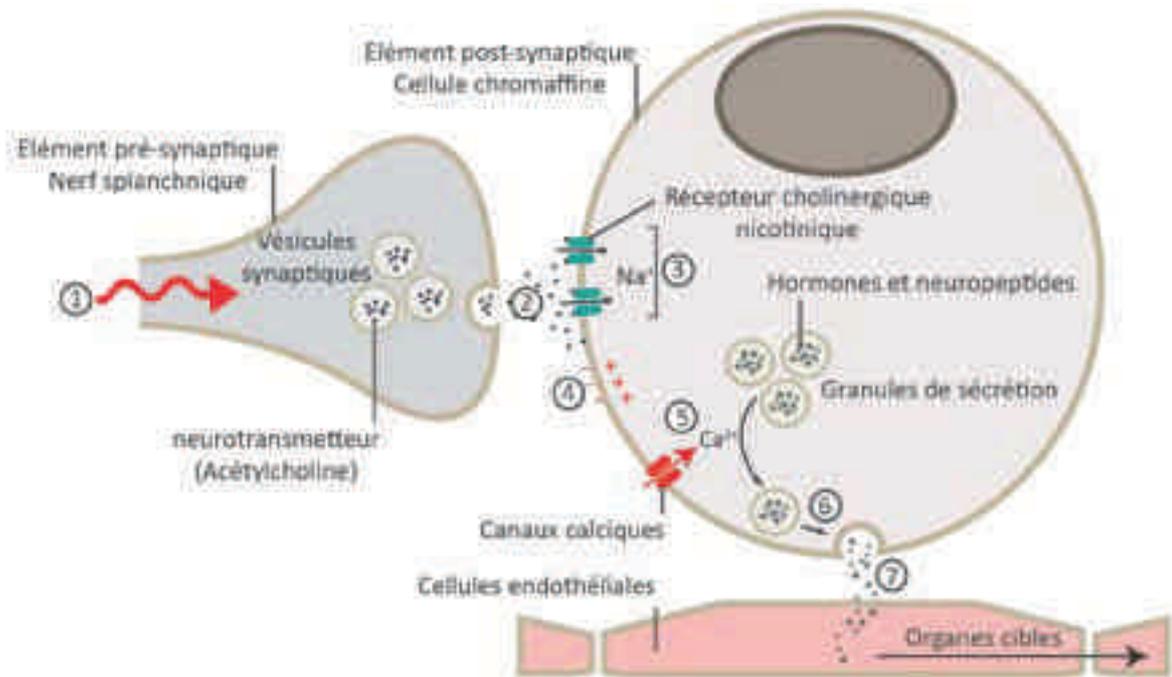


FIGURE 3. Synapse neuro-glandulaire entre les neurones pré-ganglionnaires du système sympathique et les cellules chromaffines. (1) Stimulation nerveuse transmise par le nerf splanchnique ; (2) Libération d'acétylcholine (3) Entrée d'ions sodium dans la cellule ; (4) Dépolarisation de la membrane ; (5) Activation des canaux calciques sensibles au voltage et entrée d'ions calcium dans la cellule ; (6) Fusion de la membrane du granule avec la membrane plasmique ; (7) Exocytose.

2.2. Processus de sécrétion dans les cellules chromaffines

2.2.1. Généralités sur l'exocytose régulée

Les hormones destinées à être sécrétées dans la voie régulée sont synthétisées sous forme de pro-hormones au niveau du réticulum endoplasmique (RE) puis acheminées au niveau de l'appareil de Golgi. Elles sont ensuite empaquetées dans les granules de sécrétion formés par bourgeonnement au niveau du réseau trans-golgien (TGN) avec d'autres protéines de la voie de sécrétion régulée. Les granules nouvellement formés subissent ensuite différentes étapes de maturation tout en étant acheminés vers la périphérie cellulaire pour se répartir en différentes populations vésiculaires. Une fois recrutés à la membrane plasmique, les étapes successives d'accostage, d'arrimage et d'amorçage permettront aux granules d'être prêts à fusionner. L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium déclenche ensuite la phase finale de la sécrétion, au cours de laquelle la membrane du granule fusionne avec la membrane plasmique permettant ainsi la libération du contenu intra-granulaire dans le milieu extracellulaire (FIGURE 4).

Dans l'ensemble des cellules sécrétrices, l'exocytose régulée doit être suivie d'un processus d'endocytose dite compensatrice (**FIGURE 4**). L'importance de ce phénomène a été illustrée pour la première fois au cours d'une étude sur la jonction musculaire de langouste en 1970. Avec une stimulation de 20 Hz, Bittner et Kennedy ont calculé qu'en absence d'endocytose compensatrice, la fusion de chaque vésicule synaptique entrainerait une croissance de 77 à 154 cm de longueur d'axone par heure, ce qui serait catastrophique pour la cellule (*Bittner and Kennedy, 1970*). L'endocytose compensatrice est donc indispensable pour le maintien du bon fonctionnement des cellules sécrétrices, en préservant une surface cellulaire constante et en recyclant les composés du granule pour assurer une sécrétion pérenne au cours du temps. Le destin des membranes granulaires après exocytose a longtemps été soumis à débat. Pendant de nombreuses années, la communauté scientifique suggérait qu'après fusion vésiculaire, les composés de la membrane du granule diffusaient dans la membrane plasmique et étaient ensuite internalisés de manière aléatoire. Les travaux de l'équipe proposent un mécanisme de couplage au cours duquel les membranes granulaires préservent leur identité après exocytose et sont recapturées sans se mélanger avec la membrane plasmique (pour plus de détail, se référer à la revue (*Houy et al., 2013*) à laquelle j'ai participé en tant que 2^{ème} auteur, jointe en annexes).

Dans ce manuscrit, je me focaliserai sur le processus d'exocytose régulée par le calcium en présentant brièvement chacune des étapes, de la maturation à l'étape de fusion des granules.

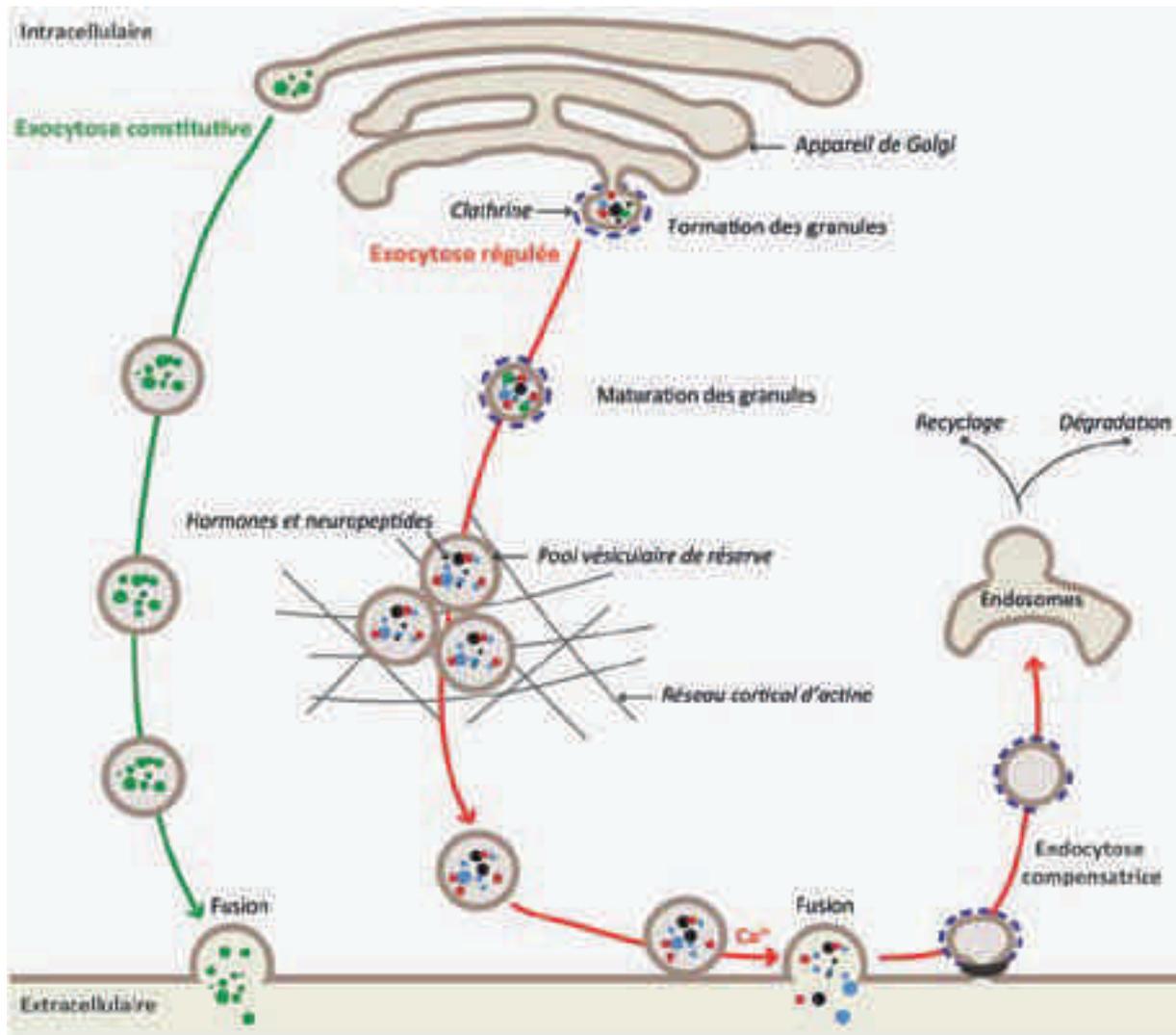


FIGURE 4. Processus d'exocytose dans les cellules chromaffines. Deux voies distinctes sont présentes : la voie constitutive (vert) et la voie régulée (rouge). Les granules de la voie régulée suivent plusieurs étapes de maturation avant d'arriver à la périphérie cellulaire. Après fusion, les granules subissent une étape d'endocytose compensatrice permettant de recycler et/ou dégrader les éléments granulaires et de maintenir une surface cellulaire constante. Dans le cas de la sécrétion constitutive, les granules vont directement fusionner avec leur compartiment cible, sans passer par les différentes étapes requises pour la sécrétion régulée.

2.2.2. Caractéristiques et composition des granules chromaffines

Les granules des cellules chromaffines, ou granules à cœur denses, localisés dans le cytoplasme des cellules constituent l'organite de stockage des catécholamines (FIGURE 5). Selon les espèces, les granules présentent un diamètre très variable compris entre 50 et 400 nm. Chaque cellule chromaffine peut contenir jusqu'à 30000 granules, qui représentent environ 13% du volume cytoplasmique des cellules (Vitale et al., 1995). La composition de la

matrice des granules est très riche : en plus des catécholamines, les granules contiennent divers nucléotides, enzymes, peptides et des ions (TABLEAU 2).

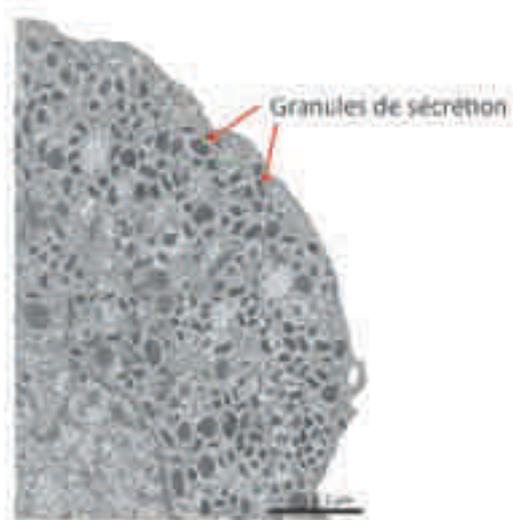


FIGURE 5. Cellule chromaffine en microscopie électronique. Les granules à cœur denses sont indiqués par des flèches rouges. D'après (Ceridono et al., 2011).

| | |
|---------------------------------|--|
| Granines | Chromogranines A et B, sécrétogranine II, III, V, VI |
| Glycoprotéines | DBH, H ⁺ -ATPase, glycoprotéine II et III |
| Enzymes protéolytiques | Cathepsine L ; Aminopeptidase B ; PC1/3 ; PC2 ; Carboxypeptidase E ; Protéinase aspartique; Activateur du plasminogène (t-PA) |
| Inhibiteurs de protéases | Endopines 1 et 2 |
| Peptides | Peptides opioïdes (enképhalines, endorphines, dynorphines) ; Neuropeptide Y ; Bombésine ; TGF-β ; Neurotensine ; Sécrétoneurine ; EM66 ; Peptide natriurétique ; Adrénomédulline ; CGRP ; Vasostatine ; Catestatine ; Cateslytine ; Chromacine ; Sécrétolytine ; Ubiquitine ; Arginine-vasopressine ; Substance P ; VIP ; guanyline ; galanine |
| Amines | Catécholamines (adrénaline, noradrénaline, dopamine) ; sérotonine |
| Nucléotides | ATP, AMP, ADP, GTP, GDP, UDP |
| Ions | Calcium, magnésium, potassium, sodium et chlore |
| Autres constituants | Acide ascorbique ; Glutathione disulfide coenzyme A ; APP ; mucopolysaccharides (chondroïtine-4 et 6) |

TABLEAU 2. Principaux constituants de la matrice des granules de sécrétion des cellules chromaffines. Abréviations : PC1/3, 2=Pro-hormones Converting Enzymes ; TGF=Transforming Growth Factor ; CGRP=Calcitonine Gene-Related Peptide ; VIP=Vasoactive Intestinal Polypeptide ; APP=Amyloid Precursor Protein ; ATP/ADP/AMP=Adénosine tri/di/mono-phosphate ; GTP/GDP=Guanosine tri/di-phosphate ; UDP=Uridine diphosphate ; DBH= Dopamine-β-Hydroxylase D'après (Crivellato et al., 2008).

2.2.3. Biogénèse des granules chromaffines

2.2.3.1. Formation et bourgeonnement au TGN

La formation des granules, initiée au niveau du TGN, est un mécanisme dépendant de la clathrine qui nécessite l'intervention de diverses protéines et lipides afin de permettre leur bourgeonnement (*Kim et al., 2006*).

L'agrégation des protéines de la voie régulée destinées à être stockées dans les granules de sécrétion constitue la première étape de la biosynthèse des granules. Les protéines de la famille des granines, telles que les chromogranines A et B (CgA et CgB) ou encore les sécrétogranines II et IV (SgII, SgIV) constituent les éléments clé pour cette étape (*Taupenot et al., 2003; Elias et al., 2012*). De nombreuses études ont porté sur la CgA, et montrent que l'inhibition de la protéine dans une lignée de cellules chromaffines de rat par ARN interférent réduit le nombre de granules (*Courel et al., 2006*). D'autres preuves de la fonction granulogénique de la CgA ont été apportées par des études *in vivo*, dans lesquelles l'inhibition de l'expression de la CgA chez la souris altère la formation des granules dans les cellules chromaffines et le niveau d'expression des autres constituants granulaires tels que la CgB, le neuropeptide Y et les catécholamines (*Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005; Hendy et al., 2006; Montesinos et al., 2008*). De plus, des études démontrent une propriété intrinsèque d'agrégation de la CgA, puisque son expression dans des cellules non sécrétrices (cellules COS-7) conduit à la formation de vésicules mobiles capables de stocker des hormones peptidiques (*Montero-Hadjadje et al., 2009*). Les granines ont la capacité de s'agréger dans des conditions de pH acide et en présence de calcium (*Kim et al., 2006*). Cette propriété d'agrégation dans l'environnement acide du TGN est un mécanisme important pour la ségrégation entre la voie constitutive et la voie régulée puisque des études ont montré que la neutralisation du pH conduit à la sécrétion des protéines de la voie régulée dans la voie de sécrétion constitutive (*Chanat and Huttner, 1991*).

Pendant la formation des granules immatures, les agrégats de protéines ainsi formés interagissent avec les micro-domaines lipidiques de la membrane du TGN, riches en cholestérol, conduisant au bourgeonnement des granules immatures (*Dhanvantari and Loh, 2000*). De plus, le bourgeonnement du granule est facilité par la synthèse locale de lipides, tel que le diacylglycérol et d'acide phosphatidique pouvant modifier la courbure des membranes (*Siddhanta et al., 2000*).

2.2.3.2. Maturation des granules

Après leur biogénèse au niveau du TGN, les granules immatures sont dirigés selon un transport dépendant des microtubules vers la périphérie cellulaire, au niveau du réseau cortical de filaments d'actine (Rudolf et al., 2001). Une fois à la périphérie cellulaire, les granules restent confinés dans le réseau riche en actine, dans lequel ils se déplacent activement dans toutes les directions où ils vont y subir plusieurs étapes de maturation pour leur conversion en granules matures (FIGURE 6A). Immédiatement après leur bourgeonnement, l'acidification progressive au sein des granules a lieu : le pH passe de 6,2-6,5 au sein du TGN à un pH de 5,0-5,5 au sein des granules matures grâce à l'action d'une pompe à protons (V-ATPase) (Wu et al., 2001). Cette étape d'acidification du contenu intra-granulaire est nécessaire pour l'activation d'enzymes telles que les pro-hormones convertases et carboxypeptidases qui vont permettre à certaines hormones non fonctionnelles de passer de l'état de pro-hormone à celui d'hormone (Urbé et al., 1997). Pendant la formation des granules, une petite proportion de protéines de la voie constitutive, des enzymes lysosomales et des protéines membranaires sont aussi conditionnées par erreur dans les granules. Leur élimination par bourgeonnement est une étape critique pour la maturation des granules de la voie régulée. La maturation des granules implique également la perte du manteau de clathrine et des événements de fusion homotypiques faisant intervenir la syntaxine 6 et la synaptotagmine 4, responsables de l'augmentation de la taille des granules (Tooze and Tooze, 1986; Wendler and Tooze, 2001; Ahras et al., 2006).

A cette étape de maturation, le granule va également acquérir son contenu en catécholamines (FIGURE 6B). La biogénèse des catécholamines débute par l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase présente dans le cytoplasme des cellules. Suite à la décarboxylation de la L-DOPA, la dopamine produite est captée par les granules via un transporteur spécifique, VMAT (Vesicular Monoamine Transporter). Ensuite, la synthèse de la noradrénaline a lieu dans la matrice du granule, par l'action de l'hydroxylation de la dopamine par la dopamine β -hydroxylase. Dans les cellules adrénérgiques, la noradrénaline formée est exportée dans le cytoplasme, où est exprimée la PNMT (Phenylethanolamine-N-Methyl-Transferase), qui catalyse la réaction de méthylation permettant la conversion de la noradrénaline en adrénaline qui est ensuite captée par le granule par VMAT.

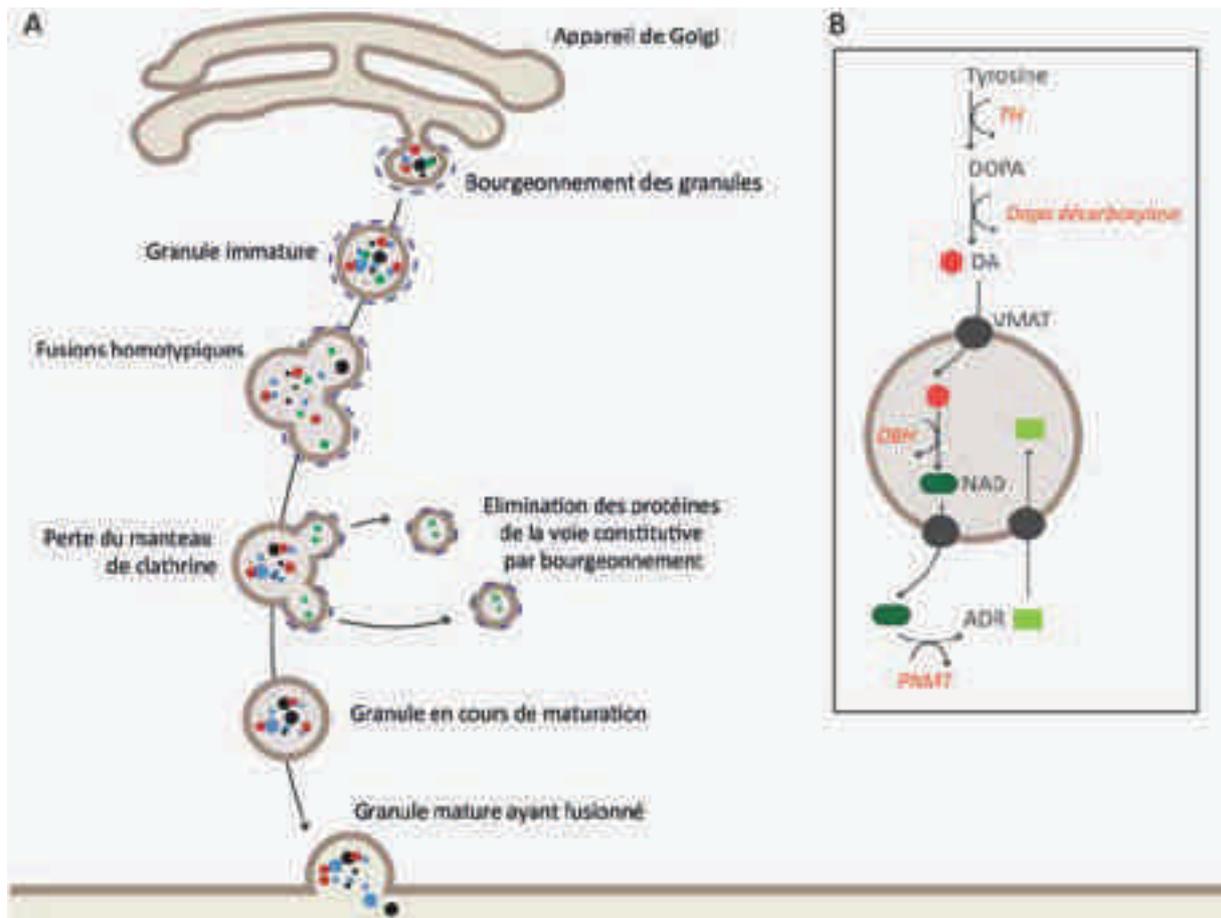


FIGURE 6. Biogénèse des granules chromaffines. (A) Schéma représentant les différentes étapes de maturation du granule. (B) Synthèse des catécholamines. La dopamine (DA) est synthétisée dans le cytoplasme des cellules, tandis que la noradrénaline (NAD) est synthétisée dans la matrice des granules. Uniquement pour les cellules adrénérgiques, l'adrénaline (ADR) est synthétisée dans le cytoplasme puis est ensuite captée par le granule. Abréviations : TH = Tyrosine Hydroxylase, VMAT = Vesicular Monoamine Transporter, DBH = Dopamine- β -hydroxylase, PNMT = Phenylethanolamine-N-Methyl-Transferase.

2.2.4. Les étapes de l'exocytose

Une fois mures, les granules subissent différentes étapes avant que la sécrétion puisse être réalisée. Le granule doit accoster à la membrane plasmique puis s'arrimer, amorcer l'étape de fusion et enfin libérer son contenu (FIGURE 7).

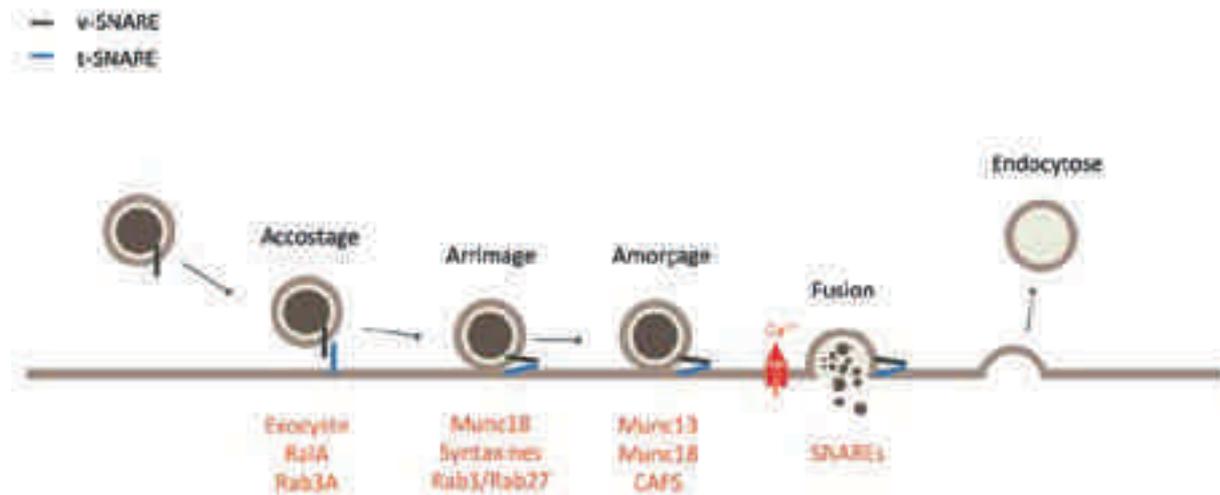


FIGURE 7. Résumé des différentes étapes conduisant à l'étape de fusion de la membrane vésiculaire et de la membrane plasmique. La première étape d'accostage permet de positionner correctement les granules au niveau du site d'exocytose. Ensuite vient l'étape d'arrimage, permettant de réaliser une liaison des granules avec la membrane plasmique, suivie d'une étape d'amorçage, pendant laquelle les granules deviennent compétents pour la fusion. Enfin, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium déclenche le processus d'exocytose au cours de laquelle la membrane du granule fusionne avec la membrane plasmique. Les principaux acteurs des différentes étapes sont indiqués en rouge.

2.2.4.1. Répartition en différentes populations de granules

Les granules sont distribués en quatre populations possédant des probabilités de libération différentes (Sørensen, 2004; Becherer and Rettig, 2006) (FIGURE 8). Le RRP (Reasily Releaseable Pool) représente une petite population de granules arrimés à la membrane plasmique et prêts à fusionner. Ces granules permettent une exocytose rapide avec une constante de temps de 20 à 40 ms après stimulation. Le SRP (Slowly Releaseable Pool) est constitué de granules arrimés mais qui ne sont pas compétents pour la fusion, et fusionnent environ 200 ms après stimulation. Le UPP (UnPrimed Pool) constitue une population de granules arrimés permettant de remplir le SRP et le RRP, situé à environ 200 nm de la membrane plasmique. Et enfin, la population de réserve est responsable d'une sécrétion plus lente et plus soutenue. Dans les cellules chromaffines, il s'agit de la population la plus importante (Becherer and Rettig, 2006). La population de réserve est séparée de la

membrane plasmique par une barrière d'actine. En effet, la plupart des cellules sécrétrices possèdent un réseau cortical d'actine qui agit comme une barrière afin de prévenir la fusion inappropriée de granules de sécrétion avec la membrane plasmique dans des conditions de repos. Après stimulation, la dépolymérisation du réseau d'actine est nécessaire pour le recrutement du pool de réserve et ainsi permettre une sécrétion efficace (*Malacombe et al., 2006a*).

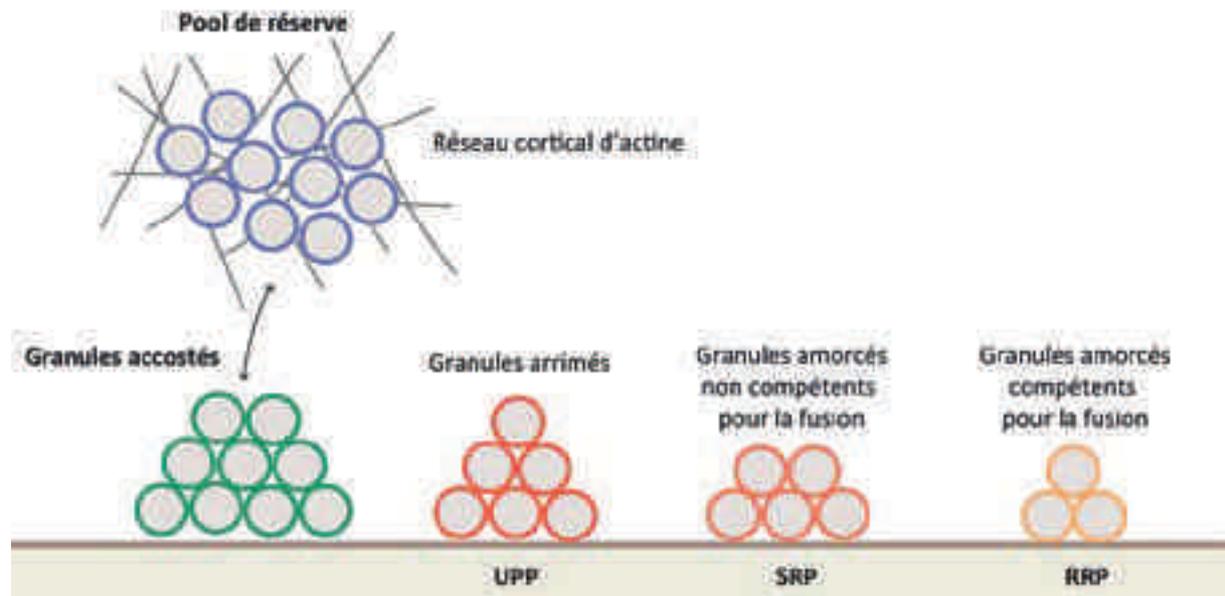


FIGURE 8. Représentation des différentes populations de granules dans la cellule chromaffine. UPP : Unprimed Pool (granules arrimés) ; SRP : Slowly Releasable Pool (granules amorcés non compétents pour la fusion) ; RRP : Readily Releasable Pool (granules amorcés compétents pour la fusion).

2.2.4.2. L'étape d'accostage (*tethering*)

L'étape d'accostage a pour but de positionner correctement les granules transférés à partir du pool de réserve au niveau des sites actifs d'exocytose, ce qui implique une reconnaissance de la membrane cible. Actuellement, ce mécanisme est encore mal compris. Cependant, le complexe de l'exocyste, identifié chez la levure grâce à une série de mutants thermosensibles présentant des défauts de sécrétion, pourrait jouer un rôle dans cette étape de reconnaissance. Ce complexe multiprotéique est conservé chez les mammifères et comprend huit sous-unités (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10p, Sec15, Exo70 et Exo84) réparties entre le site de fusion et la membrane des vésicules. Les facteurs de l'exocyste permettraient aux vésicules d'être recrutées et stabilisées à la membrane plasmique en se liant avec des protéines de la vésicule et de la membrane cible. De plus, en interagissant

avec les protéines SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor) de la membrane plasmique, le complexe de l'exocyste permet un contrôle spatio-temporel de l'assemblage du complexe SNARE, nécessaire pour l'étape de fusion (pour revue voir (Heider and Munson, 2012)). Par exemple, la sous-unité de l'exocyste Sec6p chez la levure se lie à la protéine SNARE-Sec9p de la membrane plasmique et cette interaction inhibe l'assemblage du complexe SNARE (Sivaram et al., 2005). De plus, une étude dans les cellules PC12 suggère l'implication de l'exocyste dans l'exocytose régulée, démontrant que Sec5 interagit directement avec la protéine RalA, GTPase monomérique de la super famille Ras (Moskalenko et al., 2002). Cette dernière serait nécessaire à l'assemblage du complexe, et régulerait l'exocytose dans les cellules PC12 par l'intermédiaire de Sec5. Enfin, un autre candidat potentiel pour cette étape d'accostage est la GTPase monomérique Rab3A, en agissant par l'intermédiaire de son effecteur Rim ou sur les protéines SNARE (Darchen and Goud, 2000).

2.2.4.3. L'étape d'arrimage (docking)

L'étape d'arrimage permet de réaliser la liaison des granules accostés à proximité des sites d'exocytose avec la membrane plasmique. Munc18-1, protéine initialement découverte comme une protéine liant la syntaxine1, semble être un candidat idéal pour réguler ce mécanisme (Hata et al., 1993). En effet, l'analyse de cellules chromaffines issues de souris knock-out pour le gène Munc18-1 montre que moins de 5 % des granules sont arrimés à la membrane plasmique alors que 30% des granules sont normalement arrimés à la membrane. Dans ces mêmes cellules n'exprimant plus la protéine Munc18-1, l'étape d'arrimage n'est pas rétablie lorsqu'un mutant de Munc 18-1 ne liant plus la syntaxine 1 est exprimé (Gulyás-Kovács et al., 2007). Les mécanismes moléculaires selon lesquels Munc18 et la syntaxine1 seraient impliqués dans cette étape ne sont pas encore élucidés, mais il semblerait que l'agrégation de Munc18 et de la syntaxine1 au niveau de la membrane cible soit nécessaire pour l'arrimage des granules à la membrane plasmique (Gandasi and Barg, 2014). Enfin, les deux GTPases Rab3 et Rab27, présentes sur les granules de sécrétion, pourraient aussi participer à la régulation des granules à proximité de la membrane plasmique dans les cellules PC12 (Tsuboi and Fukuda, 2006).

2.2.4.4. L'étape d'amorçage (*priming*)

Une fois arrimés à la membrane, l'étape d'amorçage va permettre aux granules de devenir compétents pour l'exocytose. Lors de l'étape d'arrimage, la protéine Munc18-1 se lie à la syntaxine1 en conformation fermée et permet ainsi de verrouiller la syntaxine dans sa conformation inactive. Or la syntaxine, pour former le complexe SNARE, a besoin d'adopter une conformation ouverte et ceci nécessite un facteur pouvant libérer la syntaxine afin de changer sa conformation menant à son activation (*Dulubova et al., 1999*). Par des expériences de criblage doubles-hybrides chez la levure, la protéine Munc13-1 a été identifiée comme liant la syntaxine1 (*Betz et al., 1997*). Munc13 a longtemps été considérée comme la protéine permettant de déplacer Munc18 et ainsi faciliter la formation du complexe SNARE. Cependant, le mécanisme d'action de Munc13 est encore mal compris, et il semblerait que Munc13 mais aussi Munc18 régularaient le complexe SNARE dans cette étape d'amorçage (*Sugita, 2008*). Une autre protéine potentiellement impliquée dans la régulation de cette étape est la protéine CAPS, qui pourrait interagir avec la syntaxine1 et ainsi permettre la maturation du complexe SNARE (*Liu et al., 2008; Daily et al., 2010*).

2.2.4.5. L'étape de fusion

Dans les conditions physiologiques, l'exocytose est stimulée par une entrée de calcium par l'intermédiaire de canaux calciques dépendants du voltage. Ainsi, afin de déclencher l'étape de fusion, un senseur calcique doit être recruté au niveau du site d'exocytose. Les candidats proposés pour tenir ce rôle appartiennent à la famille des synaptotagmines, possédant deux domaines C2 pouvant lier les lipides et le calcium. Il a été montré que les cellules chromaffines issues de souris knock-out pour la synaptotagmine1 présentent une déficience de l'exocytose (*Voets et al., 2001*). Les synaptotagmines peuvent interagir avec le complexe SNARE, les canaux calciques, la calmoduline et la protéine adaptatrice de la clathrine (AP2) (*Marquèze et al., 2000*). Ces nombreuses interactions confèrent un rôle de la synaptotagmine dans la formation d'une plate-forme fonctionnelle regroupant les différents acteurs permettant le déroulement de l'exocytose. Cependant, les mécanismes selon lesquels la synaptotagmine déclenche l'exocytose ne sont pas encore bien compris. (*Moghadam and Jackson, 2013*).

Une fois que le processus d'exocytose est déclenché, le mécanisme de fusion membranaire implique le complexe SNARE (**FIGURE 9**). A la fin de l'étape d'amorçage, le complexe SNARE

est en conformation lâche, ne permettant pas la fusion. Un changement de conformation va alors avoir lieu, selon un concept de « fermeture éclair ». Le complexe se ferme progressivement, permettant ainsi de rapprocher les membranes pour favoriser les étapes de fusion (Jahn and Scheller, 2006). Après fusion, les protéines SNARE se retrouvent sur la même membrane et forment un complexe en cis qui sera dissocié *via* l'intervention de l'ATPase NSF combinée à son co-facteur SNAP (Hatsuzawa et al., 2003). Cette dissociation est nécessaire pour la réactivation des protéines SNARE qui serviront à un nouveau cycle de fusion.

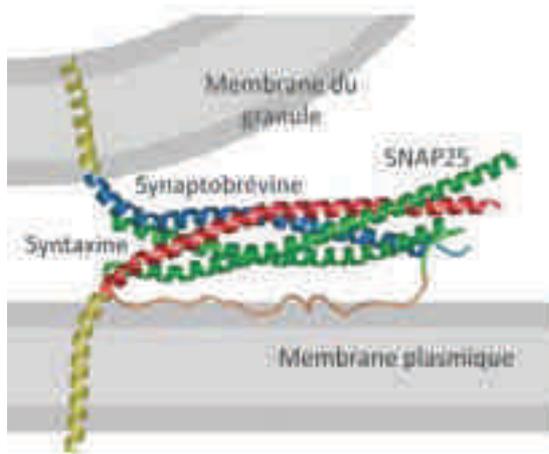


FIGURE 9. Organisation structurale du complexe SNARE. Le complexe SNARE, est composé de trois protéines : la VAMP2/synaptobrevine (Vesicle-Associated Membrane Protein 2), qui est vésiculaire (v-SNARE) ainsi que la syntaxine1 et la SNAP25 (Synaptosomal Associated Protein 25), situées sur la membrane plasmique (t-SNARE). L'association des motifs SNARE des trois protéines forme un faisceau de quatre hélices α parallèles, constituant le cœur du complexe SNARE.

Pour finir, les lipides ont un rôle primordial dans l'étape de fusion des granules, en favorisant les courbures membranaires. Les enzymes responsables de la synthèse de lipides, comme la phospholipase D, transformant la phosphatidylcholine en acide phosphatidique, ont un rôle au cours de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines (Humeau et al., 2001). La nature du pore de fusion n'est pas encore bien définie, et deux hypothèses s'opposent : un pore de nature lipidique ou un pore de nature protéolipidique (Jackson and Chapman, 2006).

2.3. Physiologie des catécholamines médullaires

Dans une situation normale, les catécholamines de la médullosurrénale sont sécrétées en faible quantité et permettent le maintien du bon fonctionnement de l'organisme *via* leurs actions sur les récepteurs α et β adrénergiques localisés au niveau de nombreux tissus (cœur, muscles, vaisseaux sanguins, tractus gastro-intestinal, foie...) (TABLEAU 3).

| Organes cibles | Récepteurs ADR | Effet physiologique | Réponse |
|---------------------------------|-------------------------|---|--------------------------------------|
| Effet cardiovasculaires | | | |
| Cœur | $\beta 1$ | ↗ Contractilité ; ↗ Vitesse de conduction | Effet inotrope ↗ Rythme cardiaque |
| Artères | | | |
| <i>Rénales</i> | $\alpha 1$ | Constriction | ↘ Flux sanguin local |
| <i>Splanchniques</i> | $\alpha 1$ | Constriction | ↗ Pression sanguine |
| <i>Coronaires</i> | $\beta 1$ | Dilatation | ↗ Pression sanguine locale |
| <i>Peau</i> | $\alpha 1$ | Constriction | |
| <i>Muscles squelettiques</i> | $\beta 2$ | Dilatation | ↗ Pression sanguine locale |
| Veines | $\alpha 2$ | Constriction | ↗ Rythme cardiaque |
| Appareil juxtaglomérulaire | $\beta 2$ | Sécrétion de rénine | ↗ Pression sanguine |
| Effets métaboliques | | | |
| Foie | $\alpha 1$ ou $\beta 2$ | ↗ Glycolyse ; ↗ Glycogénèse | ↗ Glucose sanguin |
| Muscles | $\beta 2$ | ↗ Glycogénolyse | ↗ Lactate sanguine |
| Pancréas | $\alpha 2$ ou $\beta 2$ | ↘ ou ↘ Sécrétion insuline | ↗ ou ↘ Glucose sanguin |
| Tissu adipeux | $\beta 1$ ou $\alpha 2$ | ↗ Lipolyse ou ↘ Lipolyse | ↗ ou ↘ Acides gras libres |
| Tractus gastrointestinal | | | |
| Glandes stomacales | α, β | ↘ Sécrétion | ↘ Acidité |
| Muscle stomacal | $\beta 2$ | Relaxation | |
| Muscle intestinal | $\beta 2$ | Relaxation | ↘ Mobilité |
| Sphincter intestinal | $\alpha 1$ | Contraction | |
| Poumons | | | |
| Muscles des bronches | $\beta 2$ | Relaxation | Bronchodilatation |
| Vessie | | | |
| Détrusor | β | Relaxation | Inhibition de miction |
| Trigone et sphincter | $\alpha 1$ | Contraction | |
| Œil | | | |
| Muscle radial de l'iris | $\alpha 1$ | Contraction | Dilatation de la pupille |
| Muscle ciliaire | β | Relaxation | Adaptation vision de loin |
| Plaquettes | | | |
| | $\alpha 2$ | Agrégations | |
| Utérus | | | |
| Myomètre | $\alpha 1$ ou $\beta 2$ | Contraction | |
| | $\beta 2$ | Relaxation | |
| Peau | | | |
| Muscle piloérecteur | α | Contraction | Erection du système pileux |

TABLEAU 3. Effets physiologiques des catécholamines. Réponses multiples médiées par l'action de l'adrénaline et de la noradrénaline sur les récepteurs α et β adrénergiques (récepteurs ADR). D'après (Bülbring and Tomita, 1987).

Dans une situation de peur et de danger, le système sympathique est activé, ce qui induit une libération massive de catécholamines par la médullosurrénale, conduisant à une augmentation de la fréquence cardiaque, de la pression artérielle et à une mobilisation des réserves glucidiques. Cette réaction mobilise instantanément l'organisme pour une réaction dite de « fight or flight » qui prépare le corps à « se battre ou à fuir le danger ».

Cette réponse physiologique est le reflet de la co-existence de deux types d'exocytose dans les cellules chromaffines (Fulop et al., 2005; Harata et al., 2006). En effet, dans une situation de faible stimulation, un mode de libération partielle appelé « kiss-and-run », correspondant à une ouverture/fermeture dynamique du pore de fusion, induit l'ouverture d'un pore de petite taille ne laissant passer que les catécholamines et les petites molécules. Dans des conditions de stress (fortes stimulations), un mode de fusion complète permet la fusion totale de la membrane plasmique et de la membrane vésiculaire, libérant à la fois une grande quantité de catécholamines, de neuropeptides et autres composés impliqués notamment dans des réactions analgésiques (Crivellato et al., 2008). Ainsi, ces deux modes de fusion permettent une ségrégation de la libération des composés granulaires en fonction du degré de stimulation des cellules chromaffines (FIGURE 10). Ces processus d'exocytose doivent être hautement régulés car une libération excessive de catécholamines peut être néfaste voire fatale pour l'organisme (arrêt cardiaque, hypertension...)

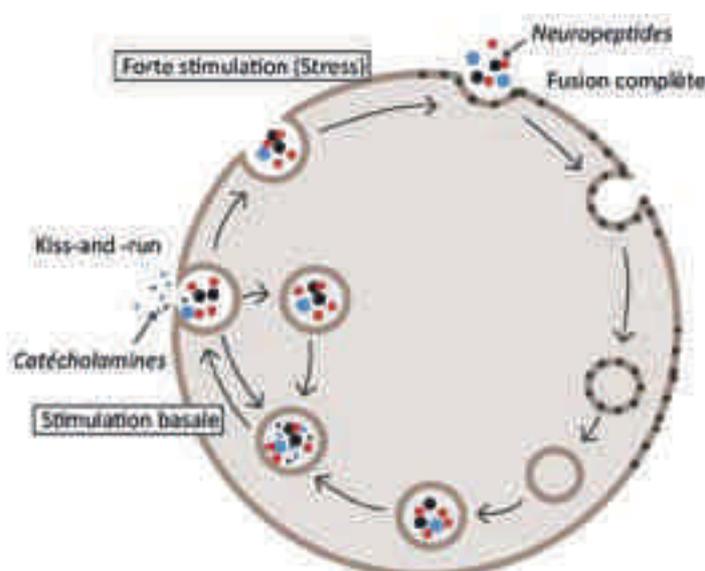


FIGURE 10. Mécanisme de la libération différentielle du contenu intra-granulaire selon l'intensité de la stimulation. Une stimulation basale conduit à la libération des catécholamines par une exocytose de type « kiss-and-run » tandis qu'une forte stimulation dans des conditions de stress conduit à la libération des catécholamines et des neuropeptides par une exocytose de type « fusion complète ». D'après (Fulop et al., 2005).

3. LES PHÉOCHROMOCYTOMES

3.1. Généralités

3.1.1. Définitions

Le terme « phéochromocytome » (PHEO) regroupe les tumeurs neuroendocrines caractérisées par la production d'une ou de plusieurs catécholamines, développées aux dépens du tissu chromaffine surrénalien ou extra-surrénalien. Cependant, une distinction terminologique permet de désigner sous le terme de « paragangliomes » (PGL), les tumeurs provenant du tissu extra-surrénalien (FIGURE 11). Notons que le terme de « paragangliome » est également utilisé pour les tumeurs dérivant des ganglions parasympathiques situés au niveau du cou et du crâne, et ne produisant pas de catécholamines.

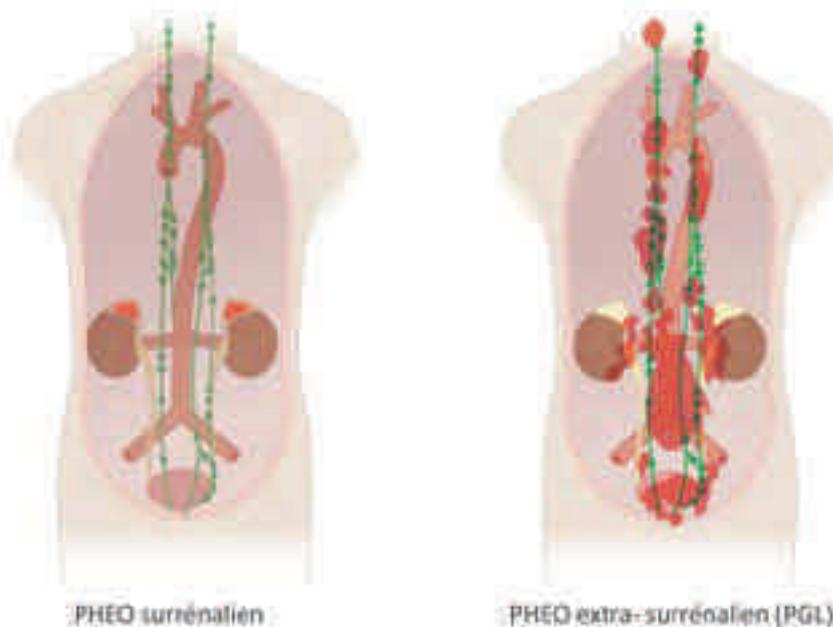


FIGURE 11. Phéochromocytomes surrénaliens et extra-surrénaliens. Une distinction est faite entre les PHEO provenant de la médullo-surrénale (80 à 85% des cas) et les tumeurs provenant du tissu extra-surrénalien (PGL) (15 à 20% des cas), localisées au niveau des ganglions sympathiques paravertébraux du thorax, de l'abdomen et du pelvis. D'après (*Manger and Gifford, 1996*).

3.1.2. De la découverte au premier diagnostic

L'observation du premier cas de phéochromocytome a été attribuée de façon rétrospective à F. Frankël en 1884. Il s'agissait d'une jeune femme morte d'une tumeur bilatérale des surrénales, mais le terme de phéochromocytome n'existant pas encore à cette époque, le diagnostic de ce premier cas a été posé à posteriori (*Neumann et al., 2007*). En 1896,

P. Manasse a été le premier à mettre en évidence les « tumeurs à réaction chromaffine », suite à une réaction avec les sels de chrome, de façon similaire à la réaction chromaffine. De ce fait, le terme de phéochromocytome (du grec *phaios*, brun et *chrôma*, couleur) pour désigner ces tumeurs a été employé pour la première fois par L. Pick en 1912. C'est en 1908 qu'Alezais et Peyron introduisent le terme de paragangliome pour définir les tumeurs chromaffines provenant du tissu extra-surrénalien. En 1922 apparurent les descriptions princeps du phéochromocytome, avec l'observation d'un symptôme d'«hyperépinéphrinémie», par M. Labbé chez une jeune femme souffrant de sueurs, palpitations, vomissements et de crises d'hypertensions artérielles. Le premier succès chirurgical est attribué à C. Roux en 1926, puis sept mois plus tard, C. Mayo réalise également une exérèse de phéochromocytome. Ce fut également le premier rapport de cas publié (*Mayo et al, 1927*). La même année, M. Pincoff fut le premier à réaliser une exérèse après diagnostic, et confirma ainsi le lien entre la tumeur de la médullosurrénale et les symptômes cliniques. Depuis les années 50, le diagnostic est facilité par la possibilité de doser les catécholamines (*Engel and von Euler, 1950*), ainsi que par l'apparition de l'imagerie médicale.

3.1.3. Epidémiologie

Les phéochromocytomes (PHEO) et paragangliomes (PGL) sont des tumeurs rares dont l'incidence annuelle est estimée à un cas pour 100000 personnes. Cependant, l'incidence réelle est plus élevée puisque des rapports d'autopsie rapportent 0,05% de PHEO et PGL non diagnostiqués (*Lo et al., 2000*). De plus, les PHEO/PGL ont une incidence de 0,1% à 0,6% chez les patients hypertendus. Cependant, ce chiffre ne prend en compte qu'une proportion des patients avec un PHEO, puisque la moitié présente une tension normale ou paroxystique (*Martucci and Pacak, 2014*). Enfin, de nombreux PHEO sont découverts de façon accidentelle chez 1 à 5% des patients qui subissent un examen d'imagerie abdominale pour d'autres raisons qu'une suspicion de TNE (*Song et al., 2008a; Davenport et al., 2011*). Le terme d'incidentalome est d'ailleurs utilisé pour désigner ces PHEO découverts de façon fortuite.

3.2. Diagnostic

3.2.1. Symptômes et signes cliniques

Les PHEO/PGL sont des tumeurs avec une manifestation clinique extrêmement variable (TABLEAU 4). La triade classique de symptômes comprend la présence de céphalées, de sueurs et de palpitations. Beaucoup de patients présentent également de l'hypertension, qui peut être soutenue ou paroxystique. Les autres symptômes comprennent : tachycardie, pâleur, sentiment d'anxiété et/ou de panique, fièvre, nausée et vomissement. Des effets métaboliques sont également caractéristiques de la maladie, tels que de l'hyperglycémie, acidose lactique, et perte de poids (*Lenders et al., 2005*).

| Signes | | Symptômes | |
|---------------------------|------|-------------------------|------|
| Hypertension | ++++ | Céphalées | ++++ |
| Hypertension soutenue | ++ | Palpitations | ++++ |
| Hypertension paroxystique | ++ | Anxiété | ++ |
| Hypertension posturale | + | Tremblements | ++ |
| Tachycardie | +++ | Faiblesse et fatigue | ++ |
| Sueurs excessives | ++++ | Nausées | + |
| Pâleur | ++ | Douleurs | + |
| Rougeur | + | Vertiges | + |
| Perte de poids | + | Parathésies | + |
| Hyperglycémie | ++ | Constipation | + |
| ↘ mobilité intestinale | + | Perturbations visuelles | + |
| ↗ fréquence respiratoire | + | | |

TABLEAU 4. Résumé des différents signes et symptômes dans les PHEO/PGL. La fréquence est indiquée, de la moins importante + à la plus importante +++. D'après (*Martucci and Pacak, 2014*).

La reconnaissance des signes et symptômes des PHEO/PGL est primordiale puisque des patients non diagnostiqués peuvent souffrir de crises hypertensives dues à l'excès de catécholamines sécrétées, avec risque d'attaques cardiaques ou d'accidents vasculaires cérébraux. Une étude récente a recensé 106 cas de patients ayant présenté des crises hypertensives liée à un PHEO/PGL, dont une part importante (15%) ont conduit à la mort du patient (*Whitelaw et al., 2014*). Il est donc primordial de trouver des solutions pour remédier aux effets néfastes liés à cette sécrétion excessive de catécholamines.

3.2.2. Diagnostic par méthodes biochimique et imagerie

Chez l'ensemble des patients suspectés d'être porteur d'un PHEO/PGL, les instructions présentées dans le « *Clinical practice Guideline* » recommandent un diagnostic comprenant des dosages biochimiques suivis d'examens d'imagerie (Lenders et al., 2014).

Actuellement, la méthode biochimique la plus fiable consiste à mesurer l'augmentation de la concentration des métabolites de l'adrénaline et de la noradrénaline (méтанéphrine et norméтанéphrine) dans le plasma ou les urines (Lenders et al., 2002). En effet, bien que la quantité de catécholamine libérée soit fluctuante, la production de leurs produits de dégradation est relativement constante (Eisenhofer et al., 1998). Des études récentes ont également montré l'utilité de mesurer le métabolite de la dopamine plasmatique, la méthoxytyramine. La détection de ce biomarqueur est primordiale pour détecter les tumeurs sécrétant de la dopamine, telles que les PHEO/PGL de la tête et du cou, qui sont rares mais non diagnostiquées lors de la mesure des méтанéphrines (Eisenhofer et al., 2005a; Poirier et al., 2013). La CgA est également communément mesurée chez les patients puisque des niveaux élevés sont trouvés chez 91% des patients avec des PHEO/PGL. Récemment, une étude a montré que le dosage de peptides bioactifs dérivant de la CgA (WE-14), combiné avec celui des peptides dérivant de la SgII (EM66) constitue un nouvel outil pour le diagnostic des PHEO (Guillemot et al., 2014).

Une fois que le test biochimique a révélé une suspicion de PHEO/PGL, des examens d'imagerie anatomique par IRM et scanner sont utilisés pour la détection initiale de la tumeur. La nature de la masse identifiée peut ensuite être précisée par l'utilisation d'imagerie fonctionnelle en réalisant une scintigraphie à la ^{123}I -MIBG (^{123}I -méта-iodobenzylguanidine) ou encore par tomographie par émission de positons (TEP) utilisant le ^{18}F fluorodéoxyglycane (PET-FDG).

3.3. Génétique

3.3.1. Prédiposition génétique

Au cours des dix dernières années, les progrès dans la génétique des PHEO ont été considérables. La communauté scientifique a longtemps considéré que seules 10% des tumeurs étaient d'origine génétique, causées par une mutation des gènes NF1 (neurofibromin), RET (Rearranged during Transcription) et VHL (Von Hippel Lindau).

Actuellement, plus d'une douzaine de gènes de prédisposition sont identifiés. En plus de NF1, RET et VHL, nous pouvons citer les sous-unités A, B, C et D de la succinate déshydrogénase (SDH), SDHAF2 (SDH complex Assembly Factor 2), MAX (Myc-Associated factor X), TMEM127 (Transmembrane protein 127), HIF2A (Hypoxia Inducible Factor 2A), FH (Fumarate Hydroxylase), PHD2 (Prolyl Hydroxylase Domain-containing protein 2) ou encore H-RAS (TABLEAU 5). Il est maintenant admis que plus de 30% des PHEO portent une mutation germinale dans un de ces gènes de susceptibilité (Dahia, 2014). De plus, des études transcriptomiques récentes ont conduit à la détection de mutations somatiques des gènes RET, NF1, VHL, HIF2A et MAX dans les tumeurs d'environ 15% de patients atteints d'une forme sporadique (Burnichon et al., 2011, 2012a, 2012b; Welander et al., 2012; Toledo et al., 2013).

| Références | Gène | Syndrome associé | Pénétrance | Age | Phénotype biochimique | Sites des PHEO/PGL | PHEO bilatéraux | Malignité | Autres caractéristiques et tumeurs |
|--|---------|------------------|------------|-------|-----------------------|--------------------------|-----------------|-----------|--|
| <i>(Gimenez-Roqueplo et al., 2012)</i> | RET | NEM2 (A et B) | 50% | 30-40 | A | surrénaliens | 50-80% | rare | Carcinomes médullaires de la thyroïde, hyperparathyroïdisme, ganglioneuromes |
| <i>(Gimenez-Roqueplo et al., 2012)</i> | NF1 | NF1 | <6% | 42 | A | surrénaliens | 16% | 12% | Neurofibromatose, gliomes du nerf optique, tâches café au lait, tâches de rousseurs, hamartome bénin de l'iris, pseudoarthrite |
| <i>(Qin et al., 2010)</i> | TMEM127 | / | ? | 43 | A et NA | surrénaliens | 33% | <5% | Carcinomes du sein, carcinomes de la thyroïde |
| <i>(Burnichon et al., 2012a)</i> | MAX | / | ? | 32 | A et NA | surrénaliens | 67% | 20-25% | ? |
| <i>(Crona et al., 2013)</i> | H-RAS | / | ? | ? | ? | surrénaliens | ? | ? | Gène muté dans de multiples cancers |
| <i>(Gimenez-Roqueplo et al., 2012)</i> | VHL | VHL | 10-20% | 30 | NA | surrénaliens | 50% | <5% | Hémangioblastomes, carcinomes rénaux à cellules claires, tumeurs du pancréas |
| <i>(Astuti et al., 2001)</i> | SDHB | PGL4 | 30-100% | 30 | NA et/ou DA | PGL | rare | 31-71% | Carcinomes rénaux à cellules claires, tumeurs gastrointestinales, adénomes de l'hypophyse, carcinomes du sein, carcinomes de la thyroïde |
| <i>(Baysal et al., 2000)</i> | SDHD | PGL1 | 73-90% | 35 | NA, DA ou sil. | PGL tête-cou + multiples | rare | <5% | Carcinomes rénaux à cellules claires, tumeurs gastrointestinales, adénomes de l'hypophyse |
| <i>(Niemann and Müller, 2000)</i> | SDHC | PGL3 | ? | 40-50 | NA, DA ou sil. | PGL tête-cou + multiples | ? | rare | Carcinomes rénaux à cellules claires, tumeurs gastrointestinales, adénomes de l'hypophyse |
| <i>(Burnichon et al., 2010)</i> | SDHA | / | ? | 40 | ? | Surrénaliens + PGL | ? | 0-14% | Carcinomes à cellules rénales, tumeurs gastrointestinales, adénomes de l'hypophyse |
| <i>(Hao et al., 2009)</i> | SDHAF2 | PGL2 | 100% | 30-40 | ? | PGL tête-cou + multiples | / | ? | ? |
| <i>(Taieb et al., 2013)</i> | HIF2A | / | ? | ? | NA | ? | ? | ? | Multiplés |
| <i>(Letouzé et al., 2013)</i> | FH | / | ? | ? | ? | surrénaliens | ? | ? | Léiomyome utérin |
| <i>(Yang et al., 2014)</i> | PHD2 | / | ? | ? | ? | surrénalien | ? | ? | Polycythémie |

TABLEAU 5. Caractéristiques cliniques des mutations génétiques associées aux PHEO/PGL. Les PHEO/PGL familiaux peuvent être intégrés dans des syndromes de prédisposition familiale et constituer une des manifestations cliniques de ces syndromes, tel que la néoplasie endocrinienne multiple de type 2 (NEM2 A et B), le syndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), la neurofibromatose de type 1 (NF1) et enfin les paragangliomes familiaux (PGL1-4). Les PHEO peuvent survenir à n'importe quel âge, avec une prédominance cependant vers 35-50 ans. La majorité des PHEO sont bénins, mais des formes malignes existent, associées principalement à la mutation SDHB. Les colonnes indiquent le gène impliqué, le syndrome associé, la pénétrance des PHEO/PGL, le phénotype sécrétoire biochimique, les sites les plus communs des PHEO/PGL, la présence de PHEO bilatéraux, la malignité et enfin les autres tumeurs et pathologies associées au syndrome. A=adrénaline ; NA=noradrénaline ; DA=dopamine ; Sil=silencieux.

3.3.2. Tumorigénèse

La présence de ce grand nombre de gènes mutés dans les PHEO reflète une extrême diversité génétique et engendre une complexité dans la compréhension des mécanismes moléculaires de tumorigénèse. Les mutations, sauf cas exceptionnel, sont présentes de manière exclusive dans ces tumeurs mais pourtant certains PHEO qui présentent des signatures génétiques différentes partagent des altérations dans les mêmes voies de signalisation. Cette caractéristique implique une convergence dans les voies de signalisation mises en jeu, ce qui a permis de répartir les PHEO en deux groupes, nommés cluster 1 et cluster 2. Les gènes de susceptibilité décrits précédemment appartiennent à différentes classes fonctionnelles, comprenant des récepteurs kinases et des régulateurs de la voie de signalisation de ces derniers (RET, NF1), des facteurs de transcription (MAX), des composants de la voie de signalisation endosomale (TMEM127), des composants du métabolisme énergétique (SDH, SDHAF2, FH et PHD2) et enfin des constituants de la réponse à l'hypoxie (VHL, HIF2A). Le cluster 1 correspond aux gènes impliqués dans la voie de la réponse pseudohypoxique (VHL, SDH, SDHAF2, HIF2A, FH et PHD2) tandis que le cluster 2 regroupe les tumeurs caractérisées par une activation de la voie de signalisation des récepteurs tyrosine kinases (RET, NF1, TMEM127, MAX et H-RAS).

3.3.2.1. Cluster 1 : voie de la pseudohypoxie

La réponse à l'hypoxie est mise en jeu lors du phénomène de croissance tumorale. En effet, lorsque la tumeur atteint 1 à 2 millimètres de diamètre, sa demande en oxygène et en nutriments dépasse l'approvisionnement local. Le microenvironnement hypoxique qui s'ensuit induit une activation de protéines agissant comme des facteurs de transcription, les HIFs (Hypoxia Inducible Factor), qui régulent des voies de signalisation impliquées dans de multiples processus cellulaires tels que l'angiogénèse, le métabolisme, la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose. Le terme « pseudohypoxique » est utilisé lorsqu'une activation constitutive de la voie de signalisation des HIFs apparaît, et ceci de façon totalement indépendante du niveau d'oxygène. Une telle réponse pseudohypoxique est mise en jeu dans la tumorigénèse des PHEO du cluster 1, dans lesquels les mutations des gènes VHL, SDH, HIF2A, FH et PHD2 conduisent toutes selon un mécanisme différent, à une activation de la voie liée aux HIFs. Cependant, il semblerait que les mécanismes de

tumorigénèse mis en jeu dans les PHEO déterminés par une mutation SDH ne soient pas limités à l'activation des HIFs, puisque ces tumeurs présentent également des motifs d'hyperméthylation, suggérant un rôle de la SDH dans la régulation épigénétique (Xiao *et al.*, 2012; Letouzé *et al.*, 2013). Par soucis de clarté, je me focaliserai sur les voies de signalisation les mieux décrites, à savoir les voies de signalisation régulées par les protéines VHL et SDH, présentées dans **FIGURE 12** (pour revue, lire (Dahia, 2014)).

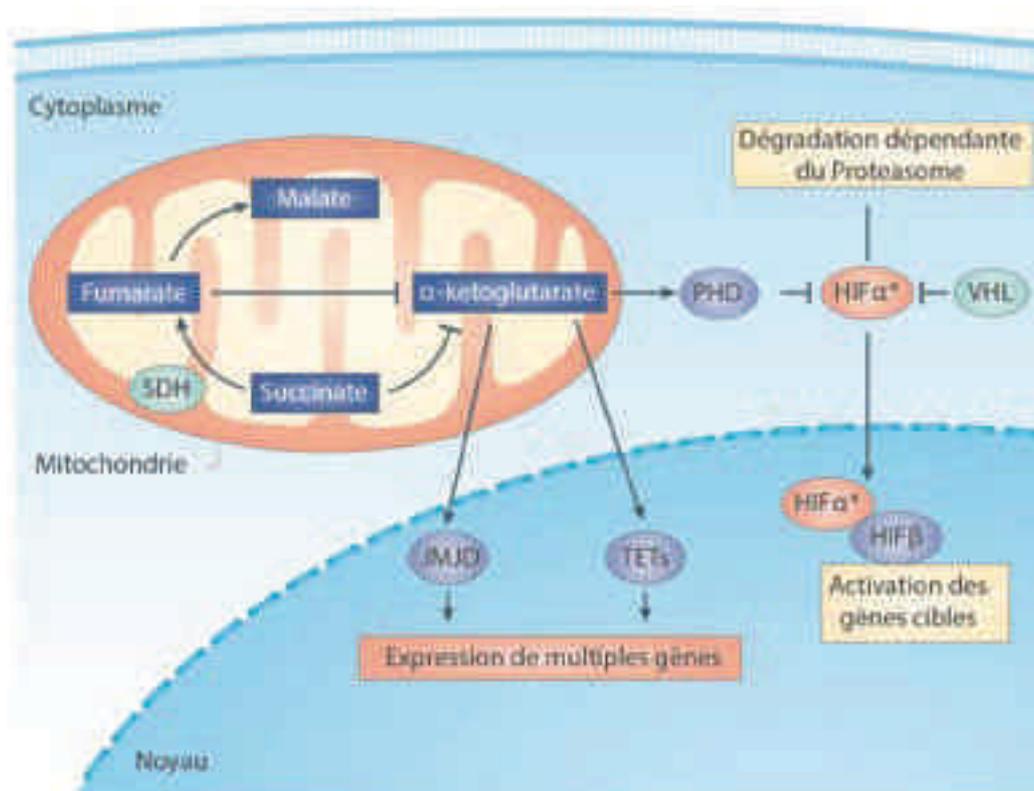


FIGURE 12. Voie de la pseudohypoxie dans les PHEO du cluster 1. Les mutations dans la protéine Von-Hippel-Lindau (VHL) et de la succinate déshydrogénase (SDH) interviennent dans la tumorigénèse des PHEO *via* une augmentation de l'activation des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs). Les sous-unités de HIF1 α et HIF2 α forment un complexe avec HIF1 β et activent la transcription des gènes cibles impliqués dans l'angiogénèse, le métabolisme, la prolifération cellulaire ou encore l'apoptose. La mutation de VHL altère la dégradation dépendante du protéasome des HIFs, ce qui conduit à une accumulation des HIFs et donc à l'activation des voies de signalisation régulées par ces protéines. La perte de fonction de SDH conduit à une accumulation de son substrat, le succinate, qui inhibe de façon compétitive l'activité du α -ketoglutarate (α KG). Par conséquent l'activation des dioxygénases (PHD) dépendante des α KG est inhibée, induisant une diminution de la dégradation des HIFs. L'inhibition du α KG conduit également à une inhibition de l'activité des Jumonji-related histone demethylases (JMJD), qui déméthylent les histones, et des ADN hydroxylases de la famille TET (TeTs) qui déméthylent l'ADN. Ainsi, la perte de fonction de SDH conduit à l'activation des HIFs et à une hyperméthylation des gènes cibles. Les protéines avec des mutations qui conduisent à une perte de fonction sont présentées en vert tandis que les protéines avec des mutations activatrices sont présentées en rouge. HIF α^* représente HIF1 α et HIF2 α (mais seulement HIF2 α est muté dans les PHEO). PHD** représente PHD1, PHD2 et PHD3 (mais seulement PHD2 est muté dans les PHEO). D'après (Dahia, 2014).

3.3.2.2. Cluster 2 : voie des récepteurs tyrosine kinases

La voie RAS et la voie PI3K/AKT/mTor sont des voies de signalisation anormalement activées dans de nombreux cancers. Elles sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, la survie, la différenciation, la migration et l'angiogenèse. Dans le cas des PHEO du cluster 2, les mutations des gènes RET, NF1, TMEM127, MAX et H-RAS sont toutes impliquées de manière directe ou indirecte dans la régulation de ces voies de signalisation. Les mutations dans les gènes TMEM127 et MAX ayant été découvertes récemment, les mécanismes par lesquels une mutation de ces gènes peut être impliquée dans la tumorigénèse des PHEO restent à préciser. C'est pourquoi je m'attarderai uniquement sur les gènes RET et NF1, dont les voies de signalisation sont présentées dans la **FIGURE 13** (pour revue, lire (Dahia, 2014)).

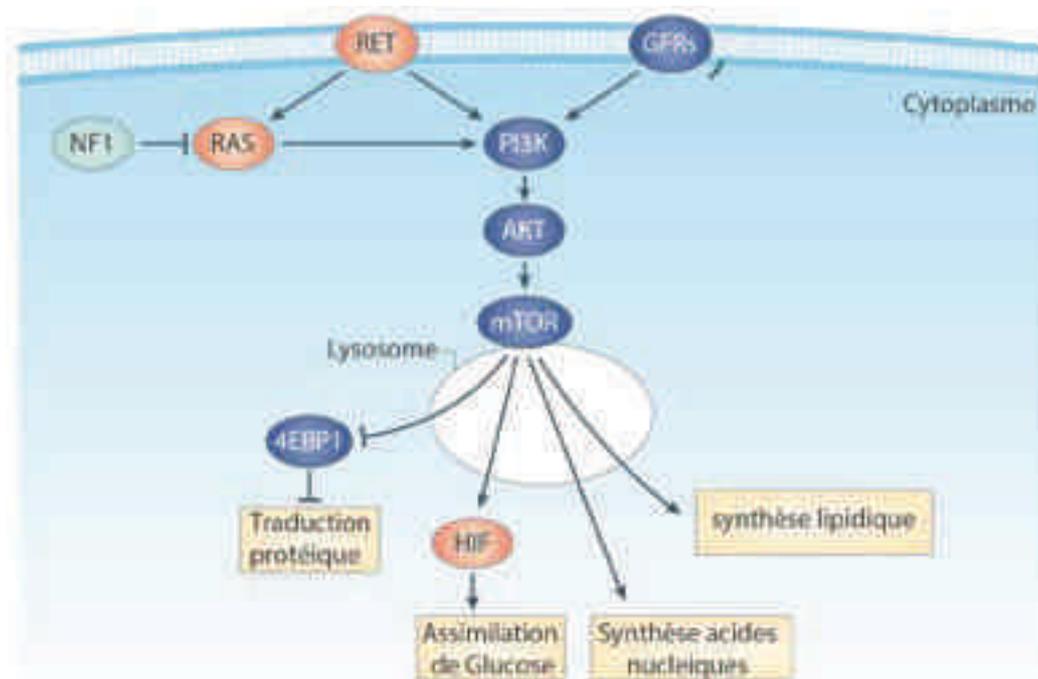


FIGURE 13. Voie des récepteurs tyrosine kinases dans les PHEO du cluster 2. Les mutations de RET et de la neurofibromine 1 (NF1) conduisent à l'augmentation de la voie de signalisation des récepteurs tyrosine kinases et des voies activées en amont, telles que mTor. Le récepteur tyrosine kinase RET activé initie une cascade d'évènements conduisant à l'activation de RAS et de la voie PI3K-AKT induisant l'activation de mTor. La mutation activatrice de RET conduit à une suractivation de cette voie. Une fois activé, mTor régule la croissance cellulaire, *via* la synthèse de protéines telle que 4EBP1, des acides nucléiques, des lipides et acides gras et conduit à l'augmentation de l'assimilation de glucose (*via* l'activation des HIFs). Ces voies de signalisation sont contrôlées par diverses protéines, comme NF1, une protéine GAP (GTPase Activating Protein) qui inhibe l'activation de RAS. Par conséquent, la mutation inactivatrice de NF1 conduit à une activation constitutive de RAS, dont la fonction d'oncogène dans les tumeurs humaines est largement admise. Les protéines avec des mutations qui conduisent à une perte de fonction sont présentées en vert tandis que les protéines avec des mutations activatrices sont présentées en rouge. D'après (Dahia, 2014).

Comme l'indique le **TABLEAU 5**, les différentes mutations dans les gènes de susceptibilité ne sont pas spécifiques des PHEO puisqu'elles sont également retrouvées dans les autres tumeurs associées aux syndromes familiaux. A titre d'exemple, l'inactivation de VHL caractéristique du syndrome VHL, est retrouvée dans les carcinomes rénaux à cellules claires (*Shen and Kaelin, 2013*). Par conséquent, si la mutation de VHL contribue à la tumorigénèse, elle ne constitue pas à elle seule l'évènement moteur à l'origine du développement d'un PHEO présentant une inactivation de cette protéine. En effet, la cartographie de l'ensemble des mutations dans un PHEO/PGL individuel n'est pas connue à ce jour, mais la co-occurrence de diverses mutations (notamment de mutations dans des oncogènes ou des supresseurs de tumeurs) et d'évènements épigénétiques paraissent nécessaires pour expliquer son développement. De ce fait, des études complémentaires sont primordiales pour mieux cerner les mécanismes à la base du développement des PHEO/PGL. De plus, si la découverte des nombreux gènes de prédisposition ont permis une meilleure compréhension de la tumorigénèse chez près de la moitié des patients présentant un PHEO/PGL, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'autre moitié des PHEO/PGL sporadiques non déterminés génétiquement sont totalement inconnus à ce jour.

3.3.3. Corrélation génotype-phénotype

Les divers fonds génétiques des PHEO sont associés avec des différences au niveau clinique, comprenant la localisation de la tumeur, la propension à la malignité et le type de catécholamine sécrété (voir **TABLEAU 5**). En effet, les tumeurs associées à une mutation de la SDH surviennent surtout dans des localisations extra-surréaliennes tandis que les tumeurs dues à une mutation des gènes du cluster 2 (RET, NF1, TMEM127 et MAX) se développent au niveau de la surrénale. Les tumeurs associées à une mutation VHL apparaissent à divers sites, mais préférentiellement au niveau de la surrénale. Enfin, les PGL associés à une mutation SDHB développent très souvent des métastases (*Blank et al., 2010*). De façon intéressante, une étude de G. Eisenhofer et collaborateurs a montré une corrélation entre la nature des catécholamines sécrétées et la localisation de la tumeur. Les patients dont le dosage plasmatique révèle une augmentation de métanéphrine mais pas de normétanéphrine présentent préférentiellement une tumeur surrénalienne (*Eisenhofer et al., 2005b*). La même équipe a montré quelques années plus tard un lien entre

l'augmentation du métabolite de la dopamine, la méthoxytyramine, et le taux de métastases (*Eisenhofer et al., 2012*). Ainsi, un profil biochimique des PHEO peut être établi au regard des clusters 1 et 2. En effet, les PHEO du cluster 2 sont caractérisés par un phénotype sécrétoire adrénérgique tandis que les tumeurs du cluster 1 expriment faiblement la PNMT qui catalyse normalement la conversion de la noradrénaline en adrénaline, conduisant à une sécrétion prédominante de noradrénaline. De même, les PHEO associés à une mutation dans l'une des sous-unités de la SDH n'expriment pas la PNMT et tendent vers un phénotype immature avec une production importante de dopamine et/ou de la noradrénaline. De plus, le taux de catécholamines sécrété semble plus élevé dans ce type de tumeurs (*Eisenhofer et al., 2001, 2011*). Cette différence a été reliée à la voie de sécrétion des catécholamines. En effet, les auteurs ont proposé qu'un défaut de sécrétion régulée dans ce type de tumeurs pourrait conduire à un taux de sécrétion plus élevé, par un processus de sécrétion continue/constitutive des catécholamines (*Eisenhofer et al., 2008*). Cependant, les mécanismes moléculaires exacts du dysfonctionnement de la sécrétion observée dans les PHEO restent à élucider. De plus si les données actuelles suggèrent des liens étroits entre le profil sécrétoire des PHEO et les conséquences cliniques, nous ne connaissons pas encore l'impact de l'activité sécrétrice des cellules tumorales sur le développement des PHEO.

3.4. Thérapeutique

Actuellement, le seul traitement curatif des PHEO/PGL est l'exérèse chirurgicale, principalement réalisée sous coelioscopie. La principale difficulté de l'acte chirurgical est liée aux risques de décharges catécholaminérgiques. Ainsi, dès que le PHEO/PGL est diagnostiqué et localisé, un traitement pré-opératoire est administré (α et β -bloquants en particulier), afin d'éviter les crises hypertensives liées aux catécholamines et d'éviter les complications pendant l'opération. Une étude montre que des complications pendant l'opération ne sont présentes que pour seulement 3% des patients sous traitement contre 69% pour les patients non traités (*Goldstein et al., 1999*).

Lorsque l'ablation de la tumeur représente un risque chirurgical, des techniques visant à réduire le volume tumoral sont utilisées. Par exemple, la radiothérapie externe est souvent indiquée pour stabiliser les tumeurs invasives de la tête et du cou, alors que la radiothérapie métabolique à l' ^{123}I -MIBG est proposée pour traiter les PHEO/PGL multiples, récurrents ou

malins (*Chino et al., 2009; Taïeb et al., 2012*). De plus, la chimiothérapie peut être utilisée pour le traitement des métastases (*Huang et al., 2008*).

3.5. Prise en charge des PHEO/PGL malins

Plus de 20% des PHEO et PGL sont malins, avec des lésions métastatiques ainsi que des rechutes locales (*Galan and Kann, 2013*). Malheureusement, il reste impossible aujourd'hui de prédire le développement d'un PHEO/PGL malin car aucune caractéristique histologique de la tumeur ne peut prouver des caractères malins (*Martucci and Pacak, 2014*). En effet, Thompson avait établi un score histologique, appelé score de PASS (Pheochromocytome of the Adrenal Gland Score) pour évaluer la malignité des PHEO/PGL, basé sur douze critères morphologiques mais des études ont montré qu'aucune véritable corrélation ne pouvait être faite entre le score obtenu et la malignité future (*Thompson, 2002; Agarwal et al., 2010*). De plus, parmi les différentes pistes explorées à ce jour pour prédire la malignité, aucune n'a été validée. A titre d'exemple, l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse a été rapportée dans les tumeurs malignes en comparaison avec les tumeurs bénignes, mais l'étude montre aussi une augmentation de l'expression de ces gènes dans 30% des tumeurs bénignes (*Favier et al., 2002*). Ainsi, la définition d'un PHEO/PGL malin est uniquement basée sur la présence de métastases, les sites les plus courants étant les os, poumons, foie et ganglions lymphatiques (*Lenders et al., 2005*). Les seules prédictions de malignité existant actuellement sont données par la présence de la mutation SDHB, les tumeurs de grande taille (> 5cm) ou la localisation extra-surrénalienne. La communauté scientifique ne possédant pas de véritables indices de malignité, il paraît important à l'heure actuelle que chaque patient puisse bénéficier d'un génotypage SDHB. Néanmoins, il est primordial de mener des études supplémentaires dans le but de pouvoir diagnostiquer une potentielle évolution maligne d'un PHEO.

1. RAPPELS DES OBJECTIFS

La plupart des cancers neuroendocrines sont associés à une hypersécrétion hormonale. Actuellement, ce dysfonctionnement de la sécrétion est connu par les cliniciens puisqu'il est responsable des symptômes chez les patients et engendre des complications cliniques. De plus, des données de la littérature suggèrent que la sécrétion des cellules tumorales pourrait influencer le développement des tumeurs (*Cuttitta et al., 1985; Song et al., 2003; Courel et al., 2014*). Cependant, l'impact réel de l'activité sécrétrice des cellules neuroendocrines sur l'initiation et/ou le développement des tumeurs n'a jamais été clairement démontré. Mon objectif ici est d'éclaircir ce point en comparant le développement tumoral de cellules neuroendocrines possédant des propriétés sécrétrices distinctes. Pour cela, nous avons choisi comme modèle expérimental, le phéochromocytome (PHEO), une tumeur dérivant des cellules chromaffines de la médullosurrénale qui est caractérisée par une hypersécrétion de catécholamines. Grâce aux conseils techniques du Dr. Dubessy (INSERM U982, Université de Rouen), j'ai pu mettre au point au laboratoire un modèle de xénogreffes sous-cutanées de cellules de PHEO de rat (PC12) chez la souris immunodéficente de type Nude. Les cellules PC12 étant capables de développer des tumeurs sous cutanées chez ces souris immunodéficientes (*Denorme et al., 2014*), cette approche nous a permis de mesurer la croissance tumorale tout en manipulant l'activité sécrétrice des cellules neuroendocrines à l'origine de la tumeur.

2. ÉTUDE DU ROLE DE LA SÉCRÉTION DANS LA CROISSANCE TUMORALE

2.1. Modèles expérimentaux utilisés

2.1.1. Présentation des lignées cellulaires de PHEO

Au laboratoire, nous possédons plusieurs lignées de cellules de PHEO de rat (PC12) : la lignée PC12 originale, établie en 1976 par l'équipe de A.Tischler, qui provient d'un PHEO de rat irradié (*Greene and Tischler, 1976*) ainsi que les clones C-27 et A35C qui sont deux variants spontanés de la lignée PC12 caractérisés par une perte de leurs capacités sécrétrices (*Corradi*

et al., 1996; Pance et al., 1999). Les cellules C-27 et A35C sont dépourvues de granules de sécrétion (**FIGURE 14**). En effet, ces clones n'expriment pas la majorité des protéines indispensables pour la granulogénèse telles que les granines (CgA, CgB, et SgII) et le processus d'exocytose régulée telles que la synaptophysine, la synaptotagmine I ou encore les protéines SNARE et leurs régulateurs (VAMP2, syntaxine 1A, SNAP25, Munc18 et Rab3A...). Cette particularité confère ainsi à ces clones l'incapacité de stocker et de libérer les catécholamines. En revanche, les voies de l'endocytose et la voie de sécrétion constitutive y sont préservées (*Malosio et al., 1999*). Enfin, il a été montré que le phénotype non sécrétant est la conséquence d'une répression transcriptionnelle par le facteur REST (**RE-1 Silencing Transcription Factor**) des gènes impliqués dans la voie de sécrétion régulée (*D'Alessandro et al., 2008*).

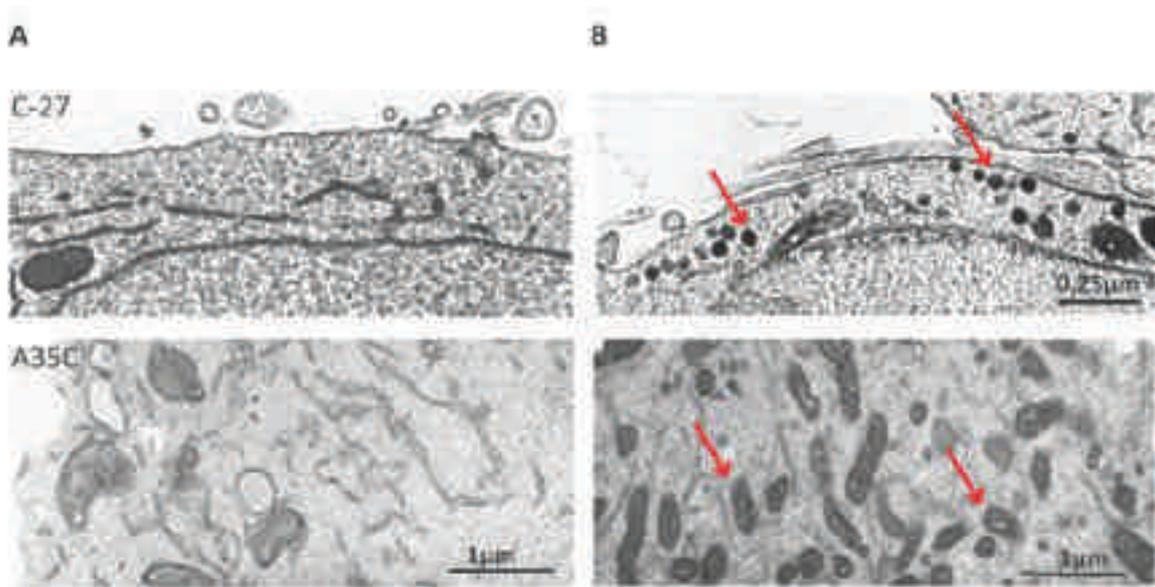


FIGURE 14. Caractérisation ultrastructurale des cellules C-27, A35C et des PC12 sauvages. Photos prises au microscope électronique illustrant (A) les clones non sécrétants C-27 (en haut) et A35C (en bas) et (B) les PC12 sauvages. Les flèches indiquent les granules de sécrétion dans les PC12. Les cellules C-27 et A35C en sont dépourvus. Tiré de (*Malosio et al., 1999; Pance et al., 1999*).

2.1.2. Caractérisation du profil sécrétoire des cellules A35C et C-27

J'ai voulu caractériser et comparer le profil sécrétoire des trois lignées cellulaires à notre disposition (**FIGURE 15**). Pour cela, j'ai tout d'abord mesuré le contenu cellulaire total des trois types de catécholamines (adrénaline, noradrénaline et dopamine) en utilisant un dosage ELISA. A l'instar des PC12 sauvages, les cellules C-27 contiennent exclusivement de la

dopamine (FIGURE 15A). En revanche, aucune des trois catécholamines n'a pu être détectée dans les cellules A35C. J'ai ensuite mesuré l'activité sécrétrice des cellules PC12 et C-27. Seules les cellules PC12 ont la capacité de sécréter la dopamine suite à une stimulation par une solution dépolarisante de potassium, autrement dit par la voie de la sécrétion régulée (FIGURE 15B). En conclusion, nous possédons trois types de modèles cellulaires : i) les cellules PC12 capables de synthétiser, stocker et sécréter la dopamine ; ii) les cellules C-27 capables de synthétiser autant de dopamine que les PC12 mais incapables de la sécréter et iii) les cellules A35C incapables de synthétiser la dopamine.

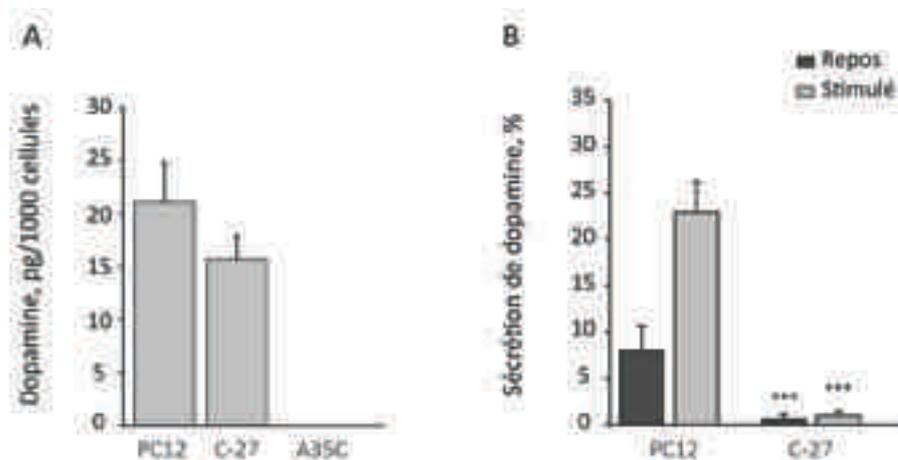


FIGURE 15. Caractérisation du profil sécrétoire des cellules PC12, C-27 et A35C. (A) Concentration de dopamine totale en pg/1000 cellules (B) Sécrétion de dopamine, au repos et après stimulation avec une solution dépolarisante contenant 59mM de potassium. Le dosage des catécholamines est réalisé par méthode ELISA. Les résultats sont présentés en moyenne de 3 expériences indépendantes, \pm SEM. Test de Kruskal-wallis (comparaison multiple), *** $p < 0,001$ par rapport aux cellules PC12.

2.1.3. Etude des capacités prolifératives des différentes lignées PC12 *in vitro*

Avant d'étudier le développement tumoral de ces cellules *in vivo*, il était nécessaire de caractériser leur comportement *in vitro*, et notamment leur vitesse de prolifération. La vitesse de prolifération des trois lignées cellulaires a été mesurée par comptage des cellules en cytométrie en flux et il s'avère que les deux clones C-27 et A35C prolifèrent à la même vitesse que les PC12 sauvages (FIGURE 16A). J'ai également analysé la capacité des cellules à proliférer en absence d'adhérence au substrat dans un modèle de croissance en milieu semi-solide (soft agar, FIGURE 16B), technique rendant compte de la tumorigénicité des cellules *in vitro*. Comme illustré dans la FIGURE 16C, les trois lignées ont la capacité de former des colonies en absence d'adhérence. De plus, comparé aux cellules PC12 sauvages, le

nombre de colonies formées par les cellules C-27 et A35C ne semble pas varier significativement. En revanche, j'ai pu noter que les cellules C-27 ont la capacité de former un plus grand nombre de colonies que les A35C. En conclusion, chacun des deux clones C-27 et A35C présente les mêmes caractéristiques tumorigènes *in vitro* que les PC12 sauvages mais une différence existe entre les deux clones, puisque les A35C présentent une moins grande tumorigénicité que les C-27.

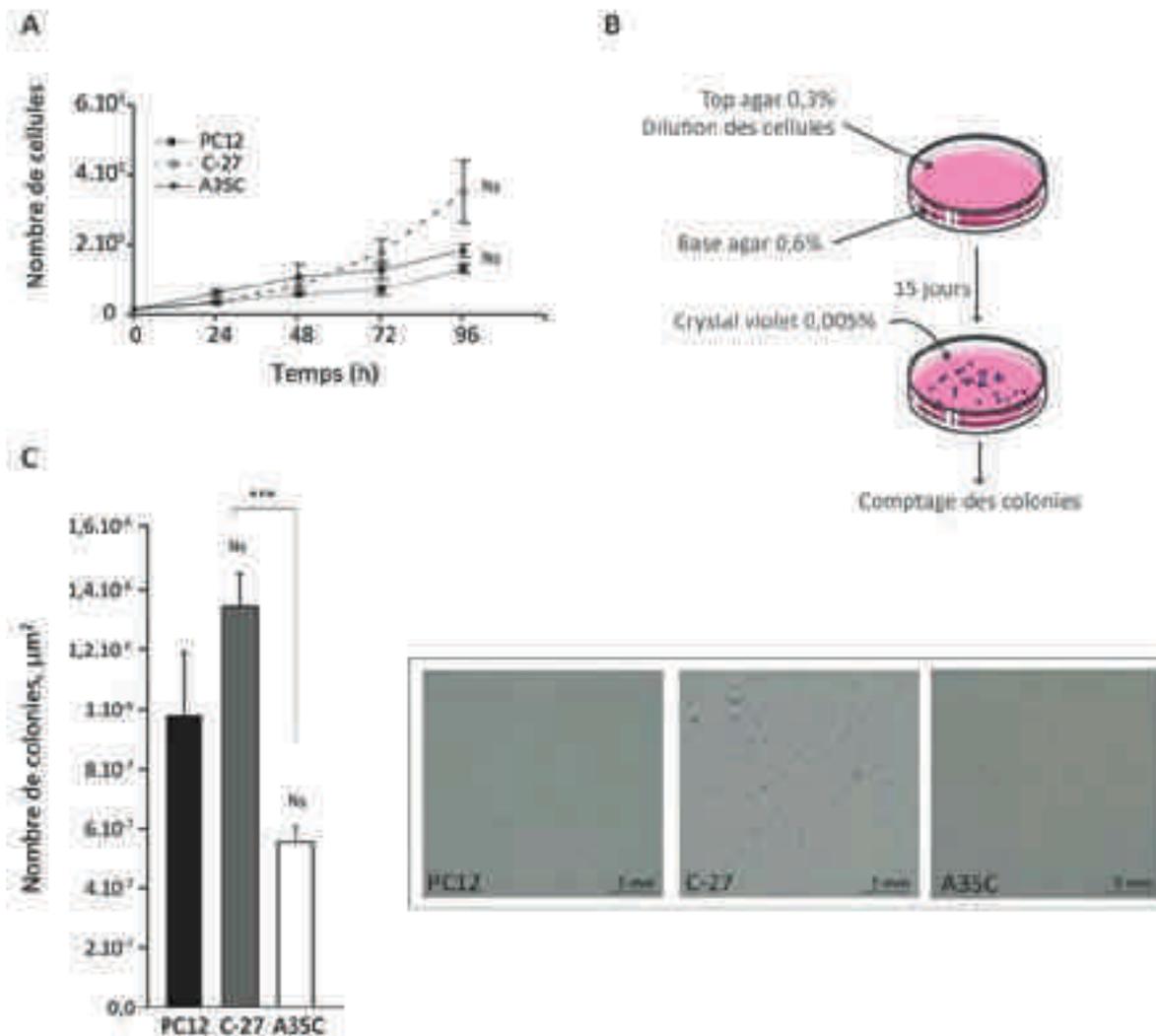


FIGURE 16. Caractérisation des propriétés *in vitro* des PC12, C-27 et A35C. (A) Vitesse de prolifération *in vitro* mesurée par comptage cellulaire en cytométrie de flux. Les résultats sont présentés en moyenne de 3 expériences indépendantes, \pm SEM. Test des rangs de Friedman, Ns : non significatif. (B) Protocole expérimental de prolifération en soft agar. Les cellules sont diluées dans la couche d'agar supérieure (0,3%) et maintenues à 37°C pendant 15 jours puis les colonies formées sont colorées au crystal violet. (C) A gauche, histogramme représentant le nombre de colonies comptées par μm^2 , en soft agar. $n=3 \pm$ SEM. Test de Kruskal-Wallis (comparaison multiple) Ns : non significatif par rapport aux PC12, *** $p<0,001$. A droite, illustration du nombre de colonies obtenues en soft agar.

2.2. Comparaison de la croissance tumorale des cellules PC12, C-27 et A35C *in vivo*

La technique de xénogreffes chez des souris immunodéficientes Nude permet de suivre la croissance tumorale induite par l'injection sous-cutanée de cellules PC12 (Zielke *et al.*, 1998; Denorme *et al.*, 2014). En utilisant cette approche, j'ai analysé la croissance tumorale des trois lignées cellulaires (PC12, C-27 et A35C) que j'ai injecté en sous cutané chez quarante souris femelles immunodéficientes de type Nude NMRI-nu (RjOrl:NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}). En contrôle, nous avons injecté une cohorte de dix souris avec une solution saline ne contenant pas de cellules. Aucune des souris contrôles n'a développé de tumeurs (non montré). En revanche, chacune des lignées cellulaires injectées est capable d'induire et de développer des tumeurs sous-cutanées (FIGURE 17B). De façon intéressante, la croissance des tumeurs dérivant des clones C-27 et A35C est fortement retardée par rapport à la croissance tumorale induite par les PC12 sauvages. En effet, pour un volume tumoral de 0,8 cm³, le retard de croissance est respectivement de 27,7 et 59,8 jours pour les cellules C-27 et A35C, par rapport aux PC12. De plus, il est intéressant de noter également un retard de l'initiation de la tumeur. En effet, le volume d'initiation de la tumeur (fixé à 5mm³; voir matériel et méthodes pour détails), est atteint avec un retard respectif de 6,81 et 26,1 jours pour les clones C-27 et A35C par rapport aux cellules PC12. Enfin, concernant la vitesse de développement des tumeurs, j'ai pu observer que le volume des tumeurs dérivant des clones A-35C et C-27 présentent un temps de doublement plus élevé que celui des tumeurs dérivant des PC12 sauvages (36,5 ; 22,7 et 7,4 jours, respectivement), indiquant une vitesse de développement moindre pour les clones non sécrétants (voir TABLEAU 6 pour résumé des caractéristiques).

Tout du long de l'expérience de xénogreffes, j'ai également dosé la dopamine dans le plasma des souris Nude afin de vérifier si les cellules conservaient bien leurs capacités sécrétrices *in vivo* (FIGURE 17C). Dans les souris injectées avec les cellules PC12, la concentration circulante de dopamine augmente proportionnellement au volume de la tumeur tandis que la concentration plasmatique de dopamine des souris ayant reçu l'injection des clones non sécrétants reste au même niveau que celle des souris contrôles (0,01 µg/ml ± 0,001). En effet, la concentration circulante de dopamine et le volume de la tumeur sont étroitement liés chez les souris ayant reçu l'injection de PC12 comme l'indique le coefficient de spearman

ρ qui est compris entre 0,8 et 0,9 ($\rho=0,84$). En revanche, la valeur du coefficient chez les souris ayant reçu l'injection de C-27 et A35C se situe en dessous de 0,5 indiquant que les variables sont faiblement liées. Ces dosages confirment donc que les trois lignées injectées conservent leur phénotype sécrétoire respectif *in vivo*.

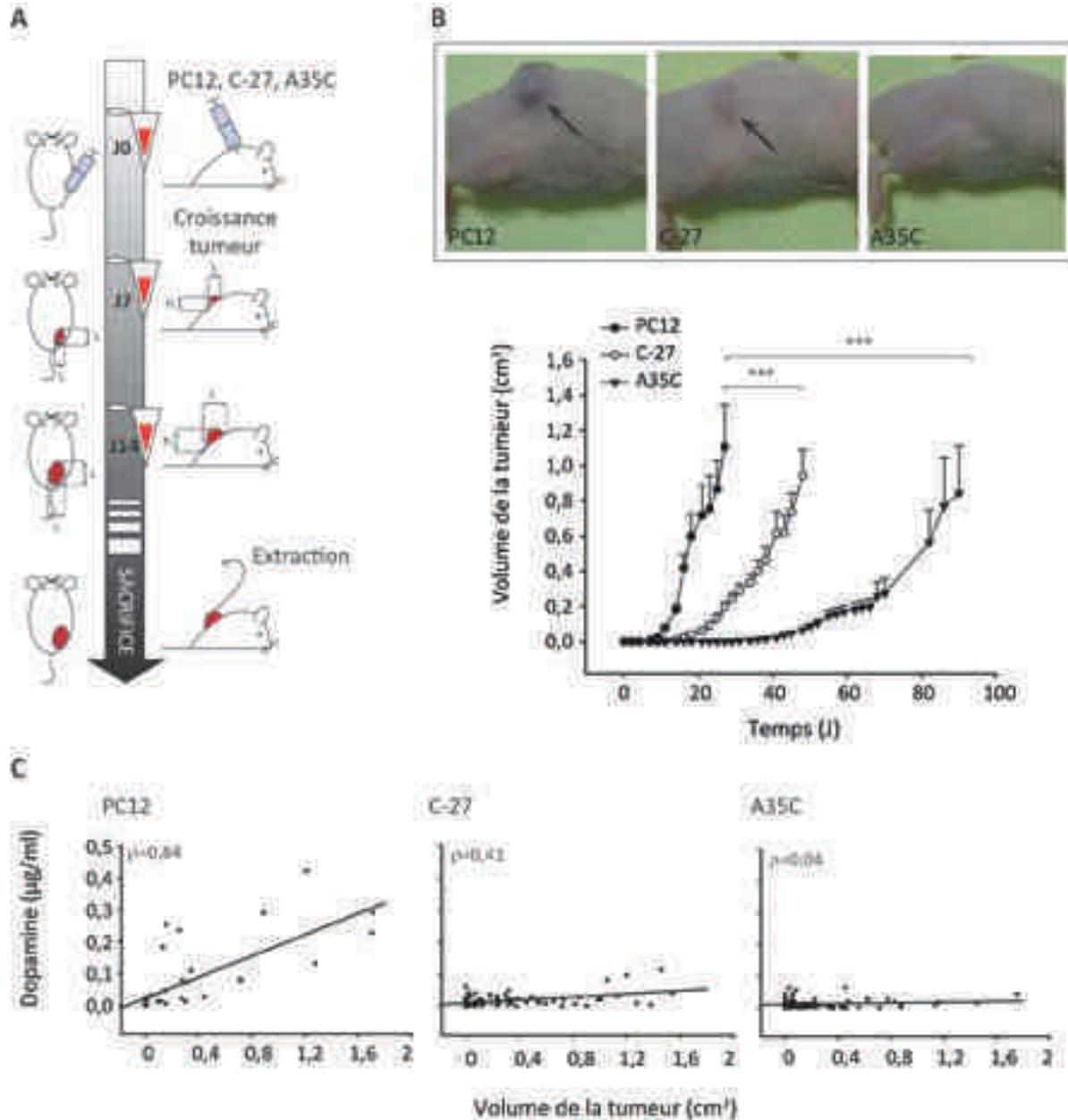


FIGURE 17. Croissance tumorale des cellules PC12, C-27 et A35C *in vivo*. (A) Protocole de xéno greffe des cellules chez les souris Nude. Les cellules sont injectées chez les souris en sous-cutané puis le volume de la tumeur est mesuré tous les trois jours. En parallèle, un prélèvement sanguin sous mandibulaire hebdomadaire est réalisé afin de doser la dopamine plasmatique des souris (B) En haut, illustration des tumeurs au 21^{ème} jour pour les trois groupes de souris. En bas, graphique représentant la croissance tumorale pour les trois groupes de souris ayant reçu les injections de cellules. Moyenne \pm SEM, n=10 souris par condition ; *** p<0,001, test des rangs de Friedman (C) Graphique représentant le volume de la tumeur en fonction de la concentration de dopamine plasmatique pour les souris ayant reçu l'injection de PC12, C-27 ou A35C. ρ : corrélation de Spearman par rang.

| | PC12 | C-27 | A35C |
|--------------------------------------|-----------|----------------|----------------|
| T doublement | 7,4 ± 0,7 | 22,7 ± 4,1 *** | 36,5 ± 4,6 *** |
| Retard au V=0,8cm³ | | 27,7 *** | 59,8 *** |
| Retard au V=5mm³ | | 6,81 ** | 26,1 *** |

TABLEAU 6. Résumé des caractéristiques des tumeurs dérivant des PC12, C-27 et A35C. Le temps de doublement correspond au temps nécessaire pour que la tumeur double de volume ; les retards au V=0,8cm³ et V=5mm³ correspondent au délai pour atteindre les volumes de 0,8cm³ et 5mm³, respectivement, par rapport aux cellules PC12. n= 10 souris par conditions, ± SEM, test de Kruskal-Wallis, ***p<0,001 et **p<0,01 par rapport aux PC12.

L'ensemble de ces résultats indique que le développement dérivant des clones non sécrétants A35C et C-27 est fortement perturbé. En effet, les deux clones non sécrétants mettent plus de temps à initier la tumeur et le développement tumoral qui s'ensuit est beaucoup moins rapide que celui des PC12. De plus, il est intéressant de noter que le développement des tumeurs dérivant des A35C ne synthétisant pas de catécholamines est beaucoup moins rapide que celui des tumeurs dérivant des cellules C-27, qui semblent être capables de sécréter une faible quantité de dopamine dans le milieu extracellulaire. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que le retard très important du développement des tumeurs dérivant des clones A35C par rapport aux C-27 reflète en partie des capacités tumorigènes moindres *in vitro*. En revanche, mes données *in vitro* permettent de confirmer que le retard de croissance tumorale des C-27 n'est pas la conséquence d'une plus faible vitesse de prolifération ou tumorigénicité que les cellules PC12.

Comme je l'ai mentionné précédemment, les clones A35C et C-27 sont caractérisés par l'expression d'un facteur de transcription REST, responsable de la répression de la transcription des gènes impliqués dans la voie de sécrétion régulée. Cependant, des études ont montré l'existence d'une très grande diversité de gènes cibles du facteur REST. Nous pouvons citer par exemple les gènes codant pour des facteurs nucléaires, des récepteurs, ou encore des gènes impliqués dans le métabolisme (*Bruce et al., 2004*). Les gènes cibles de REST étant multiples, il n'est pas exclu que ce facteur puisse inhiber l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans un mécanisme affectant le développement tumoral. Ainsi, la réduction de la vitesse de la croissance tumorale observée pour ces deux clones n'est peut être pas uniquement liée à la fonction de sécrétion mais pourrait être la résultante de plusieurs facteurs. Or, nous aimerions connaître la contribution réelle de la

sécrétion dans le retard du développement tumoral. La suite de notre travail a donc consisté à tenter de créer d'autres modèles expérimentaux de cellules PC12 dont seule la sécrétion est bloquée.

2.3. Mise au point d'un modèle cellulaire non sécrétant dépourvu de la Chromogranine A

2.3.1. Présentation des lignées générées PC12 CgA-

Dans l'optique d'inhiber exclusivement la fonction de sécrétion sans modifier radicalement le transcriptome des cellules, nous avons tenté deux approches complémentaires toutes deux basées sur le pouvoir granulogénique de la chromogranine A (CgA) (*Kim et al., 2001*).

La première approche a été de tenter de restaurer la sécrétion dans les clones non sécrétants C-27 et A35C par expression de la CgA. En effet, il a déjà été montré que la CgA était capable de restaurer la granulogénèse dans les clones A35C (*Courel et al., 2006*). De plus, Courel et collaborateurs montrent que l'exocytose régulée par le calcium et induite par un sécrétagogue est restaurée dans ces clones A35C ré-exprimant la CgA. Nous avons donc généré des lignées stables suite à l'infection des clones C-27 et A35C avec des lentivirus contenant l'ADN codant pour la CgA. Malheureusement, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats puisque ni la granulogénèse ni les capacités sécrétrices ne sont restaurées dans nos clones C-27^{CgA+} et A35C^{CgA+} (non montré). Pour le moment, nous les avons donc écarté de l'étude (voir partie discussion).

La deuxième approche a consisté à bloquer spécifiquement la granulogénèse dans les PC12 sauvages. Pour cela nous avons établi une collaboration avec l'équipe «Génomique Fonctionnelle et Physiopathologie Neuroendocrine» du laboratoire de l'Unité INSERM 982 « Différenciation et communication neuronale et neuroendocrine » dirigée par le Dr. Youssef Anouar à Rouen. Cette équipe, spécialiste de la granulogénèse dans les cellules neuroendocrines ainsi que dans la biologie des phéochromocytomes, a récemment généré des clones de cellules PC12 exprimant de façon stable des ARN interférents (shRNA) dirigés contre la CgA (non publié). L'inhibition transitoire de l'expression de la CgA par des siARN étant déjà connue pour bloquer la granulogénèse (*Courel et al., 2006*), ces lignées représentent un bon outil pour apprécier le rôle de la sécrétion des granules dans la croissance tumorale.

L'équipe de Rouen a généré par infection virale deux lignées exprimant chacune un shRNA différent dirigé contre la CgA (PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-}) ainsi qu'une lignée contrôle exprimant un shRNA contenant une séquence aléatoire ne ciblant aucun ARN connu chez le rat (pour les détails techniques, se référer au chapitre matériel et méthodes). Dans un premier temps, nous avons vérifié l'efficacité de l'inhibition de l'expression de la CgA dans ces deux clones (**FIGURE 18**). Comme il a déjà été montré que l'inhibition de l'expression d'une granine peut altérer le niveau d'expression des autres granines (*Mahapatra et al., 2005; Montesinos et al., 2008*), nous avons également analysé l'expression de la chromogranine B (CgB) et de la sécrétogranine (SgII). L'expression de la CgA est bien inhibée dans le clone PC12^{CgA(1)-} tandis que le clone PC12^{CgA(2)-} conserve une expression faible de la protéine. De façon surprenante, l'expression de la CgB et de la SgII est également inhibée dans le clone PC12^{CgA(1)-} mais pas dans le clone PC12^{CgA(2)-} qui conserve un niveau d'expression de ces deux granines comparable aux cellules contrôles. Ainsi, nous avons généré un clone cellulaire dépourvu de l'expression simultanée des trois granines CgA, CgB et SgII (PC12^{CgA(1)-}) et un clone dont seule l'expression de la CgA est spécifiquement inhibée (PC12^{CgA(2)-}).

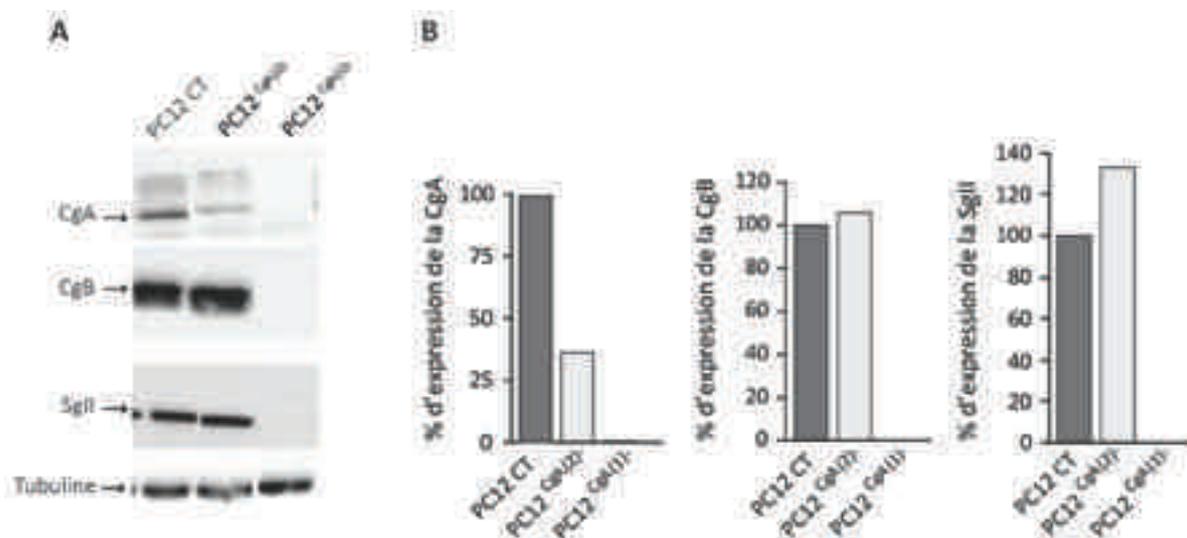


FIGURE 18. Expression des granines CgA, CgB et SgII dans les lignées PC12^{CgA-}. Immunodétection des granines par Western-Blot. (A) Illustration d'une membrane de western blot après révélation de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (B) Quantification de l'expression des granines en pourcentage d'expression par rapport aux cellules contrôles. PC12 CT = PC12 contrôles exprimant un ShRNA contrôle ; PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-} = PC12 exprimant chacune un ShRNA différent dirigé contre la CgA.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu analyser l'effet de l'inhibition des granines sur la granulogénèse. Pour cela, nous avons observé le contenu en granules de chaque lignée cellulaire par microscopie électronique (FIGURE 19). A l'instar des PC12 sauvages, les cellules contrôles exprimant un shRNA contrôle contiennent des granules. En revanche, les deux clones dont l'expression de la CgA est inhibée se comportent différemment. En effet, nous pouvons observer que les cellules issues des clones PC12^{CgA(2)-} contiennent des granules à coeur dense tandis que le clone PC12^{CgA(1)-} en est totalement dépourvu. Selon moi, ce résultat peut être expliqué de deux façons. Soit l'expression résiduelle de la CgA dans les clones PC12^{CgA(2)-} est suffisante pour générer des granules, soit une inhibition simultanée des trois granines est nécessaire pour bloquer totalement la granulogénèse dans les PC12. Enfin, notez qu'à ce stade de l'expérience, nous n'avons pas quantifié la proportion de granules dans chaque type de lignées.

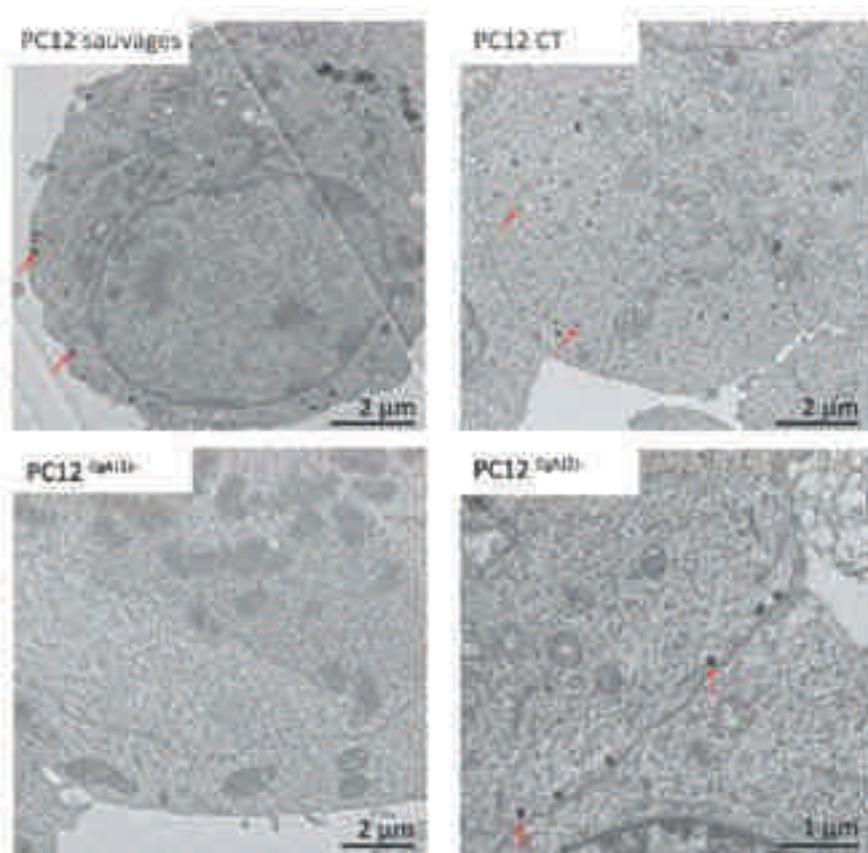


FIGURE 19. Caractérisation ultrastructurale des différents clones CgA-. Photos prises au microscope électronique, illustrant les granules de sécrétion dans les différents clones indiqués par des flèches rouges. Seuls les clones PC12^{CgA(1)-} en sont totalement dépourvus. PC12 CT = PC12 contrôles exprimant un ShRNA contrôle ; PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-} = PC12 exprimant chacune un ShRNA différent dirigé contre la CgA.

2.3.2. Caractérisation du profil sécrétoire des lignées PC12 CgA⁻

Parmi les lignées dont l'expression de la CgA est inhibée, une lignée est totalement dépourvue de granules tandis que dans l'autre, il semble persister une activité granulogénique résiduelle. Qu'en est-il des capacités sécrétrices de ces cellules ? De la même manière que les expériences décrites précédemment, j'ai comparé le profil sécrétoire des différents clones en mesurant les catécholamines par dosage ELISA (FIGURE 20). Comme les cellules PC12, les cellules PC12 contrôles exprimant un shRNA non spécifique ainsi que les clones PC12^{CgA(2)⁻} contiennent exclusivement de la dopamine. En revanche, aucune des trois catécholamines n'a pu être détectée dans le clone PC12^{CgA(1)⁻} qui n'exprime ni la CgA, ni la CgB ni la SglI (FIGURE 20A). Concernant l'activité sécrétrice régulée induite par un sécrétagogue, les cellules PC12 contrôles ainsi que les cellules PC12^{CgA(2)⁻} sécrètent la même quantité de dopamine que les PC12 sauvages (FIGURE 20B).

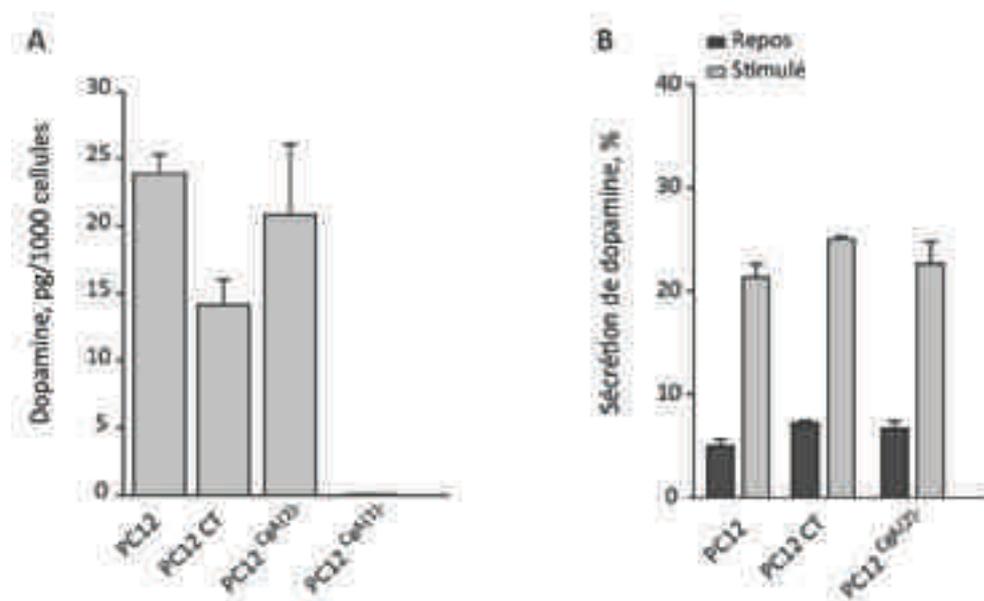


FIGURE 20. Caractérisation du profil sécrétoire des cellules PC12^{CgA⁻}. (A) Concentration de dopamine totale en pg/1000 cellules (B) Sécrétion de dopamine en pourcentage, au repos et après stimulation par une solution dépolarisante contenant 59mM de potassium. Le dosage des catécholamines est réalisé par méthode ELISA. PC12 CT=PC12 contrôles exprimant un ShRNA contrôle ; PC12^{CgA(1)⁻} et PC12^{CgA(2)⁻}=PC12 exprimant chacune un ShRNA différent dirigé contre la CgA Les résultats sont présentés en moyenne de 3 expériences indépendantes, ± SEM.

En conclusion, nous possédons plusieurs outils intéressants: i) les cellules PC12 contrôles capables de synthétiser, stocker et sécréter la dopamine ; ii) les cellules PC12^{CgA(2)⁻} dont l'expression de la CgA est inhibée mais pas complètement abolie et dont la granulogénèse et la fonction sécrétrice sont préservées et enfin iii) les cellules PC12^{CgA(1)⁻} n'exprimant plus du

tout les granines CgA, CgB et SgII et dont la granulogénèse et la capacité à synthétiser la dopamine sont totalement inhibées. Ainsi, le clone PC12^{CgA(1)-} constitue un bon modèle non sécrétant pour l'étude de l'impact de la sécrétion sur le développement tumoral. De plus, le clone PC12^{CgA(2)-} est très intéressant puisque ses capacités sécrétrices sont conservées mais le niveau d'expression de la CgA diffère par rapport aux cellules PC12 contrôles. Or de nombreuses données relatent d'une implication de la CgA dans le processus tumoral (*Corti, 2010*). C'est pourquoi nous avons décidé de tirer profit de l'obtention de ce clone présentant une inhibition de la CgA pour étudier spécifiquement le rôle de cette dernière dans la croissance tumorale des cellules PC12.

2.4. Comparaison de la croissance tumorale des cellules PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-} *in vivo*

Dans le but d'analyser le rôle de l'activité sécrétrice et de la CgA sur la croissance tumorale, nous avons choisi la même approche de xéno greffes que précédemment, en injectant les clones PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-} en sous cutané chez des souris femelles immunodéficientes Nude NMRI-nu (RjOrl:NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}). A ce stade du projet, seule une expérience préliminaire a été réalisée par l'équipe de Rouen sur un petit nombre de souris (n=5 par conditions).

Comme vous pouvez le constater **FIGURE 21**, chacun des clones injectés est capable d'induire et de développer des tumeurs chez les souris Nude. Notez tout d'abord que la croissance tumorale des PC12 contrôles est identique à celle des PC12 sauvages (non montré). De plus, l'analyse des courbes de croissance nous indique plusieurs choses intéressantes (voir **TABLEAU 7**). Nous pouvons observer que l'évolution des tumeurs dérivant des clones PC12^{CgA(2)-} semble identique à celles dérivant des PC12 contrôles. En effet, nous n'observons qu'un très faible retard de l'initiation de la tumeur et de croissance tumorale (1,8 et 3,2 jours, respectivement) par rapport aux PC12 contrôles tandis que leur vitesse de croissance reste inchangée (temps de doublement de 8,2 et 8,7 jours, respectivement). En revanche, la croissance des tumeurs dérivant des clones PC12^{CgA(1)-} est retardée par rapport à la croissance tumorale induite par les PC12 contrôles. En effet, pour un volume tumoral de 0,8 cm³, le retard de croissance des PC12^{CgA(1)-} est de 15,3 jours par rapport aux PC12 contrôles. De plus, à l'instar de nos données obtenues avec les clones C-27 et A35C, nous observons un

retard de l'initiation de la tumeur de 11,4 jours par rapport aux PC12 contrôles. Enfin, les tumeurs dérivant des clones PC12^{CgA(1)-} présentent un temps de doublement plus élevé que celui des tumeurs dérivant des PC12 sauvages (15,2 versus 8,7 jours, respectivement) indiquant une croissance bien plus lente.

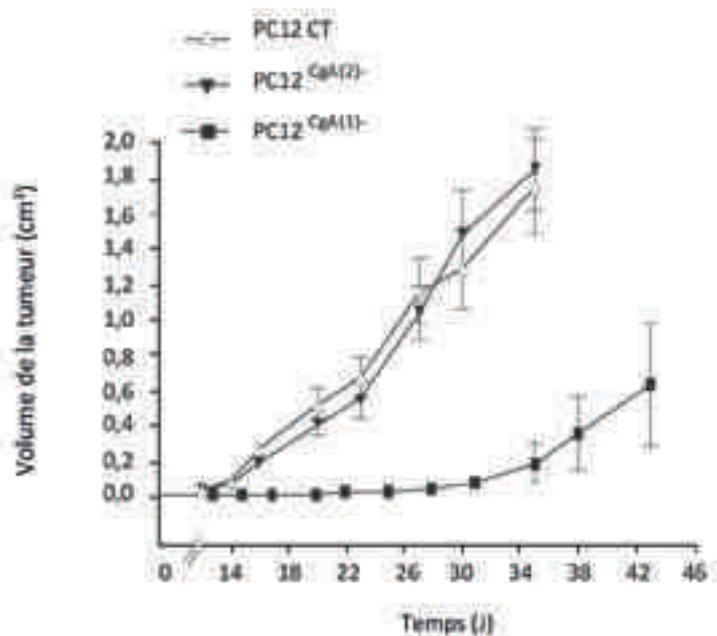


FIGURE 21. Croissance tumorale *in vivo* des lignées PC12^{CgA-}. Les cellules ont été injectées en sous cutanée chez des souris Nude, selon le même protocole que décrit **FIGURE 17**. PC12 CT=PC12 contrôles exprimant un ShRNA non spécifique, PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-}=PC12 exprimant chacune un ShRNA différent dirigé contre la CgA. n=5 par condition, moyenne ± SEM.

| | PC12 contrôles | PC12 ^{CgA(1)-} | PC12 ^{CgA(2)-} |
|--------------------------------------|----------------|-------------------------|-------------------------|
| T doublement | 8,7 | 15,2 | 8,2 |
| Retard au V=0,8cm³ | | 15,3 | 3,2 |
| Retard au V=5mm³ | | 11,4 | 1,84 |

TABLEAU 7. Résumé des caractéristiques des tumeurs dérivant des lignées PC12^{CgA-}. Le temps de doublement correspond au temps nécessaire pour que la tumeur double de volume ; les retards au V=0,8cm³ et V=5mm³ correspondent au délai pour atteindre les volumes de 0,8cm³ et 5mm³, respectivement, par rapport aux cellules PC12.

Ces résultats préliminaires sont très intéressants car ils indiquent que le développement tumoral est fortement perturbé dans les cellules n'exprimant plus les granines (CgA, CgB et SgII) et dépourvues d'activité sécrétrice tandis qu'aucune différence n'a pu être observée dans le cas des cellules sécrétrices qui expriment un niveau moins élevé de CgA. Notez que nous avons également effectué deux contrôles. Premièrement, en caractérisant la vitesse de prolifération *in vitro* des clones CgA⁻, nous avons démontré que les deux clones PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-} prolifèrent à la même vitesse que les cellules PC12 contrôles (**FIGURE 22**). Ainsi, l'inhibition de la croissance tumorale observée pour les cellules PC12^{CgA(1)-} n'est pas la

conséquence d'une réduction de la prolifération cellulaire *in vitro*. Deuxièmement, nous avons contrôlé que l'inhibition des granines était conservée *in vivo*, dans les tumeurs. Pour cela l'expression des trois granines a été quantifiée à partir de lysats provenant des tumeurs des souris Nude après extraction. Il s'avère que les taux d'expression de CgA, CgB et SgII sont identiques dans les tumeurs par rapport aux cellules dont elles dérivent (non montré). Ainsi, l'absence d'effet du clone PC12^{CgA(2)-} n'est pas la conséquence d'une perte de l'inhibition d'expression de la CgA.

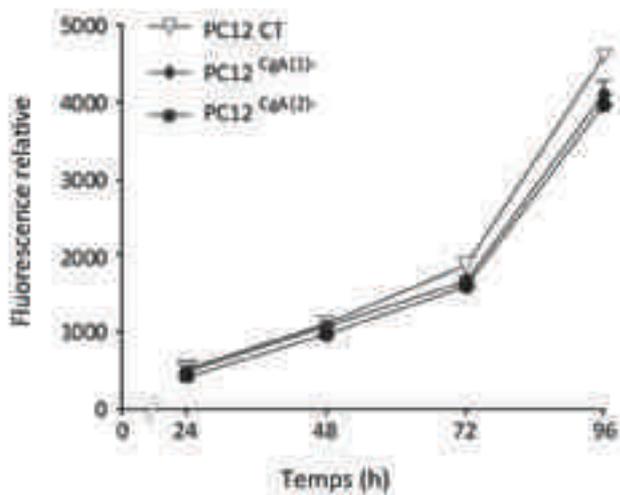


FIGURE 22. Prolifération *in vitro* des lignées cellulaires PC12^{CgA-} La prolifération est mesurée par méthode fluorimétrique et exprimée en fluorescence relative, qui est proportionnelle au nombre de cellules viables. PC12 CT=PC12 contrôles exprimant un ShRNA contrôle ; PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-}=PC12 exprimant chacune un ShRNA différent dirigé contre la CgA. n=3, ± SEM.

2.5. Corrélation entre l'activité sécrétrice et la croissance tumorale

Dans cette étude, l'ensemble des expériences de xénotransplantes réalisées avec six clones cellulaires distincts nous a permis de générer un certain nombre de données nous permettant d'étudier la corrélation entre l'activité sécrétrice des cellules et leur développement tumoral. Pour chacun des six clones, j'ai comparé l'activité sécrétrice *in vitro* et la croissance des tumeurs dérivant de ces clones chez les souris Nude. Lors de cette analyse, je me suis demandé si une étape en particulier de la croissance tumorale pouvait être affectée par l'activité sécrétrice des cellules. Afin d'aborder cette question, j'ai tenté d'établir un lien entre l'activité sécrétrice des cellules et les différents paramètres que j'ai pu analyser lors des expériences de xénotransplantes, à savoir : le temps de doublement du volume des tumeurs (qui reflète la vitesse de croissance), le délai pour atteindre le volume de 0,8 cm³ et le délai pour atteindre le volume d'initiation de 5 mm³ (FIGURE 23). De façon intéressante, le temps de doublement des tumeurs, ainsi que les délais pour atteindre les

volumes de $0,8 \text{ cm}^3$ et 5 mm^3 semblent être corrélés de la même manière à l'activité sécrétrice des cellules *in vitro*.

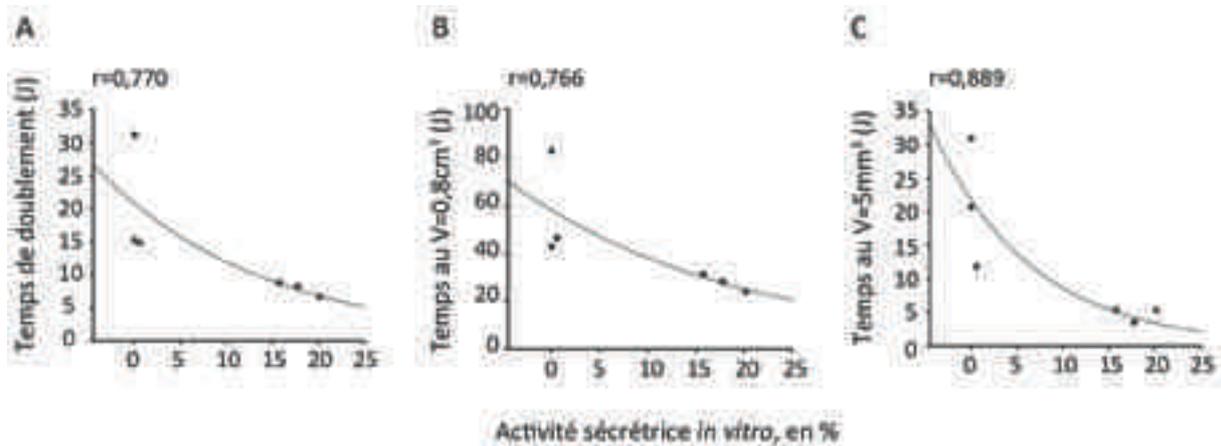


FIGURE 23. Corrélation entre l'activité sécrétrice *in vitro* et le temps de doublement des tumeurs ainsi que les délais pour atteindre les volumes de $0,8 \text{ cm}^3$ et 5 mm^3 , respectivement. Les six clones injectés chez les souris Nude sont représentés (PC12, C-27, A35C, PC12 contrôles, PC12^{CgA(1)-} et PC12^{CgA(2)-}). Le temps de doublement, le délai pour atteindre $V=0,8\text{cm}^3$ et le délai pour atteindre le $V=5\text{mm}^3$ sont exprimés en jours. L'activité sécrétrice *in vitro* est exprimée en pourcentage de sécrétion nette. Régression de type exponentielle, $f=a.e^{-bx}$.

Ces résultats permettent de valider la corrélation entre l'activité sécrétrice et le développement tumoral. Ainsi, la sécrétion semble affecter le délai conduisant à l'initiation de la tumeur mais également le développement tumoral qui s'ensuit. En effet, plus la sécrétion des cellules injectées chez les souris est élevée, plus le délai d'initiation de la tumeur est court et plus la tumeur se développe rapidement. De ce fait, ces résultats suggèrent que l'hypersécrétion observée dans les PHEO pourrait accélérer à la fois leur initiation et leur développement.

■ 1. APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES UTILISÉES

1.1. Modèle de xénogreffes et étude de la sécrétion régulée

Les cellules chromaffines sécrètent des catécholamines et autres composés par un processus d'exocytose régulée, principalement assuré par l'innervation cholinergique provenant des terminaisons synaptiques du nerf splanchnique. Dans le but d'analyser le lien entre l'activité sécrétrice des cellules de PHEO de rat et le développement tumoral dérivant de ces cellules, nous avons utilisé la technique de xénogreffes de cellules PC12 en sous-cutané chez des souris immunodéficientes. Dans ce modèle expérimental, les cellules injectées en sous cutané chez les souris sont dépourvues d'innervation et pourtant je mesure une importante sécrétion de dopamine dans le plasma des souris. Ce résultat soulève une question de taille : par quel(s) processus les différents composés sont-ils sécrétés dans ce modèle ?

In vitro, les PC12 libèrent la dopamine en réponse à une grande variété d'agents pharmacologiques tels que la nicotine, l'ATP ou encore le potassium, qui déclenchent une dépolarisation membranaire et/ou une élévation de la concentration cytosolique de calcium. Cependant, les PC12 sont capables de sécréter spontanément une certaine quantité de dopamine sans stimulation par un sécrétagogue, en condition dite « de repos », suggérant une sécrétion constitutive de l'hormone par les cellules (voir **FIGURE 15**). Par conséquent, la dopamine mesurée dans le plasma des souris pourrait refléter un processus de sécrétion constitutive *in vivo* par les cellules en absence de stimulation. Néanmoins, il est plausible que la manipulation des cellules dans les conditions de repos (i.e les changements de milieu) puisse induire une stimulation mécanique conduisant au déclenchement de l'exocytose *via* une entrée d'ions calcium faisant suite à l'activation de canaux sensibles à des stimuli mécaniques. La quantité de dopamine sécrétée au repos pourrait alors être la résultante d'une sécrétion régulée par le calcium et d'une sécrétion constitutive. Ainsi, la quantité de dopamine sécrétée de façon basale par les PC12 est peut être à minimiser. Si tel est le cas, comment expliquer la sécrétion de dopamine par les cellules *in vivo* ? Un agent stimulant peut-il induire l'exocytose régulée conduisant à la sécrétion de dopamine mesurée

dans le plasma des souris ? Nous pouvons d'abord envisager une boucle d'amplification du signal. En effet, les composés sécrétés en faible quantité dans le milieu extracellulaire par les cellules PC12 au repos, en particulier l'ATP, peuvent avoir une action autocrine et/ou paracrine et de cette manière stimuler l'exocytose régulée. De plus, le micro-environnement tumoral peut avoir un rôle important puisque les cellules injectées chez les souris commencent à proliférer jusqu'à ce qu'il se crée un environnement hypoxique qui stimule notamment le processus d'angiogénèse indispensable à la croissance tumorale. Or, il a été montré *in vitro* que l'hypoxie induit une sécrétion de catécholamines dépendante du calcium par les cellules PC12 (Kumar et al., 1998; Taylor and Peers, 1998; Taylor et al., 1999). Chez les souris Nude, un tel microenvironnement hypoxique généré par la croissance de la tumeur dérivant des cellules PC12 pourrait ainsi stimuler la sécrétion régulée de dopamine.

Cependant, même si des mécanismes stimulant l'exocytose régulée *in vivo* sont envisageables, nous ne pouvons pas exclure le fait que les PC12 puissent sécréter la dopamine uniquement de façon constitutive dans ce modèle de xéno greffes sous-cutané. Ainsi, afin d'étudier réellement l'impact de l'activité sécrétrice sur le développement tumoral, il a été primordial de contrôler la sécrétion basale des clones injectés chez les souris Nude, en s'assurant que les clones C-27, A35C et PC12^{CgA(1)} utilisés comme modèles non sécrétants soient totalement dépourvus de leur activité sécrétrice, régulée mais également constitutive (voir **FIGURE 15** et **FIGURE 20**). Notons toutefois que les clones C-27 sont capables de sécréter une petite quantité de dopamine de façon constitutive, mais je ne pense pas que cette caractéristique induise un biais dans notre étude puisque ces clones sécrètent considérablement moins que les PC12 sauvages.

1.2. Le challenge du « phénotype non sécrétant »

1.2.1. La dopamine comme marqueur de la sécrétion

Afin de caractériser les propriétés sécrétrices *in vitro* des différentes lignées cellulaires à notre disposition, nous avons choisi d'utiliser la dopamine comme marqueur de la sécrétion. De façon intéressante, une étude a révélé que le clivage de la SNAP25 par l'action de la toxine botulique A inhibe la libération de dopamine induite par une dépolarisation, mais pas la libération d'ATP (Yamboliev et al., 2009). Notons qu'il existe différents types de vésicules dans les cellules chromaffines, les granules à cœur denses et les petites vésicules

synaptiques. La ségrégation des composés (i.e amines, neuropeptides, purines) entre ces deux types de vésicules ainsi que leurs propriétés d'exocytose ne sont pas encore bien connus. L'existence de ces différentes vésicules pourrait expliquer la sécrétion d'un seul type de composé lorsque le complexe SNARE est inhibé. Dans ce cas, l'absence de sécrétion de la dopamine ne reflète pas une absence totale d'activité sécrétrice, ce qui permet de soulever la question de la pertinence de l'utilisation de la dopamine comme marqueur de la sécrétion dans notre étude. De plus, dans le cas des PC12^{CgA(1)-} et des A35C, l'utilisation de la dopamine dans le but d'étudier les capacités sécrétrices de ces clones est d'autant plus problématique puisque ces cellules n'ont plus la capacité de synthétiser cette hormone. Cependant, même si nous ne pouvons pas exclure la possibilité que nos clones « non sécrétants » (C-27, A35C et PC12^{CgA(1)-}) puissent sécréter d'autres composés que la dopamine, l'absence de tous types de vésicules dans chacun de ces clones constitue un indice suffisamment robuste pour suggérer une absence totale d'activité sécrétrice. Néanmoins, dans le but de s'affranchir du biais lié au dosage d'un seul composé par méthode ELISA, nous pourrions envisager une analyse des composés au repos et après stimulation des cellules par chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse. Cette technique reflèterait ainsi une mesure de l'activité sécrétrice plus complète et plus juste.

1.2.2. Cibler les protéines clés de l'étape de fusion, les SNARES

Pour avoir accès à des clones non sécrétants, nous avons d'abord tiré profit de l'action du facteur de transcription REST exprimé uniquement par les clones C-27 et A35C dérivant des cellules PC12 (*D'Alessandro et al., 2008*). L'expression de REST dans des cellules PC12 sauvages conduit à une diminution du nombre de granules et à une sécrétion de catécholamines moins efficace, confirmant que ce facteur de transcription est bien responsable du phénotype non sécrétant des clones C-27 et A35C (*Bruce et al., 2006*). Cependant, comme je l'ai mentionné précédemment, les gènes cibles de REST sont multiples et il a été primordial de s'affranchir de l'effet de ce facteur pour avoir accès à la contribution réelle de la sécrétion dans la réduction de la vitesse de croissance tumorale observée chez les souris Nude.

Une méthode pour bloquer spécifiquement la fonction de sécrétion consiste à inhiber l'expression des protéines impliquées dans l'étape de fusion membranaire, telles que les

protéines SNARE ou la synaptotagmine (SyT). Par exemple, l'équipe de Horkins a généré par une technique d'ARN interférence, des lignées de PC12 n'exprimant plus la SyT ou la SNAP25 et qui présentent une réduction de l'exocytose régulée (Cahill *et al.*, 2006; Papke *et al.*, 2012). Une autre stratégie possible afin de cibler spécifiquement les protéines clés de la fusion est de tirer profit du mécanisme d'action des toxines tétaniques (TeNT). Ces toxines sont formées de deux chaînes polypeptidiques, la chaîne lourde responsable de la liaison de la toxine à la membrane de la cellule et la chaîne légère, responsable des effets de la toxine. Une fois dans le cytoplasme, la chaîne légère clive la protéine VAMP/synaptobrevine grâce à son activité métalloprotéolytique dirigée vers cette protéine (Rossetto *et al.*, 2013). Les protéines SNARE ne sont alors plus capables de former le complexe hétérotrimérique et la fusion déclenchée par le calcium est ainsi inhibée (Schiavo *et al.*, 1992). Actuellement, la confection de lignées stables par transfection des cellules PC12 avec un plasmide codant pour la chaîne légère de la TeNT est en cours au laboratoire. Cependant, la génération de ces lignées soulève de nombreuses questions. Tout d'abord, nous ne savons pas encore si les cellules seront viables après l'action des TeNTs. De plus, les lignées n'exprimant plus la SyT ou la SNAP25 présentent une faible réduction de la sécrétion régulée de catécholamines, seulement de 53% et 63% par rapport aux cellules contrôles, respectivement. Ensuite, si nous considérons les limites du modèle de xénogreffes décrites précédemment, il est essentiel d'inhiber également la sécrétion basale de ces cellules. Or, les travaux de cette équipe ne présentent aucune donnée concernant la sécrétion au repos de ces lignées. Enfin, d'après l'étude de Yamboliev et collaborateurs, il sera vraiment nécessaire de vérifier l'ensemble des composés sécrétés par ces cellules puisque l'inhibition d'une protéine SNARE ne semble pas bloquer la sécrétion d'ATP (Yamboliev *et al.*, 2009).

1.2.3. Cibler une protéine impliquée dans la granulogénèse, la CgA

1.2.3.1. La CgA ne restaure pas la granulogénèse dans les C-27 et A35C

En parallèle de la création des lignées TeNT, la collaboration avec l'équipe de Rouen (INSERM U982 Différenciation et communication neuronale et neuroendocrine) nous a amené à nous intéresser aux effets granulogéniques de la CgA. La première approche a été de restaurer le processus de granulogénèse des clones non sécrétants C-27 et A35C par expression de la CgA. Dans un premier temps, j'ai analysé l'expression de la CgA par les

clones C-27^{CgA+} et A35C^{CgA+} (FIGURE 24). Pour cela, j'ai tout d'abord mesuré le contenu cellulaire total de CgA par immunodétection. Les deux clones expriment la CgA mais nous pouvons souligner la faible expression par les A35C^{CgA+} en comparaison avec les C-27^{CgA+} (FIGURE 24A). J'ai ensuite mesuré les capacités de ces deux clones à sécréter la CgA suite à une stimulation par un sécrétagogue. Il s'est avéré que les clones A35C^{CgA+} ne sont pas capables de sécréter la CgA, probablement à cause de la très faible expression de la protéine par ces cellules. En revanche, les cellules C-27^{CgA+} sécrètent la CgA dans le milieu extracellulaire, mais la quantité sécrétée est égale au repos ou après stimulation, indiquant une sécrétion non régulée de la CgA (FIGURE 24B). L'analyse ultrastructurale par microscopie électronique révèle une absence de granules de sécrétion dans ces clones, suggérant que l'expression de la CgA dans ces cellules ne semble pas être suffisante pour rétablir la biogenèse des granules (non montré). En corrélation avec l'absence de granules à cœur denses, les cellules C-27^{CgA+} ne retrouvent pas la capacité à sécréter la dopamine de façon régulée (FIGURE 24C). Cependant, l'hypothèse de la restauration de la sécrétion de dopamine par la CgA dans les clones non sécrétants nécessitait en plus de la granulogénèse, une ré-expression de tous les acteurs moléculaires impliqués dans la sécrétion régulée. Dans le cas où la CgA induirait une activité transcriptionnelle dans ces cellules, il faut garder à l'esprit que les clones C-27 expriment le facteur REST qui peut continuer à exercer une action répressive sur la transcription, rendant probablement impossible l'expression des protéines impliquées dans la voie de sécrétion régulée. Notons ici que nous ne nous attendions pas à de tels résultats puisqu'une étude avait montré que l'expression de la CgA dans les clones non sécrétants A35C conduisait à une restauration de la granulogénèse et également à la sécrétion régulée par le calcium de la CgA (Courel et al., 2006). Cependant, cette étude a été menée sur les A35C et pas sur les C-27 et dans notre cas, la très faible expression de la CgA par les clones A35C^{CgA+} est probablement insuffisante pour restaurer la granulogénèse et le processus de sécrétion. J'envisage donc de réaliser une nouvelle infection des A35C dans le but d'obtenir, si possible, des clones A35C^{CgA+} exprimant une plus grande quantité de CgA.

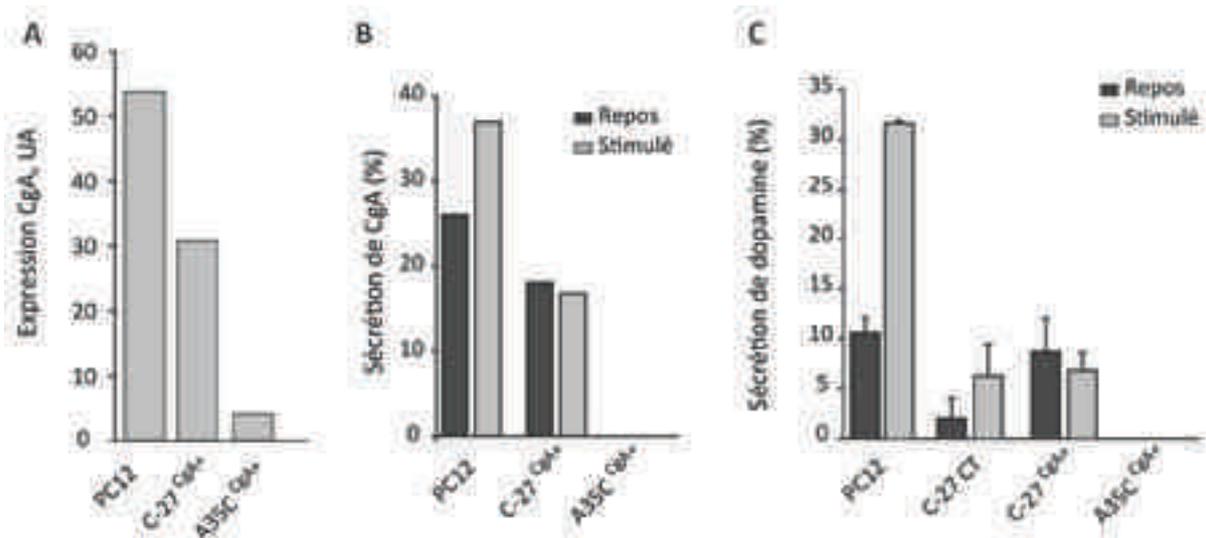


FIGURE 24. Profil sécrétoire des cellules C-27^{CgA+} et A35C^{CgA+}. (A) Quantité de CgA totale en unité arbitraires, mesurée par immunomarquage. Sécrétion au repos et après stimulation des cellules par une solution dépolarisante contenant 59mM de potassium, de (B) CgA et (C) dopamine, n=2, ± SEM.

La capacité des cellules C-27^{CgA+} à sécréter la CgA malgré une absence de granules de sécrétion nous a amené à nous questionner sur la localisation de la CgA dans ces cellules. Ainsi, afin d'étudier la localisation intracellulaire de la CgA dans les C-27^{CgA+}, nous avons mené une expérience préliminaire en réalisant des co-marquages de la CgA avec VAMP-2, protéine associée aux vésicules de la voie régulée et avec le récepteur à la transferrine (TfR), récepteur associé aux vésicules de la voie constitutive (FIGURE 25). Dans les cellules PC12 sauvages, le marquage de la CgA semble colocaliser à la fois avec le marquage VAMP-2 et le marquage TfR. En revanche, le marquage CgA dans les C-27^{CgA+} apparaît totalement colocalisé avec le marquage du TfR (non quantifié). Ces données suggèrent qu'en absence de granules de la voie régulée, la CgA serait adressée dans les voies constitutives, ce qui pourrait expliquer la sécrétion de la protéine de manière non régulée par les C-27^{CgA+}.

Ces considérations me permettent de soulever une autre interrogation concernant les clones non sécrétant C-27 : dans quelle structure est stockée la dopamine ? En effet, rappelez-vous que ces cellules sont dépourvues de granules de sécrétion mais sont capables de synthétiser la dopamine sans la sécréter, que ce soit dans des conditions de repos ou après stimulation. Plusieurs scénarios sont envisageables. En effet, la dopamine peut être i) stockée dans des vésicules de la voie constitutive, ii) stockée dans les enlargoosomes, larges vésicules cytoplasmiques caractéristiques des clones non sécrétant C-27 ou enfin iii) libre dans le cytoplasme. Cette dernière hypothèse semble la plus plausible, puisqu'un stockage dans les

voies constitutives conduirait à une grande quantité de dopamine sécrétée sans stimulation par un sécrétagogue, or nous détectons seulement une très faible sécrétion au repos dans ces cellules. De plus, la biologie des enlargosomes est encore très mal connue, mais des études ont montré que ces vésicules subissent une exocytose régulée par le calcium (Cocucci et al., 2007), il est donc peu probable que la dopamine des C-27 soit stockée dans ce type d'organelles.

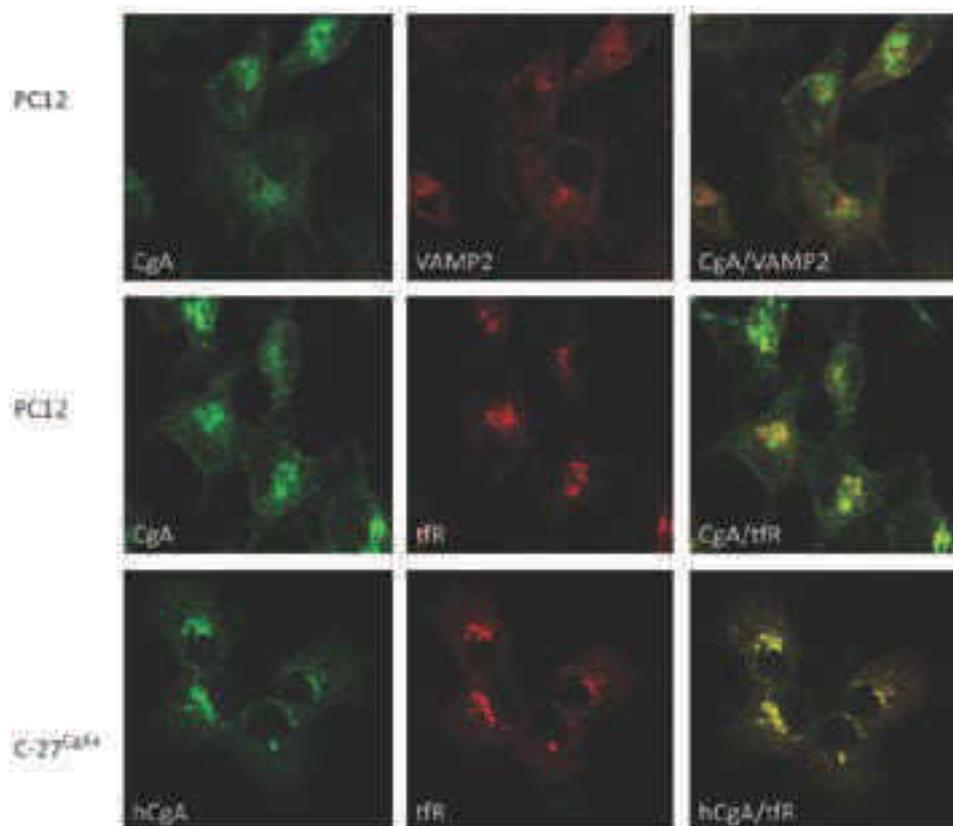


FIGURE 25. Localisation de la CgA dans les PC12 et C-27^{CgA+} en immunofluorescence. Double marquage permettant de visualiser dans la première colonne, la CgA (vert) ; dans la deuxième colonne, VAMP2 ou le récepteur à la transferrine (tFR) (rouge) ; et dans la troisième colonne la superposition du marquage CgA et VAMP2 ou tFR.

1.2.3.2. L'inhibition simultanée de la CgA, CgB et SgII inhibe la granulogénèse

La deuxième approche utilisée a été de bloquer la granulogénèse en inhibant l'expression de la CgA dans les PC12 sauvages. Parmi les trois clones générés, les cellules PC12^{CgA(2)-} sont quand même pourvues de granules de sécrétion et conservent totalement leurs propriétés sécrétrices. Pourtant, des études ont déjà montré que des cellules provenant de souris Knock-out pour la CgA dont l'expression de la protéine est complètement inhibée présentent une réduction de leurs propriétés sécrétrices (Montesinos et al., 2008). Ainsi, il est possible

que l'expression résiduelle de la CgA dans les clones PC12^{CgA(2)-} puisse être suffisante pour générer des granules et conserver leurs propriétés sécrétrices.

De façon intéressante, l'expression de la CgB dans les cellules provenant de souris Knock-out pour la CgA est augmentée, suggérant un phénomène de compensation par les autres granines (*Montesinos et al., 2008*). De même, dans les cellules provenant de souris Knock-out pour la CgB, les auteurs observent une libération des catécholamines réduite et une augmentation de l'expression de la CgA (*Díaz-Vera et al., 2010*). Au contraire, Mahapatra et collaborateurs ont montré que l'ablation du gène codant pour la CgA chez la souris conduit à une diminution de l'expression de la CgB (*Mahapatra et al., 2005*). Ainsi, le niveau d'expression des différentes granines semble être interdépendant. Récemment, l'équipe de R. Borges a généré des souris n'exprimant plus la CgA ni la CgB. Dans ces cellules, la sécrétion de catécholamines est beaucoup plus faible que dans les cellules provenant des souris knock-out CgA ou CgB seule, indiquant un rôle de l'action simultanée des granines dans les processus de granulogénèse et d'exocytose régulée. Cependant, l'analyse ultrastructurale a quand même révélé la présence de granules, mais ces derniers sont plus larges, plus clairs et présentent un défaut d'accumulation (*Díaz-Vera et al., 2012*).

Dans notre étude, l'infection avec le ShRNA⁽¹⁾ dirigé contre la CgA a conduit à la création d'un clone PC12^{CgA(1)-} n'exprimant plus aucune des trois granines CgA, CgB et SgII. Au vu des données de la littérature, il n'est pas étonnant que l'inhibition de la CgA induise une altération de l'expression des autres granines. Par contre, il me semble important de souligner que la séquence du ShRNA ciblant la CgA aurait un rôle primordial, puisque les clones PC12^{CgA(2)-} infectés avec un lentivirus contenant le ShRNA⁽²⁾ présentent une inhibition uniquement de la CgA. De façon très intéressante, les clones PC12^{CgA(1)-} sont totalement dépourvus de granules de sécrétion. Ces données suggèrent que nous sommes affranchis du phénomène de compensation par les autres granines permettant aux cellules d'assurer quand même la biogénèse des granules. Ainsi, l'inhibition simultanée des trois protéines majeures impliquées dans la biogénèse des granules (CgA, CgB et SgII), a conduit à une inhibition totale du processus de granulogénèse ainsi qu'à une inhibition de la synthèse de dopamine. Enfin, même si les données de la littérature indiquent que l'expression de la tyrosine hydroxylase est inchangée, voire augmentée dans les cellules dont l'expression des granines est inhibée, il serait judicieux de vérifier l'expression de cette enzyme dans les

clones PC12^{CgA(1)} afin de mieux comprendre l'origine de l'inhibition de la synthèse de dopamine.

■ 2. L'HYPERSECRETION PEUT INFLUENCER LA CROISSANCE DES PHEO

2.1. Origines mécanistiques de l'hypersécrétion

L'ensemble de mes données a révélé une corrélation directe entre l'activité sécrétrice des cellules *in vitro* et le développement des tumeurs dérivant de ces cellules chez les souris Nude. De façon intéressante, des données de la littérature concernant l'effet de certains composés sécrétés sur la croissance tumorale corroborent ces résultats. A titre d'exemple, Song et collaborateurs avaient montré que chez des souris Nude, la croissance tumorale dérivant de cellules épithéliales insensibles à l'effet du facteur de croissance TGF β était plus rapide que celle dérivant des cellules contrôles (Song *et al.*, 2003).

Mes résultats montrent que plus la sécrétion des cellules PC12 est élevée, plus le délai de l'initiation tumorale est réduit et la croissance tumorale qui s'ensuit est rapide. De ce fait, nous pouvons y voir un lien avec les PHEO humains, chez lesquels l'hypersécrétion observée pourrait accélérer leur développement. Cependant, lors de la croissance tumorale, le nombre de cellules sécrétrices ne cesse d'augmenter au sein de la tumeur. L'hypersécrétion observée dans les PHEO pourrait alors être la conséquence de leur développement et si tel est le cas, l'augmentation de la sécrétion ne peut évidemment pas être impliquée dans la phase de l'initiation tumorale. Nous avons donc voulu déterminer si l'hypersécrétion était la conséquence d'un effet de masse ou si la sécrétion était dérégulée à un niveau cellulaire. Pour cela, la sécrétion de catécholamines par des cellules de PHEO humaines mises en culture a été mesurée par ampérométrie à fibre de carbone, qui constitue la technique idéale pour avoir accès à la sécrétion individuelle des cellules. Les données préliminaires obtenues par un doctorant de l'équipe indiquent que le nombre d'évènements d'exocytose induits par un sécrétagogue est augmenté dans les cellules tumorales (**FIGURE 26B**). Une telle augmentation de la sécrétion peut être la conséquence d'une densité des granules de sécrétion plus importante, mais une analyse ultrastructurale en microscopie électronique a permis de montrer qu'il n'y a pas de différence du nombre de granules dans les PHEO par rapport aux cellules saines (**FIGURE 26A**) (données non publiées). Ainsi, l'activité sécrétrice

étant augmentée au niveau cellulaire dans les PHEO humains, l'effet de masse ne peut être seul responsable de l'hypersécrétion. L'hypersécrétion qui résulte de l'augmentation de la sécrétion individuelle des cellules tumorales pourrait donc accélérer l'initiation et le développement d'un PHEO. Suite à ce résultat, il est intéressant de se demander quel type de composé sécrété par les cellules tumorales pourrait influencer le développement tumoral.

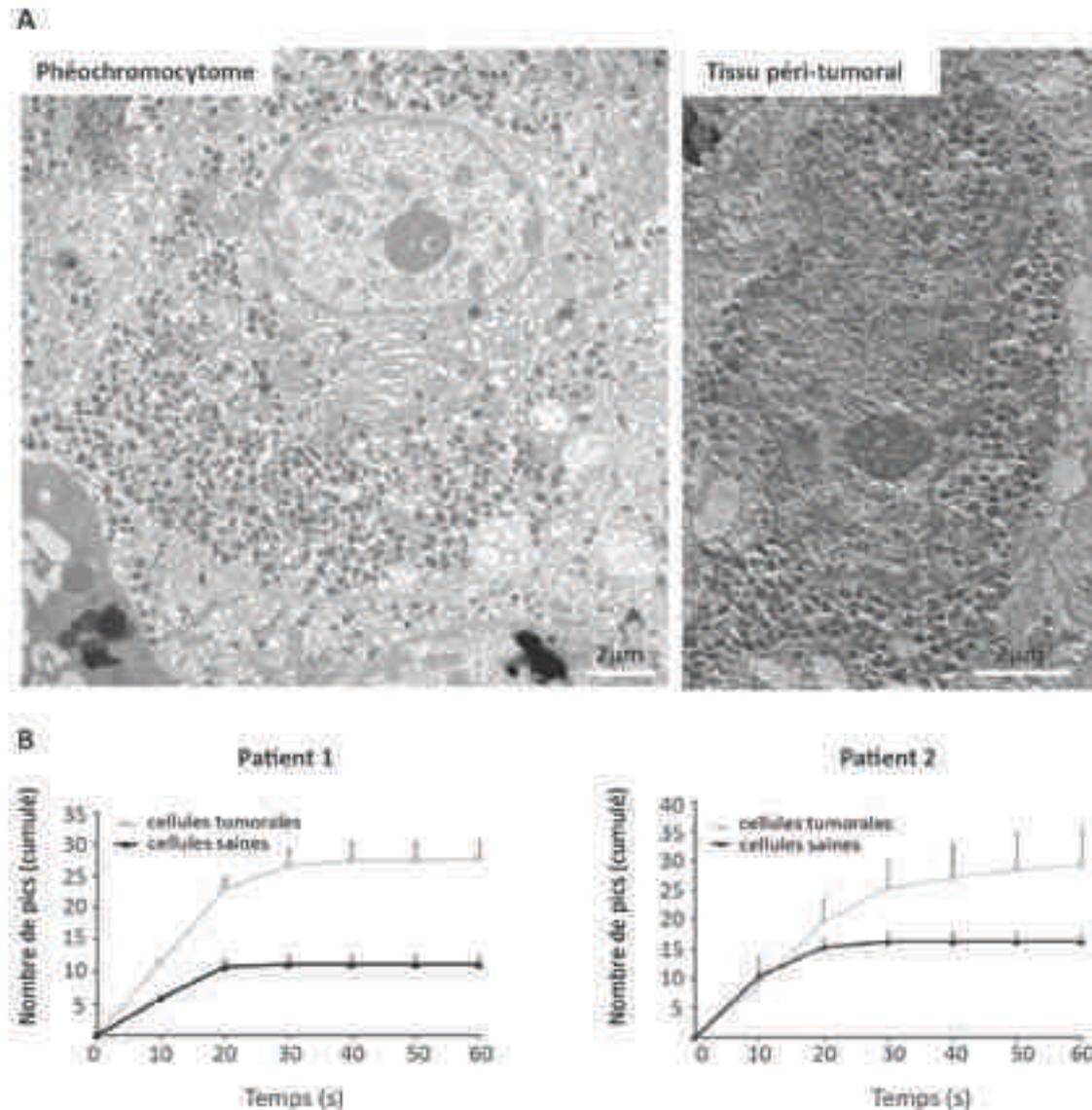


FIGURE 26. Analyse ampérométrique et ultrastructurale des PHEO humains. (A) Images de microscopie électronique à transmission de cellules chromaffines cultivées à partir de PHEO ou de tissu péri-tumoral (B) Représentation du nombre cumulé de pics ampérométriques détectés dans les cellules stimulées (100mM K⁺) issues du PHEO et du tissu péri-tumoral du patient 1 et 2.

2.2. Rôle des catécholamines dans la croissance tumorale

Quel peut être le rôle potentiel des catécholamines sécrétées dans le développement tumoral ? Tout d'abord, il me semble primordial de souligner la différence de phénotype sécrétoire des PHEO. En effet, les PHEO du cluster 1 déterminés par une mutation VHL sont caractérisés par une sécrétion de noradrénaline, tandis que les PHEO déterminés par une mutation d'une des sous-unités de la SDH sécrètent de la dopamine et/ou de la noradrénaline. Les PHEO du cluster 2, quant à eux, sécrètent principalement de l'adrénaline. De nombreuses données indiquent que les catécholamines peuvent directement influencer l'angiogénèse, processus indispensable pour la croissance tumorale (*Tilan and Kitlinska, 2010*). Leur action sur la vascularisation tumorale implique une interaction avec des facteurs angiogéniques, tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Cependant, selon le type de catécholamines, cette action peut stimuler ou au contraire inhiber l'angiogénèse. En effet, l'adrénaline et la noradrénaline ont la capacité de stimuler la vascularisation en induisant la libération de facteurs pro-angiogéniques. Par exemple, dans des modèles murins de cancers ovariens, la densité vasculaire est réduite par l'application d'un antagoniste des récepteurs β -adrénergiques, conduisant ainsi à une inhibition de la croissance tumorale (*Thaker et al., 2006; Lee et al., 2009*). De la même façon, l'activation des récepteurs β -adrénergiques induit une augmentation des métastases dans des modèles animaux de cancers de poumons et de seins (*Ben-Eliyahu et al., 1991; Melamed et al., 2005*). Ainsi, l'activation du système adrénérique induit une augmentation de la croissance tumorale dans divers types de tumeurs. En revanche, la dopamine semble avoir un effet opposé à la noradrénaline et l'adrénaline. En effet, Basu et collaborateurs montrent que la dopamine administrée en intra-péritonéal chez des souris ayant reçu une injection de cellules tumorales possède la capacité d'inhiber l'angiogénèse dépendante du VEGF (*Basu et al., 2001*). De plus, il a été montré que la dopamine produite normalement dans les tissus de l'estomac est absente dans les cancers gastriques. De façon intéressante, il s'avère que la dopamine exogène administrée en intra-péritonéal à des rats ayant développé des cancers gastriques induit une diminution du volume de la tumeur associée à une diminution de l'angiogénèse (*Chakraborty et al., 2004*). Ce rôle anti-angiogénique de la dopamine serait médié par une action inhibitrice de la voie de signalisation médiée par le VEGF *via* le récepteur D2 présent sur les cellules endothéliales (*Sarkar et al., 2013*). Par exemple, des

souris invalidées pour le récepteur dopaminergique D2, recevant une injection de cellules de mélanomes présentent une croissance tumorale plus importante due à l'augmentation de l'angiogenèse. Ainsi, l'ensemble de ces données s'accorde sur un rôle anti-angiogénique de la dopamine endogène sécrétée par les organes périphériques. Au vu de l'ensemble de ces données, nous pouvons donc envisager une action angiogénique distincte des catécholamines sur les différents sous-types de PHEO.

Dans notre étude de xénogreffes, nous avons utilisé une lignée cellulaire PC12 présentant un phénotype sécrétoire dopaminergique. Ainsi, qu'en est-il du rôle de la dopamine sécrétée directement par les cellules tumorales PC12 ? Il est tentant de supposer que la dopamine, *via* son action sur les récepteur D2 des cellules endothéliales, aurait un rôle inhibiteur de l'angiogenèse dans les tumeurs dérivant des cellules PC12. Pourtant, dans mon étude, je montre que les souris ayant reçu l'injection de cellules sécrétrices de dopamine présentent un développement tumoral plus rapide que les souris ayant reçu l'injection des clones non sécrétants, suggérant un rôle pro-angiogénique de la dopamine. De façon intéressante, une étude clinique récente a montré que les patients présentant des PGL métastatiques exprimaient un taux beaucoup plus élevé du métabolite de la dopamine, la méthoxytyramine, que les patients ne présentant pas de métastases (*Eisenhofer et al., 2012*). Or le processus métastatique est hautement lié au processus d'angiogenèse. Comment expliquer ici que la dopamine soit associée avec le caractère métastatique de la tumeur ? Même si ces données ne permettent pas de savoir si l'augmentation de la concentration de dopamine est une cause ou une conséquence de la malignité, elles permettent de soulever la question du lien entre la dopamine et le processus d'angiogenèse dans les PHEO. C'est en tentant de corrélérer les données de ma thèse avec la littérature que je me suis demandé si la dopamine sécrétée par les PC12 pourrait favoriser la croissance tumorale, *via* un potentiel rôle pro-angiogénique. Pour vérifier cette hypothèse, une méthode consisterait à injecter en sous cutané chez deux groupes de souris Nude la lignée PC12 sécrétrice de dopamine. Chez un seul des deux groupes, une molécule antagoniste spécifique du récepteur D2 dopaminergique périphérique (le dompéridone par exemple), serait administrée en intra-péritonéal après injection des cellules et pendant toute la durée de l'expérience. Lors de nos expériences de xénogreffes, la concentration de dopamine dans le plasma des souris ayant reçu l'injection des PC12 correspond bien à la sécrétion par les

cellules PC12 elles-mêmes, puisqu'aucune augmentation n'est détectée chez les souris des autres groupes. Ainsi, si nous ciblons les récepteurs D2 périphériques, l'action de la dopamine sécrétée par les PC12 sera inhibée. Le volume de la tumeur ainsi que la concentration de la dopamine plasmatique dans ces deux groupes de souris seront contrôlés et après excision des tumeurs, une analyse histologique sera menée afin d'analyser l'angiogenèse. Ainsi, cette expérience permettra de préciser le rôle de la dopamine sécrétée par les cellules PC12 dans le développement des tumeurs dérivant de ces cellules.

2.3. Rôles des granines dans la croissance tumorale

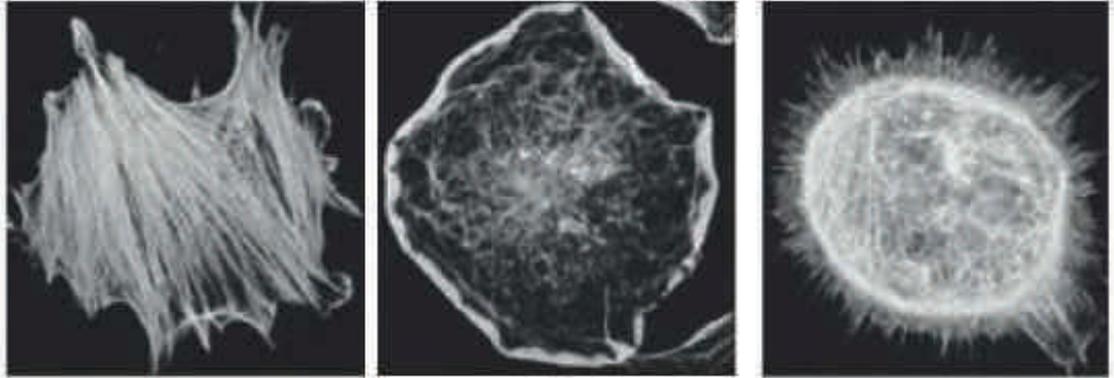
De nombreuses données indiquent que la CgA aurait un rôle dans le processus tumoral (Corti, 2010). Par exemple, des études récentes sur la prolifération de cellules endothéliales en culture et sur la densité de la vascularisation tumorale indiquent une implication de la protéine et de ses peptides bioactifs dans le processus d'angiogenèse. De façon intéressante, des rôles opposés ont été attribués aux fragments N-terminaux ou C-terminaux de la CgA. La vasostatine-1 (fragment N-ter de la CgA) peut inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des cellules endothéliales induite par le VEGF (Belloni et al., 2007; Veschini et al., 2011). Au contraire, la catestatine (fragment C-ter) peut induire la sécrétion d'un facteur pro-angiogénique, le β FGF (Theurl et al., 2010). Notons que le processus d'angiogenèse peut être induit par la thrombine, une enzyme protéolytique activée pendant la coagulation sanguine qui est un mécanisme associé au développement tumoral. Crippa et collaborateurs ont montré que l'activation de la thrombine diminue le niveau de peptides dérivés de la CgA ayant des propriétés anti-angiogéniques et augmente le niveau de peptides pro-angiogéniques (Crippa et al., 2013). L'absence de la CgA pourrait ainsi induire une diminution des peptides pro-angiogéniques et provoquer une réduction de la croissance tumorale.

Pourtant, les tumeurs dérivant des clones PC12^{CgA(2)-} n'exprimant plus la CgA se développent aussi rapidement que les tumeurs dérivant des cellules PC12 contrôles. En revanche, l'inhibition simultanée de l'expression des trois granines CgA, CgB et SgII dans le clone non sécrétant PC12^{CgA(1)-} est associée à une réduction de la vitesse de croissance tumorale, suggérant ainsi que l'action conjointe des trois granines est nécessaire pour le développement tumoral. Cependant, l'absence simultanée des trois granines CgA, CgB et SgII

conduit à une inhibition de la sécrétion dans les clones PC12^{CgA(1)-}. Par conséquent, à quel facteur peut-on attribuer la réduction de la croissance tumorale ? A l'absence des trois granines CgA, CgB et SgII ou à l'absence d'activité sécrétrice ? Ces deux éléments étant intimement liés, il est impossible avec nos seules données d'isoler le rôle des granines du rôle de la sécrétion. De ce fait, la réduction de la croissance tumorale peut résulter de l'absence des trois granines, tout comme de l'absence d'un autre composé sécrété par les PC12. En effet, il existe vraisemblablement d'autres composés sécrétés par les cellules PC12 pouvant avoir un rôle dans la croissance tumorale. A titre d'exemple, nous pouvons citer le neuropeptide Y, identifié comme un facteur pro-angiogénique multifonctionnel, capable de stimuler la prolifération, la migration, la formation des tubes capillaires des cellules endothéliales ainsi que la revascularisation des tissus ischémiques (*Zukowska-Grojec et al., 1998; Lee et al., 2003*).

Enfin, nous n'avons aucune idée des mécanismes liés à la tumorigénèse pouvant être modifiés par l'absence des granines et/ou d'activité sécrétrice. Les processus conduisant au développement tumoral sont nombreux et complexes, mais il pourrait être intéressant d'étudier la conséquence de l'absence de sécrétion sur le processus d'angiogénèse, la prolifération des cellules et l'apoptose *in vivo*. Pour cela, une caractérisation histologique des tumeurs après extraction est nécessaire. Un accès à la morphologie générale de la tumeur peut être obtenu par un marquage hématoxyline/éosine, tandis qu'un immunomarquage des vaisseaux avec un anticorps dirigé contre CD34, protéine exprimée par les cellules endothéliales, nous permettra d'analyser l'architecture des vaisseaux dans chaque groupe de souris. Enfin, l'analyse de la prolifération et de l'apoptose au sein de la tumeur peut être réalisée *via* un immunomarquage anti-BrdU et un marquage TUNEL, respectivement.

Rôles des GTPases Rho et de leurs régulateurs dans les PHEO



4^{ème} édition de Molecular Biology of the Cell

INTRODUCTION

1. Généralités sur les GTPases de la famille Rho 68
2. Les voies régulatrices des GTPases Rho 75
3. Fonctions et rôles des GTPases Rho 83

RÉSULTATS

1. Rappels des objectifs 99
2. Etude des GTPases Rho et de leurs régulateurs dans les PHEO 99

DISCUSSION

1. Approche méthodologique utilisée 111
2. Inhibition de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO 113

1. GÉNÉRALITÉS SUR LES GTPASES DE LA FAMILLE RHO

1.1. La superfamille Ras

La superfamille Ras (Rat Sarcoma) de petites protéines G contient environ 150 membres chez l'humain, ayant des orthologues chez la drosophile, la levure, l'amibe ou encore les plantes. Depuis leur découverte en 1964, les oncogènes Ras constituent les membres fondateurs de cette famille, qui a ensuite été divisée en cinq sous-familles sur la base de similarités structurales et fonctionnelles : les familles Ras, Rab, Arf, Ran et Rho. Les petites protéines G sont des protéines monomériques de faible poids moléculaire, entre 20 et 25 KDa. Sous le contrôle de protéines régulatrices, ces GTPases fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires qui alternent régulièrement entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP. La très grande diversité de protéines régulatrices et effectrices permet à ces protéines G de moduler des fonctions biologiques cellulaires extrêmement variées.

Parmi les protéines de la superfamille Ras, la famille des protéines Rho (Ras Homologous) présente des caractéristiques qui nous intéressent particulièrement. En effet, par leur capacité à réguler la sécrétion neuroendocrine ainsi que diverses fonctions cellulaires liées au cancer, les GTPases Rho constituent des acteurs moléculaires potentiellement impliqués dans la dérégulation de la sécrétion hormonale observée dans les PHEO et/ou dans le développement de ces cancers. Ainsi, ce chapitre sera entièrement dédié aux protéines Rho et à leurs voies de régulation et de signalisation. Dans un premier temps, je présenterai la famille des protéines Rho, leur structure et leur mode de fonctionnement. Une deuxième partie sera dédiée à la description de leurs protéines régulatrices puis j'exposerai dans une troisième partie leurs voies de signalisation en relation avec le processus de sécrétion et de tumorigénèse.

1.2. Les protéines de la famille Rho

Les GTPases de type Rho constituent une famille distincte au sein de la superfamille Ras. Chez les mammifères, cette famille comprend vingt membres, divisés en huit sous-familles : Rho, Rac, Cdc42, RhoD/Rif, Rnd, Wrch/Chp, RhoH et RhoBTB. Parmi ces protéines, Rnd, Wrch/Chp, RhoH et RhoBTB présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles particulières et de ce fait leur mode d'activation et de régulation diffère des GTPases Rho dites classiques, comprenant Rho, Rac, Cdc42 et RhoD/Rif. Ainsi, nous distinguons deux groupes au sein de la famille Rho, les GTPases Rho classiques et les GTPases Rho atypiques (FIGURE 27).

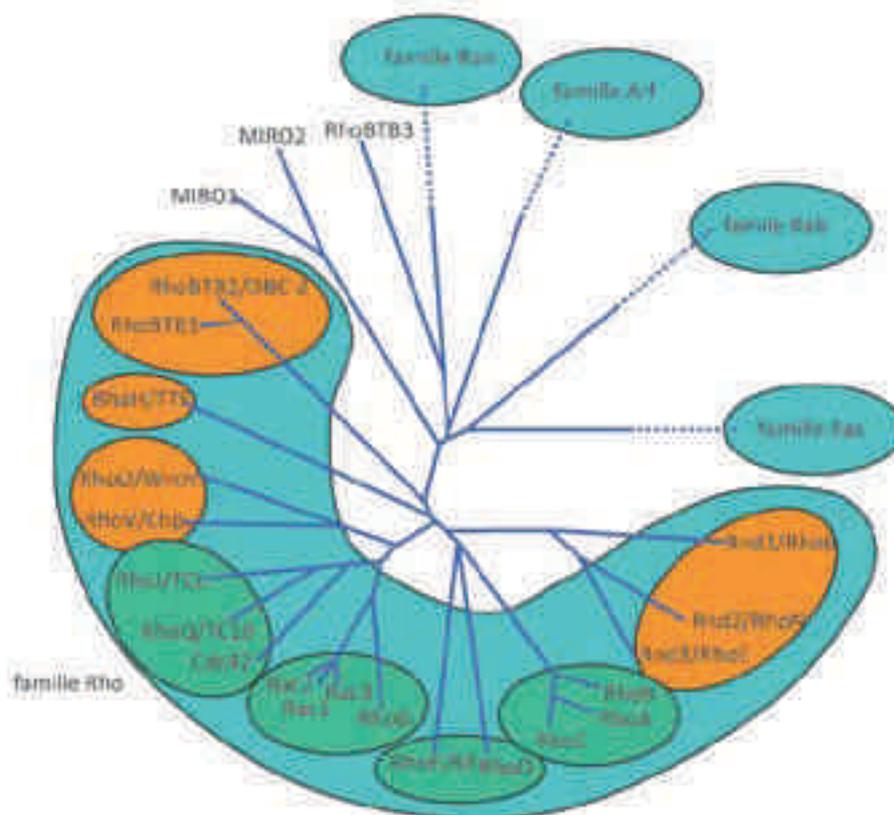


FIGURE 27. Arbre phylogénétique de la famille Rho. Les 20 membres de la famille des GTPases Rho sont regroupés en 8 sous-familles. Les Rho atypiques sont représentées en orange, les Rho classiques en vert. Les protéines Miro et RhoBTB3 forment des branches indépendantes de la famille Rho. D'après (Vega and Ridley, 2008).

1.2.1. Structure des protéines Rho

La comparaison de la séquence en acides aminés des protéines Rho montre qu'elles ont une structure primaire très conservée. Elle comprend deux régions distinctes, le domaine G dans la région N-terminale, comportant des motifs G de liaison aux nucléotides guanidiques (GTP/GDP) et un domaine dans la région C-terminale qui constitue la région hypervariable des protéines Rho (FIGURE 28).

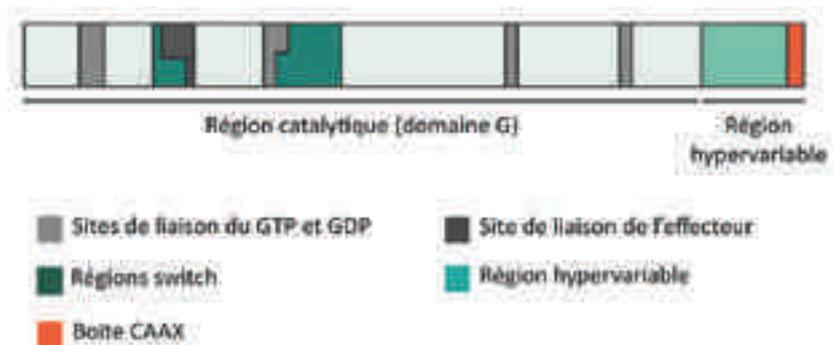


FIGURE 28. Domaines structuraux des protéines Rho. Le domaine G en région N-terminale comprend les sites de liaison aux nucléotides guanidiques, les deux régions Switch I et Switch II, ainsi que le site de liaison des effecteurs. En région C-terminale se trouve une région hypervariable et la boîte CAAX, sites de modifications post-traductionnelles des GTPases Rho. La boîte CAAX est une séquence de quatre acides aminés (C=cystéine ; A=résidu aliphatique ; X=indifférent).

La structure tridimensionnelle du domaine G comprend cinq hélices α (A1-A5), six feuillets β (B1-B6) et cinq boucles polypeptidiques (G1-G5). Les motifs G vont fixer le GTP, accompagné d'un ion Mg^{2+} qui interagit avec les phosphates du nucléotide, permettant ainsi de le stabiliser. Les deux régions Switch I et Switch II situées en bordure du site nucléotidique présentent la particularité de changer de conformation entre les formes associées au GDP et au GTP. Ces deux régions sont flexibles sous la forme GDP et acquièrent une conformation plus stable dans la forme liée au GTP. C'est dans cette conformation que les GTPases peuvent interagir avec leurs effecteurs et ainsi activer spécifiquement une ou plusieurs voies de signalisation. Une fois le GTP hydrolysé en GDP+Pi, les deux régions switch se relâchent et adoptent la conformation spécifique de la forme liée au GDP (FIGURE 29).

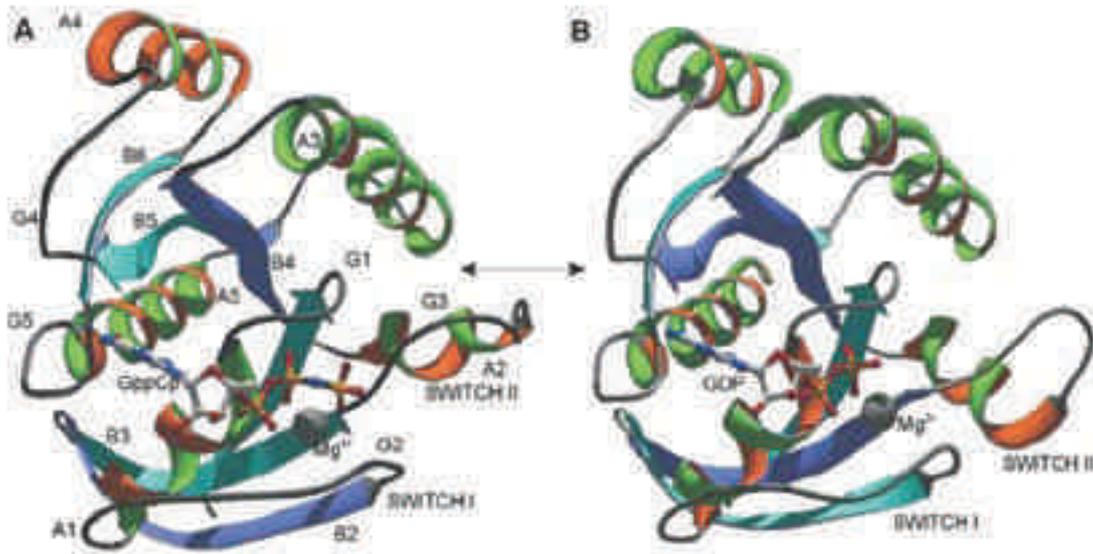


FIGURE 29. Structure tridimensionnelle du domaine G des GTPases de la superfamille Ras. (A) Complexe lié au GTP; Les 5 hélices α (A1-A5), les 6 feuillets β (B1-B6) et les 5 boucles polypeptidiques (G1-G5) sont représentés sur le schéma. (B) Complexe lié au GDP. Les régions Switch I et Switch II sont flexibles dans la forme liée au GDP et deviennent plus ordonnées quand elles sont liées au GTP. D'après (Paduch *et al.*, 2001).

1.2.2. Régulation des protéines Rho

L'activation des GTPases Rho n'est pas spontanée et la transition depuis l'état inactif vers l'état actif est favorisée par des facteurs d'échanges nucléotidiques GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). L'inactivation des Rho est rendue possible grâce à leur activité GTPasique intrinsèque. Cependant, cette activité étant généralement faible, elle est accélérée par la liaison avec des protéines GAP (GTPases Activating Protein) qui permettent un retour rapide à l'état inactif lié au GDP, en favorisant l'hydrolyse du GTP en GDP.

En plus de cette régulation au niveau de l'échange des nucléotides guanidiques, les protéines Rho subissent également des étapes de modifications post-traductionnelles à l'extrémité C-terminale, notamment au niveau de la boîte CAAX. Des enzymes catalysent l'addition d'un groupement isoprényle sur la cystéine de la boîte CAAX. Les acides aminés en aval de la cystéine sont ensuite clivés et son groupement carboxyle est méthylé. Selon la nature des acides aminés de l'extrémité C-terminale, une réaction de palmitoylation peut également avoir lieu en amont du site de prénylation. Cette région en C-terminale détermine le compartiment de localisation des GTPases Rho et est également primordiale pour leur activité biologique. En effet, le groupement isoprényle permet une interaction avec les protéines GDI (Guanine Dissociation Inhibitor), qui maintiennent les GTPases Rho inactives

en les séquestrant dans le cytoplasme et abolissent ainsi la capacité des protéines à lier leurs effecteurs (FIGURE 30).

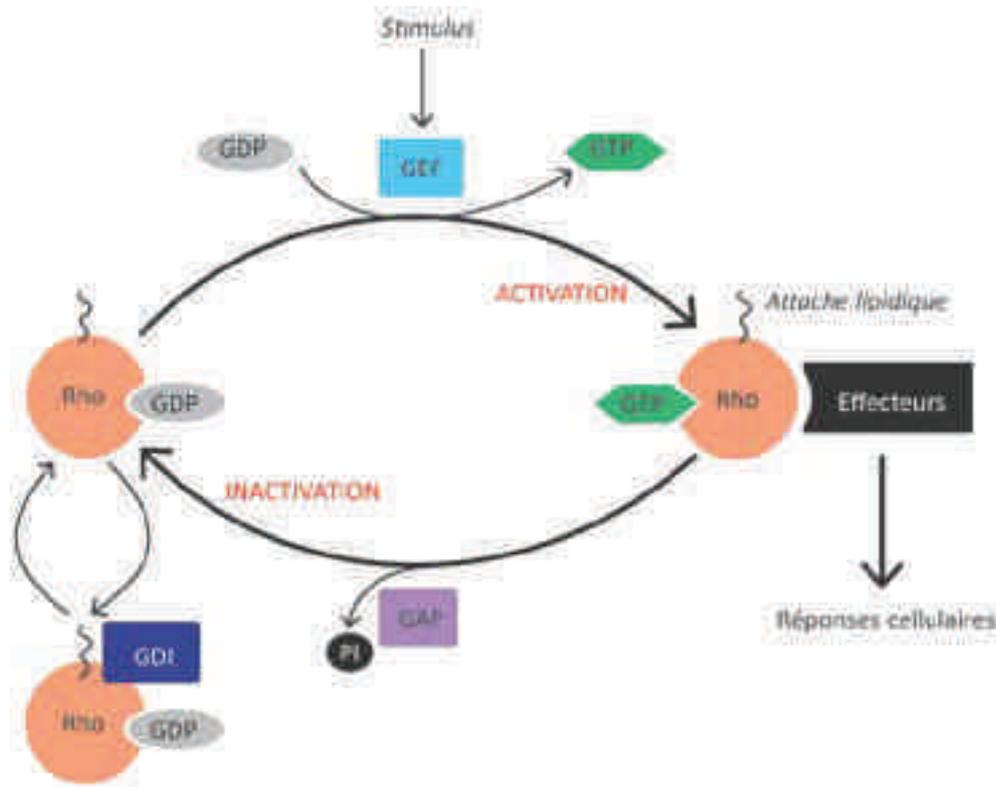


FIGURE 30. Cycle de régulation des GTPases Rho classiques. Les protéines Rho classiques cyclent entre un état actif, lié au GTP et un état inactif, lié au GDP. Dans leur état actif, elles interagissent avec leurs effecteurs et activent de nombreuses voies de signalisation. Le cycle d'activation/inactivation est hautement régulé par trois types de protéines. Les GTPases Rho sont séquestrées dans le cytoplasme par les protéines GDI (Guanine Dissociation Inhibitor), qui les maintiennent dans leur état inactif. Les protéines GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factor) catalysent l'échange du GDP par le GTP et induisent l'activation des protéines Rho. Les protéines GAP (GTPases Activating Protein) stimulent l'hydrolyse du GTP conduisant à l'inactivation des protéines Rho.

Les mécanismes de régulation des GTPases Rho atypiques diffèrent de ceux régulant les GTPases Rho classiques. En effet, aucune des protéines régulatrices GEF ou GAP n'a encore été identifiée pour les Rho atypiques et des études biochimiques indiquent qu'elles seraient principalement dans un état actif lié au GTP et associées avec les membranes. Ainsi, elles seraient régulées par le niveau de transcription et/ou leur ciblage vers les voies de dégradation. De plus, leurs fonctions pourraient aussi être régulées par des interactions protéiques impliquant des domaines additionnels non retrouvés dans les GTPases Rho classiques (*Aspenström et al., 2007*). Je détaillerai ici uniquement quelques caractéristiques

de la GTPase atypique RhoU, celle-ci ayant constitué un projet annexe de mon doctorat (voir article *Gubar, Croisé et al.*, joint en annexe).

1.2.3. RhoU, GTPase Rho atypique

RhoU, nommée également Wrch-1 (Wnt-1 Responsive Cdc42 Homolog) a été découverte suite à l'observation de l'augmentation du niveau de son ARNm en réponse à la voie de signalisation Wnt-1 (*Tao et al.*, 2001). A l'origine, cette GTPase partageant des homologies de séquence et des voies de signalisation communes avec Cdc42 était considérée comme un membre de la sous-famille Cdc42. Cependant, il est admis à l'heure actuelle qu'elle fait partie des GTPases Rho atypiques. En effet, RhoU se distingue de Cdc42 par la présence d'une extension riche en proline dans sa région N-terminale (*Tao et al.*, 2001). Celle-ci confère à RhoU la capacité d'interagir avec des protéines d'échafaudage à domaines SH3, telles que Nck β et Grb2, ce qui est suffisant pour induire l'interaction de RhoU avec un de ses effecteurs, PAK1 (*Saras et al.*, 2004; *Shutes et al.*, 2004). De plus, bien que RhoU comporte une boîte CAAX, elle est palmitoylée et non prénylée. Ce groupement palmitoyl est nécessaire pour son adressage au niveau des membranes plasmiques et endosomales (*Berzat et al.*, 2005; *Chenette et al.*, 2005). La distribution subcellulaire de RhoU est également régulée par la phosphorylation dépendante de la tyrosine kinase Src sur un résidu tyrosine adjacent au site de palmitoylation (*Alan et al.*, 2010). Cette phosphorylation induit une redistribution de RhoU, de la membrane plasmique aux endosomes et conduit à l'inactivation de la protéine. Enfin, RhoU possède une capacité d'échange intrinsèque *in vitro*, soulevant la question de la nécessité d'une protéine GEF pour son activation (*Saras et al.*, 2004). En revanche, de nombreuses études ont démontré que RhoU était régulée au niveau transcriptionnel. Par exemple, son niveau d'expression est augmenté en réponse à la voie de signalisation de Wnt-1 dans des cellules épithéliales (*Tao et al.*, 2001), par RANKL pendant la différenciation des ostéoclastes (*Brazier et al.*, 2009), ou encore par Notch dans les cellules T (*Bhavsar et al.*, 2013), tandis qu'il est diminué en réponse au β -estradiol dans les cellules MCF-7 (*Kirikoshi and Katoh*, 2002) ou à la vitamine D dans des cellules mésenchymales multipotentes (*Artaza et al.*, 2010).

De façon intéressante, par la présence de sa séquence riche en proline, RhoU est impliquée dans la voie de signalisation du récepteur de croissance épidermique (EGFR) *via* le domaine

SH3 de la protéine Grb2. L'activation d'EGFR par son ligand conduit à une dimérisation et une autophosphorylation et l'internalisation du récepteur qui s'ensuit permet l'activation des voies de signalisation médiées par l'EGFR, notamment la prolifération cellulaire et/ou la migration (*Herbst, 2004*). Suite à l'activation d'EGFR, RhoU est recrutée avec le complexe EGFR-Grb2 et induit une potentialisation des voies de signalisation d'EGFR (*Zhang et al., 2011*). De plus, RhoU a la capacité d'interagir avec de nombreuses autres protéines à domaines SH3 *in vitro*, telles que CRK-L, CRK-II, ou encore LCK (*Zhang et al., 2011*), suggérant ainsi que RhoU pourrait être recruté dans de nombreux complexes. En particulier, nous avons montré très récemment qu'elle interagit avec l'intersectine1 (ITSN1), protéine d'échafaudage à domaine SH3 impliquée dans l'internalisation de récepteurs, tels que le récepteur à la transferrine et l'EGFR (voir article *Gubar, Croisé et al.,* joint en annexe).

2. LES VOIES RÉGULATRICES DES GTPASES RHO

2.1. Les facteurs d'échange nucléotidiques (GEF)

2.1.1. Généralités

En interagissant avec la protéine G inactive liée au GDP, les protéines GEF catalysent l'échange du GDP par le GTP. La première GEF spécifique des Rho a été initialement caractérisée chez la levure, puis identifiée chez les mammifères comme analogue au proto-oncogène Dbl (Diffuse B-cell Lymphoma) (Hart *et al.*, 1991). La majorité des facteurs d'échange font partie de la famille Dbl, caractérisée par la présence d'un domaine DH (Dbl-Homology) assurant la fonction d'échange nucléotidique, associé à un domaine PH (Pleckstrin-Homology) favorisant l'ancrage des protéines à la membrane. Avec soixante-dix membres, cette famille est la plus représentée chez l'humain (FIGURE 32). Notons qu'en plus de cette vaste famille Dbl, une dizaine de facteurs d'échange (non présentés ici, pour revue voir (Laurin and Côté, 2014)), ont été identifiés récemment et regroupés au sein de la famille atypique Dock, dont la caractéristique est d'assurer l'activité d'échange par le domaine DRH2 (Dock Homology Region).

Le domaine DH présente trois régions conservées (CR1-CR3) formant le cœur du domaine. CR1 et CR3, avec des résidus conservés au niveau C-terminal du domaine (hélice α_6) forment le domaine de liaison avec la GTPase (FIGURE 31). Des substitutions d'acides aminés au niveau de ces régions affectent considérablement l'activité d'échange (Rossman *et al.*, 2005).

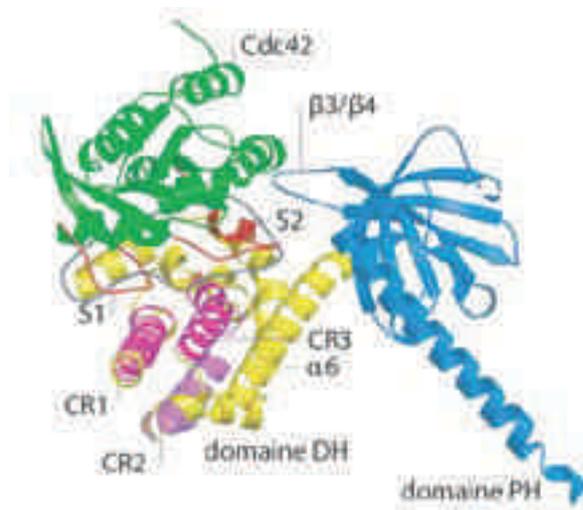


FIGURE 31. Structure tri-dimensionnelle des domaines DH-PH. En jaune est représenté le domaine DH et en bleu le domaine PH de la protéine Dbs liée à Cdc42 (vert). Les régions CR1-CR3 (violet), avec l'hélice α_6 du domaine DH constituent les sites de contact avec les régions Switch de Cdc42, et sont essentiels pour la réaction d'échange de Dbs. D'après (Rossman *et al.*, 2005).

Le domaine DH induit le remodelage des régions Switch de la GTPase conduisant à la désorganisation du site de liaison nucléotidique et du Mg^{2+} . Ces altérations conduisent à la dissociation du GDP et du Mg^{2+} , laissant le site de liaison aux nucléotides libres et permettant ainsi la liaison du GTP- Mg^{2+} . Cette liaison au GTP induit un autre changement de conformation des régions Switch favorisant la dissociation du complexe GEF/GTPase Rho.

Dans la famille Dbl, le domaine DH est systématiquement associé à un domaine PH, et ces domaines semblent coopérer pour faciliter l'activation des GTPases. En effet, plusieurs études ont montré que les fragments DH-PH présentent une activité d'échange nucléotidique plus importante que le domaine DH seul (*Liu et al., 1998; Rossman and Campbell, 2000*). Par exemple, des études sur l'interaction entre le facteur d'échange Dbs et Cdc42 ont montré que le domaine PH de Dbs était nécessaire pour l'activation de la GTPase et la réponse cellulaire qui en découle (*Russo et al., 2001*). Du fait de l'affinité du domaine PH avec les phospholipides, ce domaine confère également un rôle dans la localisation du facteur d'échange en permettant leur ancrage à la membrane plasmique (*Russo et al., 2001; Fleming et al., 2004*).

La famille Dbl présente une sélectivité différente vis à vis des GTPases Rho. Certaines GEF ont une activité d'échange pour une large gamme de protéines de la famille Rho, alors que d'autres semblent être plus spécifiques (**FIGURE 32**). Par exemple, Lbc, Lfc et Lsc ont pour cible spécifique RhoA, Fgd1 est spécifique de Cdc42 tandis que Dbl est une GEF aussi bien de RhoA que de Rac1 ou de Cdc42. Des résidus non conservés dans la région $\beta 2$ et $\beta 3$ de la GTPase semblent établir une interface avec des résidus du domaine DH, ce qui serait critique pour l'interaction spécifique GEF/GTPase Rho. En effet, des études biochimiques montrent que la GTPase Rac1 mutée au niveau des feuillets $\beta 2$ et $\beta 3$ ne peut plus être activée par son facteur d'échange Tiam1 mais est activée par la forme longue de l'intersectine (ITSN-L), qui est normalement une GEF spécifique de Cdc42 (*Karnoub et al., 2001*). De façon similaire, des substitutions dans le domaine DH de l'ITSN-L conduisent à l'activation de RhoA, tandis qu'une mutation dans le domaine DH de Dbs lui confère la capacité à activer Rac1 qui n'est habituellement pas activée par Dbs (*Cheng et al., 2002; Snyder et al., 2002*).

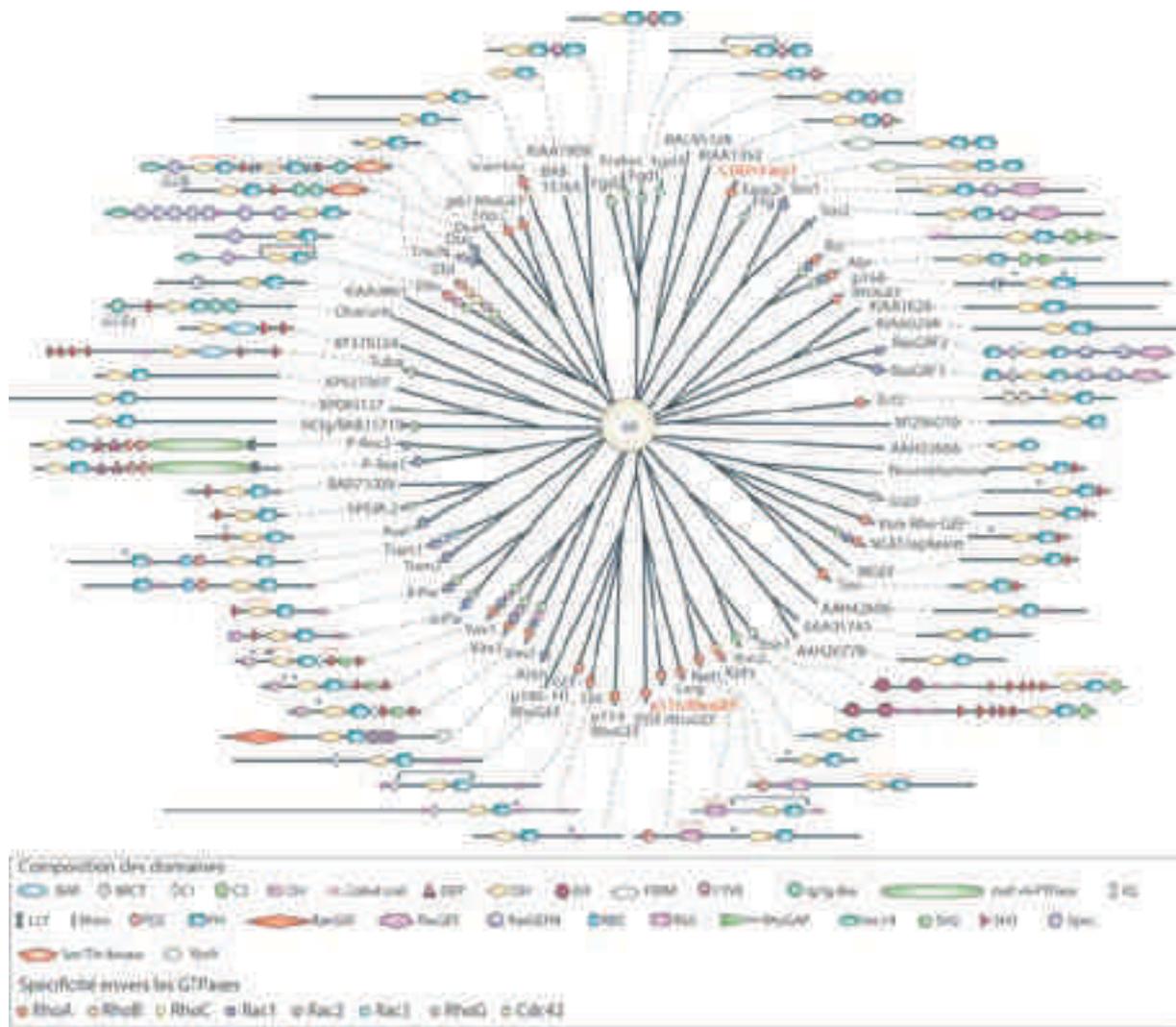


FIGURE 32. Arbre phylogénétique de la famille Dbl. En plus des domaines DH-PH, les protéines de la famille Dbl contiennent de nombreux domaines additionnels, leurs conférant ainsi de multiples rôles. Les spécificités envers les GTPases Rho sont également indiquées sur le schéma. *Note : en rouge sont indiquées les deux protéines GEF étudiées pendant mes travaux de thèse (CDEP/FARP1 et ARHGEF1/p115-RhoGEF).* D'après (Rossman et al., 2005).

L'activité des GEF est elle-même étroitement régulée et chaque membre des protéines Dbl semble avoir un mécanisme propre d'activation et de désactivation, même si des mécanismes de régulation communs commencent à émerger. La régulation de la localisation subcellulaire des protéines Dbl constitue un mécanisme permettant de réguler l'activation spatio-temporelle des GTPases en réponse à un stimulus. Par exemple, la protéine NET1 est normalement séquestrée dans le noyau et sa translocation au niveau de la membrane plasmique est associée avec l'activation de RhoA (Schmidt and Hall, 2002). L'autoinhibition par le domaine N-terminal apparaît également comme un mode de régulation des protéines GEF. Par exemple, la région N-terminale de Vav1, contenant la tyrosine174 interagit avec le

domaine DH prévenant ainsi l'accès des GTPases. La phosphorylation de la tyrosine174 par divers récepteurs tyrosine kinases induit alors une ouverture du domaine DH aux GTPases. Ainsi, la coupure du domaine N-terminal abroge cette inhibition et conduit à une activité constitutive de Vav1 (*Crespo et al., 1997; Han et al., 1997; Aghazadeh et al., 2000*). De façon intéressante, nous pouvons noter que la forme oncogénique de Vav1 est une forme tronquée de Vav1 endogène, suggérant que ses propriétés tumorales sont liées à l'activation constitutive de la protéine (*Katzav, 2007*).

2.1.2. Les protéines ARHGEF1 et FARP1

Parmi les soixante-dix membres de la famille Dbl, je me focaliserai uniquement sur les protéines d'intérêt de mes travaux de thèse, ARHGEF1 et FARP1, en présentant brièvement leurs principales caractéristiques. Identifié depuis une vingtaine d'années, ARHGEF1 a été découvert à l'origine pour ses propriétés transformantes (*Whitehead et al., 1996*). La protéine (nommée également Lsc ; p115RhoGEF ou LBCL2) fait partie d'une sous-famille des protéines Dbl, la famille des RH-RhoGEF (Regulator of G-protein signaling Homology) comprenant trois autres membres, PDZ-RhoGEF, Leukemia-associated RhoGEF (LARG) et Lbc-RhoGEF (*Siehl, 2009*). Le tandem classique DH/PH d'ARHGEF1 est responsable de l'activité d'échange des GTPases Rho tandis que le domaine RH (ou RGS, pour Regulator of G protein signalling-like domain) est responsable de l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques associées aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Dans sa forme inactive, ARHGEF1 est présent sous forme d'oligomères dans le cytoplasme. Lorsque les sous-unités $G\alpha_{12/13}$ du RCPG sont activées, elles induisent la translocation d'ARHGEF1 sous forme de monomères actifs, depuis le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique. Cette translocation stimule alors l'activité d'échange nucléotidique d'ARHGEF1 conduisant à l'activation des protéines RhoA, RhoB et RhoC (**FIGURE 33**) (*Glaven et al., 1996b; Hart et al., 1996; Dubash et al., 2007; Guilluy et al., 2010; Jaiswal et al., 2011, 2013; Chow et al., 2013; Kher et al., 2014*). L'expression d'ARHGEF1 est ubiquitaire mais étant exprimée en abondance dans le système hématopoïétique (*Aasheim et al., 1997*), la majorité des études relatent une implication de la protéine dans l'homéostasie des leucocytes, telle que la migration, l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC) et la survie cellulaire (*Girkontaite et al., 2001; Harenberg et al., 2005; Rubtsov et al., 2005; Francis et al., 2006; Hu et al., 2008*).

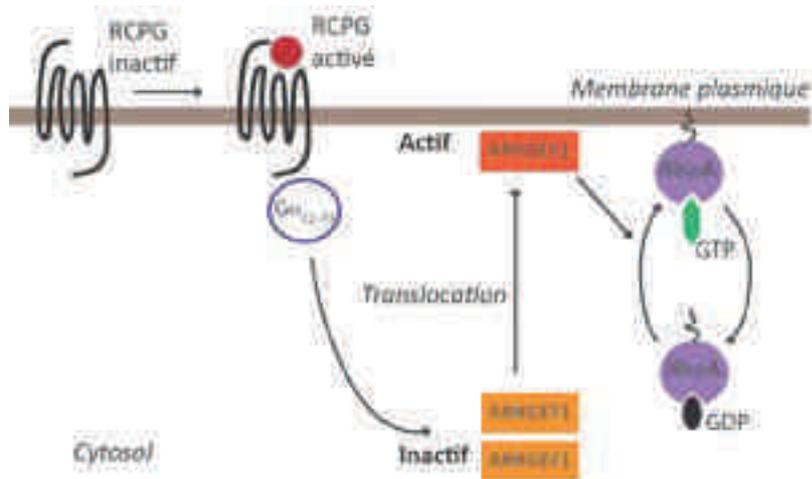


FIGURE 33. Voie de signalisation d'ARHGEF1. Dans sa forme inactive, ARHGEF1 s'oligomérisé dans le cytosol. Les protéines G α_{12-13} activées couplées au RCPG induisent la translocation d'ARHGEF1 sous forme de monomères actifs, depuis le cytosol jusqu'à la membrane plasmique. ARHGEF1 activé induit l'activation des GTPases RhoA, RhoB et RhoC.

Le gène codant pour FARP1 a été isolé plus récemment, suite à la découverte d'une augmentation de son expression dans les chondrocytes différenciés (Koyano *et al.*, 2001). En plus de posséder le tandem classique DH-PH des protéines de la famille Dbl, FARP1 (nommée également CDEP ou PLEKHC2) contient un domaine FERM (4.1protein/ezrin/radixin/moesin), module impliqué dans la localisation des protéines à la membrane plasmique *via* une association avec le cytosquelette. Selon les études, FARP1 a été identifié comme une protéine GEF spécifique de RhoA, Rac1 et Cdc42, suggérant une activité d'échange pour plusieurs protéines de la famille Rho (Koyano *et al.*, 2001; Cheadle and Biederer, 2012; Jaiswal *et al.*, 2013). Abondante dans les neurones, les études fonctionnelles de FARP1 se sont focalisées sur son rôle dans le développement neuronal et la morphologie. Il a été montré que FARP1 régule la croissance et l'organisation de l'arbre dendritique dendritique ainsi que la formation des synapses, suggérant ainsi un rôle de la protéine dans le remodelage du cytosquelette d'actine (Zhuang *et al.*, 2009; Cheadle and Biederer, 2012, 2014).



FIGURE 34. Représentation schématique des domaines de FARP1 et ARHGEF1. FARP1 contient un domaine FERM (4.1, ezrin, radixin, moesin) ainsi qu'un domaine DH et deux domaines PH. ARHGEF1 contient un domaine RGS (Regulator of G protein signalling-like domain), un domaine DH et un domaine PH.

2.2. Les protéines activant l'hydrolyse du GTP (GAP)

Une caractéristique majeure des petites protéines G est leur faible activité GTPase intrinsèque. L'inactivation rapide des GTPases Rho lorsque les conditions cellulaires l'imposent nécessite alors l'action de protéines GAP, catalysant l'hydrolyse du GTP en GDP. La première GAP des Rho, p21RhoGAP a été découverte il y a 25 ans (*Garrett et al., 1989*) et depuis, plus de soixante-dix membres ont été caractérisés chez les eucaryotes (**FIGURE 35**).

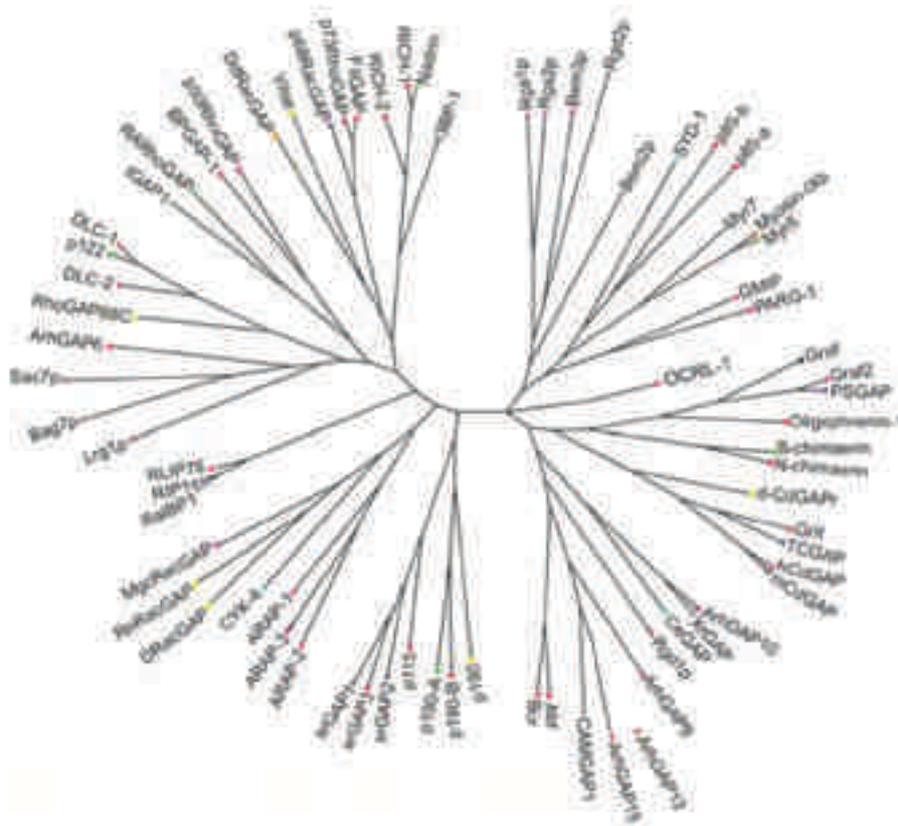


FIGURE 35. Arbre phylogénétique des GAP des Rho, de la levure à l'humain. Arbre basé sur les homologies de séquences du domaine conservé GAP. Rouge : *Homo sapiens* ; Bleu : *Mus musculus* ; Vert : *Rattus norvegicus* ; Rose : *S. cerevisiae* ; Jaune : *D. melanogaster* ; turquoise : *C. elegans* ; Orange : *D. discoideum* ; Violet : *Gallus gallus* ; Gris : *Xenopus laevis*. Tiré de (*Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007*).

Les protéines GAP contiennent de nombreux motifs structuraux mais leur seul domaine commun est le domaine catalytique GAP, responsable de l'activité d'hydrolyse du GTP en GDP. Des analyses structurales des domaines GAP ont révélé l'importance d'un résidu arginine conservé chez la plupart des protéines GAP, qui permet de stabiliser les charges négatives durant l'état de transition de l'hydrolyse du GTP (**FIGURE 36**). L'utilité du résidu arginine dans la réaction d'hydrolyse du GTP est soulignée par des études montrant que la protéine OCRL-1 possède un résidu glutamine à la place du résidu arginine dans son

domaine GAP. Cette substitution conduit à un domaine GAP non fonctionnel qui a des conséquences au niveau de l'activité de la protéine puisqu'elle fonctionnerait plutôt comme un effecteur des GTPases Rho (Erdmann *et al.*, 2007; Pirruccello *et al.*, 2011).

Comme les protéines GEF, certaines protéines GAP présentent un large spectre d'interaction avec les GTPases Rho alors que certaines sont spécifiques d'une seule GTPase Rho. L'activité des GAP est elle-même régulée par de nombreux mécanismes tels que la phosphorylation, les interactions protéines-protéines ou encore la dégradation protéolytique (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007). Par exemple, la phosphorylation de p190RhoGAP par la protéine Src est nécessaire pour son association avec p120RasGAP et l'activation de son activité GAP *in vivo* (Hu and Settleman, 1997; Roof *et al.*, 1998).

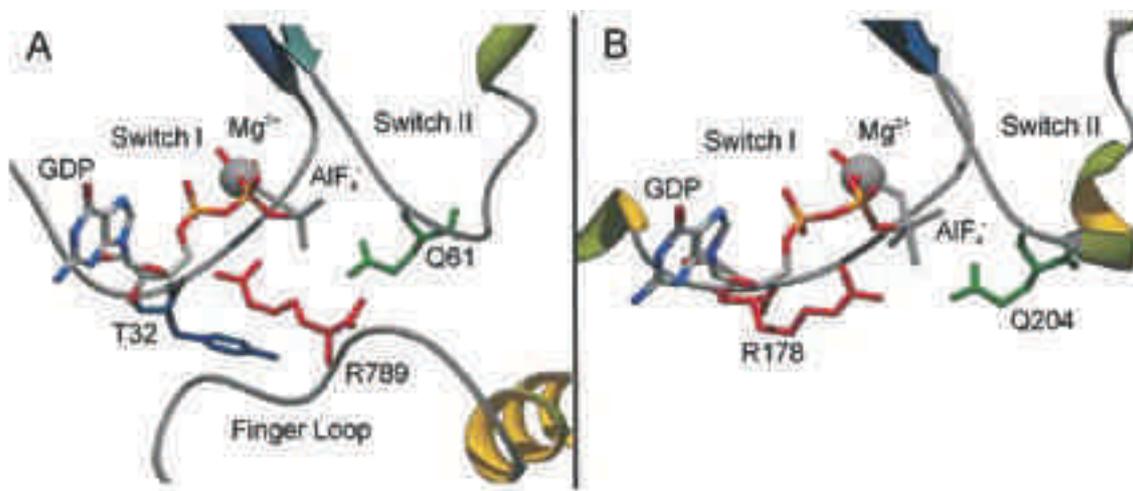


FIGURE 36. Représentation du doigt arginine du domaine GAP des GAP des Rho. Le domaine GAP interagit avec le site de liaison des nucléotides ainsi que les régions switch I et switch II de la GTPase. Les protéines GAP participent à l'hydrolyse du GTP par l'insertion d'un résidu arginine R789 (rouge). Tiré de (Paduch *et al.*, 2001).

2.3. Les protéines inhibitrices de la dissociation des guanines (GDI)

En comparaison avec l'extrême diversité de GEF et de GAP recensées pour les GTPases de type Rho, la famille des GDI spécifiques des Rho ne compte que trois membres. Cependant, ces protéines jouent un rôle primordial dans la régulation des GTPases Rho en les maintenant sous une forme inactive dans le cytoplasme, conduisant à l'inhibition de l'interaction avec leurs protéines régulatrices ou effectrices.

La forme la plus abondante des GDI, RhoGDI1, est ubiquitaire et peut former des complexes cytosoliques avec plusieurs GTPases Rho, comprenant RhoA, RhoC, Rac1, Rac2 et Cdc42

(Garcia-Mata *et al.*, 2011). RhoGDI2, exprimée surtout dans les cellules hématopoïétiques, s'associe aussi avec plusieurs GTPases *in vitro* mais avec une plus faible affinité que RhoGDI1 (Platko *et al.*, 1995). Cependant, beaucoup de ces interactions n'ont pas été détectées *in vivo* (Gorvel *et al.*, 1998). Enfin, RhoGDI3 est moins abondante et se distingue des deux autres GDI par sa localisation uniquement au niveau de l'appareil de Golgi et semble interagir de façon prédominante avec RhoB et RhoG (Zalcman *et al.*, 1996; Brunet *et al.*, 2002).

Dans leur partie en N-terminale, les RhoGDI sont constituées d'une région qui interagit avec les régions switch I et II de la GTPase, et d'une région en C-terminal qui lie les groupements lipidiques de la GTPase. Ces protéines présentent la particularité de pouvoir réguler les GTPases Rho de trois manières différentes (FIGURE 37). Elles peuvent interagir avec les GTPases Rho liées au GDP localisées dans le cytoplasme en masquant leur groupement lipidique, ce qui empêche leur translocation à la membrane plasmique et leur activation par les protéines GEF. Elles peuvent également interagir avec la GTPase sous sa forme active liée au GTP, et ainsi inhiber l'hydrolyse du GTP et l'interaction avec ses protéines effectrices. Enfin, les GDI ont la possibilité d'extraire les GTPases inactives liées aux membranes.

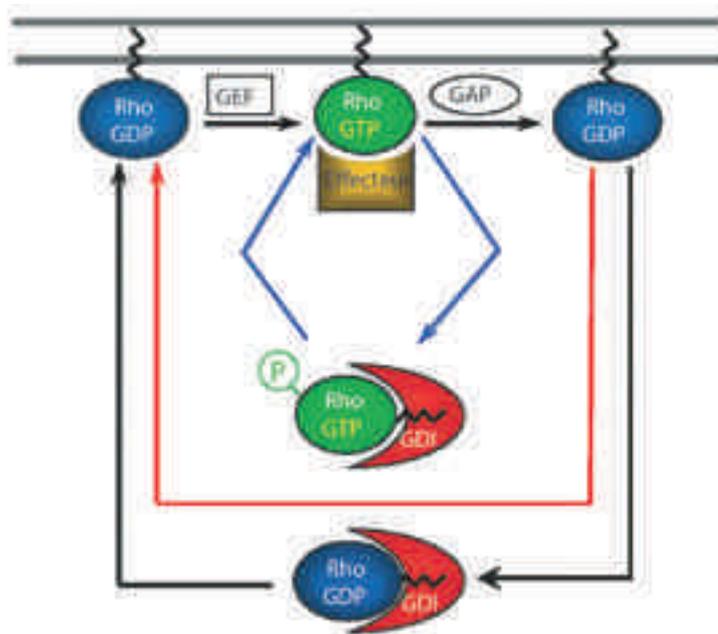


FIGURE 37. Mode d'action des GDI. Les GDI agissent de trois manières différentes : i) séquestration de la GTPase inactive dans le cytosol, ii) interaction avec la GTPase active, iii) extraction des GTPases inactives de la membrane plasmique. D'après (Dransart *et al.*, 2005).

3. FONCTIONS ET ROLES DES GTPASES RHO

3.1. Les GTPases Rho, protéines multifonctionnelles

Le gène *Rho* a été identifié en 1985 (*Madaule and Axel, 1985*), mais ce sont les observations reportées quelques années plus tard qui ont permis d'établir les premiers fondements des fonctions cellulaires régulées par les GTPases Rho. En effet, deux articles publiés en 1992 ont révélé pour la première fois que les protéines Rho et Rac avaient la capacité de réguler l'organisation des filaments d'actine en réponse à des stimuli externes (*Ridley and Hall, 1992; Ridley et al., 1992*). A la même époque, Rac a été identifiée comme un régulateur de la NADPH oxydase (*Abo et al., 1991*). Depuis, et notamment grâce à l'identification des protéines cibles des GTPases Rho, ces protéines peuvent être définies comme multifonctionnelles, *via* leur implication dans une multitude de voies de signalisation (**FIGURE 38**).

Cependant, l'identification des protéines cibles des GTPases Rho n'a pas toujours été une tâche aisée puisque la grande majorité ne contient pas de domaine conservé identifiable. Malgré cela, par des combinaisons d'approches comme la chromatographie d'affinité ou des criblages doubles-hybrides chez la levure, plus de 100 cibles des GTPases Rho ont été reportées. Les effecteurs identifiés comprennent une trentaine de kinases (sérine/thréonine kinases, tyrosine kinases, lipides kinases) et un grand nombre de protéines d'échafaudage (*Bishop and Hall, 2000; Bustelo et al., 2007*). L'ensemble des données auxquelles nous avons accès aujourd'hui a permis de révéler que Rho, Rac et Cdc42 ont la capacité d'interagir avec une vingtaine, voire une trentaine de protéines différentes, soulevant la possibilité que chaque GTPase à elle seule peut réguler de nombreuses voies de signalisation (**TABLEAU 8** et **FIGURE 38**). Le résultat final de la modulation de l'activité de ces effecteurs est la génération de réponses cellulaires extrêmement diverses, telle que la régulation du cytosquelette d'actine, du trafic vésiculaire, de l'activité transcriptionnelle, de la prolifération cellulaire, de la mobilité, de la morphologie, mais aussi de l'interaction hôte-pathogène ou encore du développement embryonnaire.

| Effecteur | Type | Fonction | Sélectivité | Motif de liaison |
|---------------------|-----------------|---------------------|---------------|------------------|
| ROCKa, ROCKb | Ser/thr kinase | Actine/myosine | Rho | REM/Hr1 |
| PKN, PRK1, PRK2 | Ser/thr kinase | inconnue | Rho | REM/Hr1 |
| Citron | Ser/thr kinase | cytodiérèse | Rho | CNH |
| P70 S6 kinase | Ser/thr kinase | transcription | Rac/Cdc42 | |
| MLK2, 3 | Ser/thr kinase | JNK | Rac/Cdc42 | CRIB |
| MEKK1, 4 | Ser/thr kinase | JNK | Rac/Cdc42 | CRIB |
| PAK1, 2, 3 | Ser/thr kinase | JNK/actine | Rac/Cdc42 | CRIB |
| PAK 4 | Ser/thr kinase | Actine | Cdc42 | CRIB |
| MRCKa, MRCKb | Ser/thr kinase | Actine | Cdc42 | CRIB |
| Ack1, 2 | Tyrosine kinase | inconnue | Cdc42 | CRIB |
| MBS | SU phosphatase | Inactivation MLC | Rho | |
| Pi-4-5-P5K | Lipide kinase | Niveau PiP2/actine | Rho/Rac | |
| PI3K | Lipide kinase | Niveau PiP3 | Rac/Cdc42 | |
| DAG kinase | Lipide kinase | Niveau AP | Rho/Rac | |
| PLD | Lipase | Niveau AP | Rho/Rac/Cdc42 | |
| PLCb2 | Lipase | Niveau DAG/PiP3 | Rac/Cdc42 | |
| Rhophiline | Echafaudage | inconnue | Rho | REM |
| Rhotekine | Echafaudage | inconnue | Rho | REM |
| Kinectine | Echafaudage | Liaison kinésine | Rho | |
| mDia1 | Echafaudage | Organisation Actine | Rho | GBD-FH3 |
| mDia2 | Echafaudage | Organisation Actine | Rho/Cdc42 | GBD-FH3 |
| mDia3 | Echafaudage | Organisation Actine | Cdc42 | GBD-FH3 |
| WASP, NWASP | Echafaudage | Organisation Actine | Cdc42 | CRIB |
| WAVE, SCAR | Echafaudage | Organisation Actine | Rac | |
| POSH | Echafaudage | inconnue | Rac | |
| POR-1 | Echafaudage | Organisation Actine | Rac | |
| P140Sra-1 | Echafaudage | Organisation Actine | Rac | |
| P67 ^{phox} | Echafaudage | NADPH oxidase | Rac | |
| MSE55, BORG | Echafaudage | inconnue | Cdc42 | CRIB |
| IQGAP1, 2 | Echafaudage | Actine/contact | Rac/Cdc42 | |
| CIP-4 | Echafaudage | inconnue | Cdc42 | |

TABLEAU 8. Liste non-exhaustive d'effecteurs potentiels des protéines Rho, Rac et Cdc42. Liste de quelques effecteurs avec leur famille, leur fonction, leur sélectivité vis à vis des Rho et leur domaine de liaison aux Rho. Les domaines de liaison les plus communs, répertoriés d'après leur homologie de séquence sont CRIB, REM, GBD-FH3.

3.2. Les GTPases Rho et le trafic vésiculaire

La régulation du cytosquelette d'actine et des phosphoinositides étant deux processus indispensables pour le bon fonctionnement du transport des vésicules entre les différents compartiments cellulaires, les GTPases Rho apparaissent comme des régulateurs clés du trafic vésiculaire. En effet, les GTPases Rho ont la capacité de réguler le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi, le trafic endosomal, les différents types d'exocytose (exocytose constitutive, polarisée et régulée) mais également les nombreuses voies d'internalisation comme la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine ou encore l'endocytose indépendante de la clathrine (*Croisé et al., 2014*). La **FIGURE 40**, tirée de la revue que j'ai écrite sur ce sujet, résume la grande diversité des processus liés au trafic membranaire régulés par les GTPases Rho. Je détaillerai ici uniquement le contrôle de l'exocytose régulée par RhoA, Rac1 et Cdc42 (pour plus de détail, se référer à la revue (*Croisé et al., 2014*), jointe en annexes).

De nombreuses données de l'équipe démontrent un rôle primordial de Rac1 et Cdc42 dans le contrôle de l'exocytose régulée dans les cellules chromaffines. En effet, la stimulation de la sécrétion suite à une dépolarisation membranaire de cellules de phéochromocytome de rat (lignée PC12), induit l'activation de Rac1 et Cdc42 (*Gasman et al., 2004; Momboisse et al., 2009a*). L'expression de mutants constitutivement actifs induit une augmentation de la sécrétion alors que l'expression de mutants dominants négatifs ou d'ARN interférents dirigés contre Rac1 et Cdc42 bloquent la sécrétion (*Gasman et al., 2004; Malacombe et al., 2006b; Momboisse et al., 2009a*). Bien que Rac1 et Cdc42 aient le même effet sur la sécrétion, les voies de signalisation mises en jeu sont différentes. Rac1, activé par la GEF β Pix, active la phospholipase D1 conduisant à la production d'acide phosphatidique au site d'exocytose, facilitant ainsi la fusion du granule. Cdc42 activé par la GEF ITSN-1L est responsable de la polymérisation du cytosquelette d'actine au niveau des sites d'exocytose de la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de la voie N-WASP-Arp2/3 (*Gasman et al., 2004; Malacombe et al., 2006b; Momboisse et al., 2009a, 2009b*) voir aussi la revue (*Gubar et al., 2013*) à laquelle j'ai participé, jointe en annexes).

Enfin, l'expression d'un mutant constitutivement actif de RhoA induit une polymérisation du cytosquelette d'actine, mais contrairement à Cdc42, l'activation de RhoA bloque la sécrétion

dans les cellules PC12 (*Gasman et al., 1998; Bader et al., 2004*). Les mécanismes par lesquels l'activation/désactivation de RhoA est impliquée dans le contrôle de l'exocytose ont été élucidés très récemment. En effet, nous montrons dans l'équipe que l'inactivation de RhoA par la protéine GAP oligophrénine 1 est primordiale pour la mise en place du pore de fusion permettant la libération de catécholamines (pour plus de détail, se référer à l'article *Houy et al., 2014* dont je suis le 3^{ème} auteur, joint en annexes).

La régulation du métabolisme lipidique et de la dynamique du cytosquelette d'actine par les GTPases Rho est primordiale dans le processus de sécrétion régulée. Cependant, selon la GTPase activée (Cdc42 et RhoA), les structures d'actine mises en jeu semblent être différentes et conduisent à un effet opposé sur la sécrétion dans les cellules chromaffines. L'hypothèse actuelle stipule que RhoA et Cdc42 pourraient agir de façon séquentielle et contrôler des étapes différentes du processus d'exocytose. Cdc42 en induisant des filaments néosynthétisés au niveau des granules stimule l'exocytose alors que RhoA, en polymérisant le cytosquelette d'actine permet de prévenir l'arrimage des granules de sécrétion. En plus de piéger les granules dans le réseau d'actine, RhoA pourrait activer la phosphatidylinositol-4-kinase localisée comme RhoA au niveau de la membrane des granules, et ainsi favoriser la production de PIP2 permettant de stabiliser les interactions de la membrane des granules avec le cytosquelette d'actine. Suite à une stimulation, RhoA se retrouve inactivée, les granules peuvent être libérés et recrutés au niveau de la membrane plasmique pour ensuite fusionner avec la membrane plasmique (*Bader et al., 2004*) (**FIGURE 39**).

Notons que le rôle de Rac1 et Cdc42 dans la régulation de la sécrétion n'est pas limité aux cellules chromaffines, puisqu'elles ont la capacité de réguler l'exocytose dans les neurones, les mastocytes, les cellules β du pancréas, ou encore les neutrophiles (pour revue, voir (*Croisé et al., 2014*) en annexes). Le maintien de l'homéostasie du glucose dans l'organisme, dépendant de l'exocytose régulée de l'insuline par les cellules β du pancréas est un exemple particulièrement intéressant puisqu'il a permis de révéler l'importance de la désactivation de Cdc42 pour le bon fonctionnement du processus de sécrétion. En effet, la libération de l'insuline en réponse à une augmentation de la concentration de glucose requiert Cdc42 et Rac1 et de façon intéressante, la cinétique d'activation de Cdc42 et Rac1 est différente. Une rapide activation/désactivation de Cdc42 correspondant à la première phase de libération de

l'insuline mobilisant les granules arrimés, et une activation plus lente de Rac1 est nécessaire pour une libération plus soutenue, mobilisant le pool de réserve (Wang *et al.*, 2007; Wang and Thurmond, 2009).

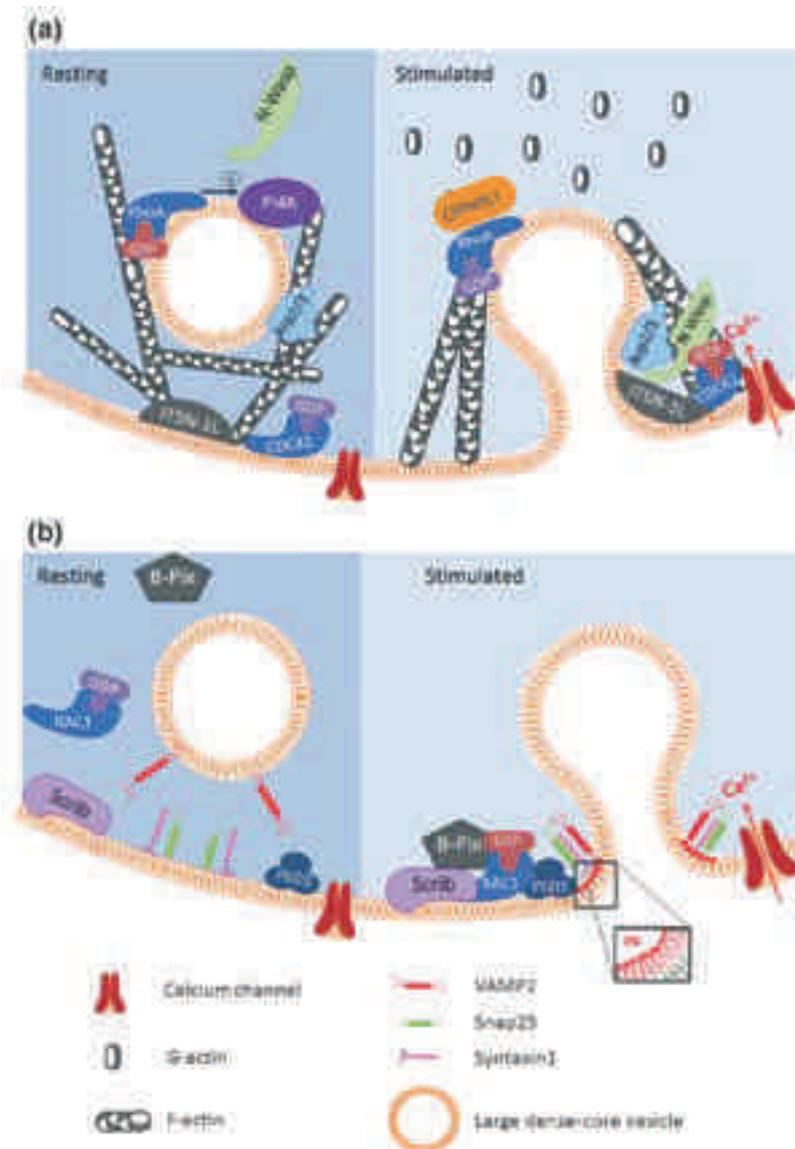


FIGURE 39. Rôle des GTPases Rac1, RhoA et Cdc42 dans l'exocytose régulée des cellules chromaffines. (A) Dans des conditions de repos, Cdc42 est inactive et localisée au niveau de la membrane plasmique, tandis que RhoA est active et localisée au niveau des granules de sécrétion. RhoA stabilise le réseau cortical d'actine et stimule la PI4K (phosphatidylinositol-4-kinase), ce qui conduit à la production de PIP2. Suite à une stimulation, le niveau de calcium intracellulaire augmente, provoquant ainsi l'arrimage des granules de sécrétion à la membrane plasmique. RhoA est inactivée par l'oligophénine, et Cdc42, activé par l'intersectine-1L induit la formation de filament d'actine par la stimulation de la voie N-WASP-Arp2/3. (B) En condition de repos, Rac inactif et son facteur d'échange β-PIX sont principalement localisés au niveau du cytoplasme. Suite à une stimulation, β-PIX est recruté par Scrib au niveau de la membrane plasmique et active Rac1. Rac1 activé stimule l'activité de la phospholipase D1 et génère ainsi de l'acide phosphatidique, favorisant la fusion en générant des courbures dans les membranes. D'après (Mombisse *et al.*, 2011).

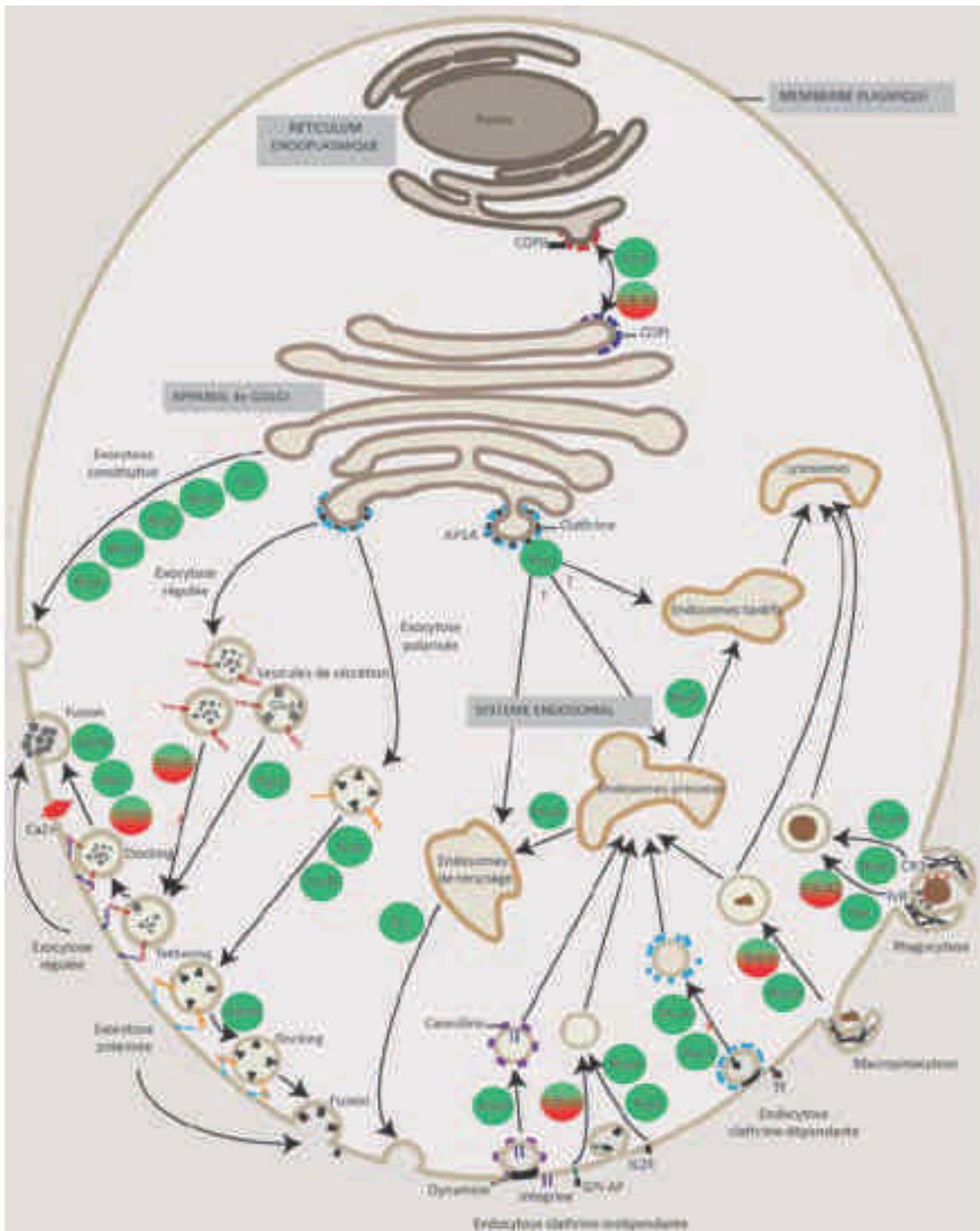


FIGURE 40. Rôles des GTPases Rho dans le trafic vésiculaire. La figure représente les compartiments cellulaires et voies vésiculaires dans lesquels les GTPases Rho ont un rôle régulateur *via* le contrôle du cytosquelette d'actine et/ou la composition en phosphoinositides des membranes. Elles régulent le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi, le trafic endosomal, les différents types d'exocytose (exocytose constitutive, polarisée et régulée) et les voies d'internalisation (phagocytose, macropinocytose, endocytose médiée par la clathrine ou endocytose indépendante de la clathrine). Pour simplifier le schéma, des vésicules sont représentées avec plusieurs protéines transmembranaires qui ne sont normalement pas présentes sur la même vésicule ou dans le même type cellulaire. Cercles vert : GTPase Rho impliquée ; Cercle bicolore vert/rouge : la désactivation de la GTPase est nécessaire pour la progression efficace du processus. D'après (Croisé et al., 2014).

3.3. Implication des GTPases Rho dans les cancers

Un nombre considérable d'études *in vitro* et *in vivo* relatent de l'implication des GTPases Rho dans le cancer. Cependant, l'utilisation de modèles cellulaires variés et de techniques d'approches différentes engendre une très grande complexité de ce vaste sujet. Mon travail de thèse portant sur l'étude des GTPases Rho dans les PHEO humains, afin de rester concise, j'ai fait le choix de me focaliser sur l'implication des GTPases Rho dans le cancer en présentant les évidences chez l'humain et *in vivo* dans les modèles murins, en m'appuyant toutefois sur quelques exemples *in vitro*.

3.3.1. Evidences de l'implication des GTPases Rho dans le cancer

L'initiation tumorale, c'est-à-dire la transition d'une cellule normale à un état transformé implique une dérégulation de la progression dans le cycle cellulaire ainsi qu'une capacité accrue à résister aux signaux pro-apoptotiques et à échapper à la mort cellulaire (**FIGURE 41**).

Les premières évidences que les GTPases Rho peuvent être liées à l'initiation tumorale proviennent d'études *in vitro* montrant que la voie de signalisation de ces protéines était primordiale pour l'induction de la transformation cellulaire induite par Ras (*Qiu et al., 1995; Zohn et al., 1998*). Des mutants constitutivement actifs de RhoA, Rac1 et Cdc42 contribuent aux modifications induites par Ras, telle que la capacité des cellules à proliférer *in vitro* en absence d'adhérence. Par exemple, Rac1 activé supprime l'apoptose induite par Ras, *via* l'activation du facteur nucléaire κ B (NF κ B), conduisant à l'augmentation de la survie des cellules transformées (*Joneson and Bar-Sagi, 1999*). *In vivo*, les tumeurs du poumon induites par K-Ras chez des souris n'exprimant plus Rac1 se développent moins rapidement (*Kissil et al., 2007*). Rac1 activé pourrait donc supprimer l'apoptose et ainsi contribuer à l'initiation des tumeurs du poumon en induisant une augmentation de la survie cellulaire. En revanche, chez des souris n'exprimant plus RhoB, le nombre de tumeurs induites par Ras est considérablement augmenté en comparaison avec les souris sauvages (*Liu et al., 2001*). Ces données suggèrent que RhoB peut fonctionner comme un suppresseur de tumeur en stimulant l'apoptose et en contrant ainsi les effets anti-apoptotiques de Rac1. De façon intéressante, la perte de Cdc42 dans un modèle murin conduit au développement spontané de tumeurs du foie, résultant d'une augmentation de la prolifération des hépatocytes (*van Hengel et al., 2008*). En adéquation avec un possible rôle de Cdc42 dans la survie cellulaire *in*

vivo, des données ont montré que l'expression d'un mutant constitutivement actif de Cdc42 dans les lymphocytes T chez des souris transgéniques induit une augmentation de l'apoptose des thymocytes (Na et al., 1999). Ainsi, ces données suggèrent un rôle oncogénique *in vivo* de la forme inactive de Cdc42. Enfin, par leurs rôles dans la progression du cycle cellulaire, notamment en modifiant l'expression de certains régulateurs du cycle cellulaire comme la cycline D (Olson et al., 1995), les GTPases Rho peuvent également favoriser le passage à un état cellulaire transformé et participer à l'initiation tumorale.

Les étapes plus tardives du développement tumoral impliquent l'acquisition de propriétés migratoires et invasives, comprenant les altérations des jonctions cellulaires, la mobilité et le remodelage de la MEC (FIGURE 41). Les cadhérines constituent les protéines majeures pour l'établissement et la maintenance des jonctions adjacentes entre deux cellules épithéliales. La perte ou la dérégulation des cadhérines induit une altération des jonctions cellulaires et de ce fait conduit à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Thiery and Sleeman, 2006). A titre d'exemple, des études *in vitro* révèlent que Rac1, activé par la protéine GEF Tiam1 est requise pour la formation efficace des jonctions cellulaires (Mertens et al., 2005). En accord avec ces données, la perte de Tiam1 induit la TEM *in vitro* (Malliri et al., 2004). De plus, bien que les souris n'exprimant plus Tiam1 développent moins de tumeurs de la peau induites par Ras, une plus grande proportion des tumeurs développées sont plus agressives et invasives que chez les souris sauvages, suggérant ainsi un rôle de l'inactivation de la voie de signalisation Rac1-Tiam1 dans le processus d'invasion tumorale (Malliri et al., 2002).

L'invasion tumorale nécessite également une altération des adhésions matrice-cellules pour que les cellules puissent traverser les tissus. Par exemple, RhoA et Rac1 sont capables de contrôler les métalloprotéases matricielles qui dégradent la MEC (Lozano et al., 2003). De plus, les GTPases Rho peuvent réguler les TIMPs (Tissus Inhibitor of Metalloprotéinases). En effet, l'activation de Rac1 par Tiam1 inhibe le processus d'invasion en induisant une augmentation du niveau de transcription de TIMP-1 et du niveau post-traductionnel de TIMP-2 dans les carcinomes rénaux (Engers et al., 2001).

Après la TEM et une modification de l'adhésion des cellules à la MEC, les cellules doivent acquérir des capacités de migration pour envahir les organes distants (FIGURE 41). Par exemple, une étude menée dans une lignée cellulaire de cancer de colon a montré que RhoC a les capacités d'induire la migration des cellules après la TEM (Bellocin et al., 2006). Un

modèle murin déficient pour RhoC a confirmé le rôle de cette protéine dans la mobilité et les métastases. En effet, il s'avère que les tumeurs induites par le croisement avec des souris exprimant l'antigène du polyoma virus conduisent moins fréquemment à des métastases lorsque RhoC est absente, confirmant que RhoC ne serait pas requise pour l'initiation tumorale mais plutôt pour la progression tumorale et les métastases (*Hakem et al., 2005*). De plus, il a été montré que RhoC induit la production de facteurs angiogéniques dans le cancer du sein, contribuant ainsi à l'entrée des cellules dans la circulation sanguine et à la formation de métastases (*Merajver and Usmani, 2005*).

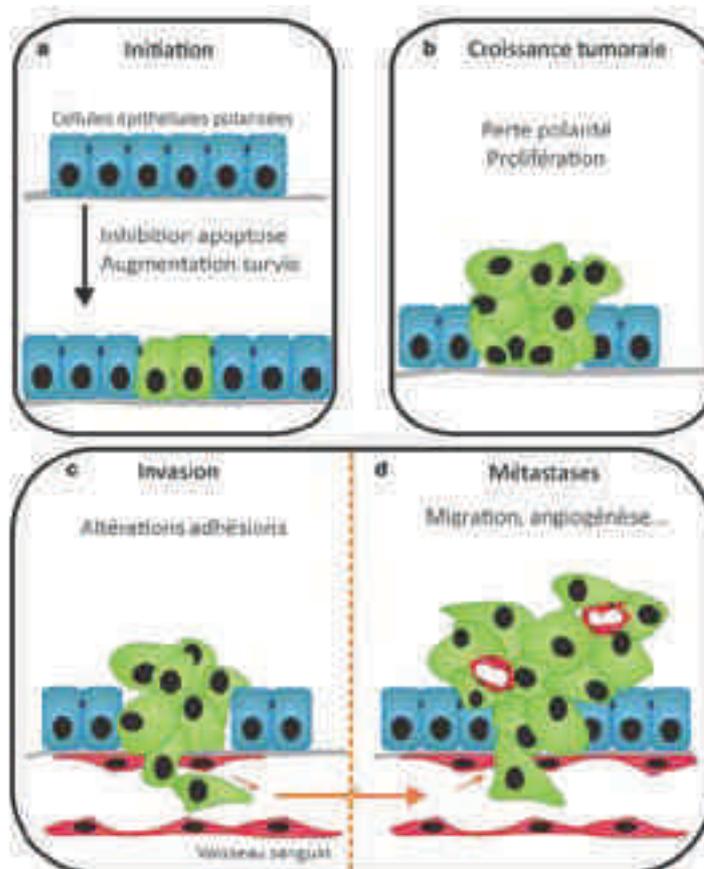


FIGURE 41. Contribution des GTPases Rho aux différentes étapes du développement tumoral. En collaboration avec d'autres facteurs oncogéniques, les GTPases Rho constituent une composante essentielle du processus de tumorigenèse. Ces protéines ont des rôles distincts, en contribuant à des étapes différentes du développement tumoral, (A) en influençant la prolifération et la survie. (B) Une fois que la tumeur est initiée, elles peuvent réguler la polarité cellulaire, (C) les adhésions cellules/cellules et cellules/matrice, (D) et peuvent permettre aux cellules de migrer pour envahir des organes distants. L'initiation et la progression tumorale nécessiteraient une coopération entre de nombreuses GTPases Rho. D'après (*Ellenbroek and Collard, 2007*).

3.3.2. Altération des GTPases Rho et de leurs régulateurs chez l'humain

3.3.2.1. Altération des GTPases Rho

Des mutations induisant une activation des protéines Ras, comprenant K-Ras, N-Ras et H-Ras ont été retrouvées dans 15 à 30% des tumeurs humaines (*Forbes et al., 2011*). Etant donné l'implication des voies de signalisation des GTPases Rho dans le cancer, ces protéines ont naturellement été suspectées de porter des mutations.

De façon surprenante, l'immense majorité des données concernant l'étude des GTPases Rho relatent de modifications du niveau d'expression des GTPases Rho dans les tumeurs humaines. Une diminution ou une perte d'expression sont reportées pour RhoH et RhoB, respectivement. Excepté ces deux protéines, la plupart des GTPases Rho ont leur niveau d'expression augmenté dans de nombreuses tumeurs humaines (**TABLEAU 9**). A titre d'exemple, l'augmentation de l'expression de RhoA est observée dans des cancers aussi variés que le cancer du foie, de la peau, des ovaires, des intestins, des testicules.... Cependant, le niveau d'expression protéique ne reflète pas la population active et fonctionnelle de la protéine et de telles altérations du niveau d'expression ne conduisent pas forcément à une modification de la voie de signalisation de RhoA. Même si une étude *in vitro* a démontré qu'un niveau élevé de RhoA facilitait la localisation de cette dernière à la membrane plasmique où elle peut être activée et induire le processus d'invasion, il est primordial de déterminer le statut d'activation de la protéine afin de pouvoir corrélérer le niveau d'expression et la transduction du signal (*Yoshioka et al., 1999*).

A l'heure actuelle, quelques évidences de modifications de l'activité de la protéine Rac dans les tumeurs humaines existent (**TABLEAU 9**). En effet, une hyperactivité de Rac1 et Rac2 est détectée dans des leucémies (*Thomas et al., 2007*). De plus, une étude a rapporté des niveaux élevés de Rac3 hyperactif dans des cellules dérivant d'un cancer du sein et associés à une induction persistante de l'activité de PAK, conduisant à une augmentation de la prolifération (*Mira et al., 2000*).

| GTPase | Altération | Type de tumeurs |
|--------------|---|---|
| RhoA | Augmentation de l'expression | Foie, vessie, œsophage, tête-cou, peau, ovaires, intestins, testicules, sein, colon, poumons |
| RhoB | Expression diminuée Perte d'expression Augmentation de l'expression | Poumons Tête et cou Sein |
| RhoC | Augmentation de l'expression | Mélanomes, seins, pancréas, foie ovaires, tête-cou, prostate, intestin, vessie, œsophage, poumons |
| RhoG | Augmentation de l'expression | Sein |
| Rac1 | Augmentation de l'expression Hyperactivité | Testicules, intestin, sein Leucémie |
| Rac2 | Augmentation de l'expression Hyperactivité | tête-cou, peau Leucémie |
| Rac3 | Augmentation de l'expression ou hyperactivité | sein |
| Cdc42 | Augmentation de l'expression | Testicules, sein |
| Rnd1 | Augmentation de l'expression | Sein |
| Rnd3 | Augmentation de l'expression Diminution de l'expression | Poumons, pancréas Prostate |
| RhoH | Diminution de l'expression | Leucémie |

TABLEAU 9. Altération de l'expression des GTPases Rho dans les tumeurs humaines. Le niveau d'expression de RhoA, RhoC, Rac1, Rac2, Rac3, RhoG, Cdc42, Rnd1 et Rnd3/RhoE est augmenté dans les tumeurs humaines. Notons qu'une hyperactivité de Rac1, Rac2 et Rac3 est détectée dans diverses tumeurs. L'expression de RhoB et de RhoH sont souvent diminuées dans les tumeurs humaines. D'après (Karlsson *et al.*, 2009).

La possibilité que les GTPases puissent porter des mutations dans les tumeurs humaines commence à émerger (TABLEAU 10). En effet, jusqu'à très récemment, Rac1 était l'une des seules GTPases Rho qui présentait des mutations ponctuelles dans des tumeurs humaines, et notamment dans quelques tumeurs du cerveau (Hwang *et al.*, 2004). En plus de ces données, deux études récentes ont identifié des mutations ponctuelles de Rac1 dans une autre tumeur, les mélanomes. Parmi ces mutations, une substitution de la proline en position 29 par une sérine (P29S) a été mise en évidence (Hodis *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2012). Un équivalent de la mutation de P29S a été retrouvé dans Rac2 et dans RhoT1, mais à une plus faible fréquence que dans Rac1 (Hodis *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent une importance de la proline 29 dans les mutations des GTPases Rho. En effet, ce résidu étant hautement conservé parmi les GTPases Rho, il n'est pas étonnant que cette mutation puisse survenir dans d'autres GTPases Rho et d'autres types de cancers. C'est le cas par exemple des cancers de la tête et du cou ainsi que le cancer du sein dans lesquels la mutation de Rac1 sur la proline 29 a été retrouvée (Forbes *et al.*, 2011; Stransky *et al.*, 2011).

L'étude de Hodis et collaborateurs a également permis d'identifier la mutation activante G12V dans Cdc42 comme mutation moteur de la formation des mélanomes (Hodis et al., 2012). Il s'avère que cette mutation bien caractérisée apparaît fréquemment dans les protéines Ras au sein de nombreux cancers (Malumbres and Barbacid, 2003). Enfin, des mutations de RhoA ont également été mises à jour très récemment dans de nombreux cancers (Lawrence et al., 2014; Sakata-Yanagimoto et al., 2014; Yoo et al., 2014).

Dans l'ensemble, les mutations détectées semblent être localisées au niveau du domaine effecteur ou du domaine de liaison aux nucléotides guanidiques. Cependant, les mutations n'ont pas toutes les mêmes conséquences sur l'état d'activation des GTPases. La mutation P29S et G12V semble conférer une conformation active de Rac1 et de Cdc42 respectivement tandis que la mutation de la glycine en position 17 retrouvée dans les lymphomes à cellules T conduit à la génération d'un mutant RhoA inactif (Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012; Sakata-Yanagimoto et al., 2014; Yoo et al., 2014). De façon surprenante, si une mutation activatrice de Cdc42 est corrélée avec la formation des mélanomes, une étude a montré que l'inactivation de Cdc42 dans un modèle murin serait impliquée dans l'apparition de cancers du foie (van Hengel et al., 2008).

| GTPase | Mutation | Type de tumeur | Référence |
|--------------|--------------------------|--|--|
| Rac1 | P29S | Mélanomes | (Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012) |
| Rac1 | P29S | Tumeurs tête-cou | (Stransky et al., 2011) |
| Rac1 | P29S | Sein | (Forbes et al., 2011) |
| Rac1 | Diverses selon la tumeur | Tumeurs cérébrales | (Hwang et al., 2004) |
| Rac2 | P29S | Mélanomes | (Hodis et al., 2012) |
| RhoA | Diverses selon la tumeur | Vessie, sein, colorectal, uterus, tête et cou, œsophage, poumons, mélanomes, ovaires | (Lawrence et al., 2014) |
| RhoA | G17V | Lymphomes cellules T | (Sakata-Yanagimoto et al., 2014; Yoo et al., 2014) |
| RhoT | P30L | Mélanomes | (Hodis et al., 2012) |
| Cdc42 | G12V | Mélanomes | (Hodis et al., 2012) |
| RhoH | diverses | Lymphomes | (Preudhomme et al., 2000; Gaidano et al., 2003) |

TABLEAU 10. Mutations des GTPases Rho dans les cancers humains. Actuellement, les données rapportent surtout des mutations de Rac (1 et 2) dans les tumeurs humaines. Cependant, des études récentes rapportent des mutations de RhoA, Cdc42, RhoT et RhoH.

3.3.2.2. Altération des régulateurs des GTPases Rho

En plus du nombre grandissant de mutations détectées dans les GTPases Rho, de nombreuses données démontrent une modification des voies régulatrices de ces protéines, suggérant également que l'état d'activation des GTPases Rho peut être modifié dans les tumeurs humaines (TABLEAU 11).

La majorité des GEF présentant une modification, telles que des changements du niveau d'expression, des mutations ou des fusions géniques dans les tumeurs ou cellules dérivant de tumeurs humaines, sont potentiellement spécifiques de Rac ou de RhoA. Par exemple, LARG qui est spécifique de RhoA, a été isolé chez un patient atteint de leucémie et caractérisé comme fusionné à un gène fréquemment réarrangé dans les leucémies, MLL (Mixed Lineage Leukemia) (Kourlas et al., 2000). Cette fusion induit une troncation de LARG, ce qui contribuerait au développement de la leucémie, *via* probablement une activation de RhoA (Reuther et al., 2001). Nous pouvons également citer une autre GEF spécifique de RhoA, GEF-H1, qui accélère la prolifération tumorale suite à une activation transcriptionnelle par l'expression d'un mutant de la protéine p53. Les auteurs montrent que l'augmentation de GEF-H1 conduit à une augmentation de l'activation de RhoA et contribue au développement tumoral en association avec la mutation p53 (Mizuarai et al., 2006). Enfin, pour citer un exemple de GEF muté, Tiam1, qui est une GEF spécifique de Rac1, présente une mutation du domaine PH dans 10% de carcinomes rénaux humains (Engers et al., 2000). Ce domaine étant impliqué dans la localisation de la protéine à la membrane, cette mutation peut ainsi interférer avec l'activation de Rac1. Dans des modèles murins, l'absence de Tiam1 induit une réduction de l'activité de Rac1 et une résistance au développement des tumeurs épithéliales de la peau induite par Ras, suggérant ainsi un lien *in vivo* entre l'activation de Rac1 par Tiam 1 et l'initiation tumorale (Malliri et al., 2002).

Des niveaux d'expression modifiés de protéines GAP, comprenant par exemple DLC-1 et DLC-2 (Deleted in Liver Cancer) sont également liés à la tumorigénèse. En effet, une délétion génomique de DLC-1 qui est une GAP spécifique de RhoA et Cdc42 a été retrouvée dans les cancers du sein tandis que l'expression de DLC-2 est diminuée dans les carcinomes du foie (Ching et al., 2003; Yuan et al., 2003). La délétion ou la sous-expression de ces GAP peut conduire à une augmentation de RhoA et/ou Cdc42 liée au GTP, induire de ce fait une augmentation de leur activité et participer au développement tumoral. Enfin, certaines protéines GAP ont leur niveau d'expression augmenté dans les cancers, tel que la protéine

ARHGAP8 dans les tumeurs cervicales et les médulloblastomes, suggérant que le développement tumoral est lié à une diminution de l'activité des GTPases Rho dans ces tumeurs (*Song et al., 2008b*).

L'expression des RhoGDI est également dérégulée dans divers cancers. Par exemple, l'expression de RhoGDI 1, se liant à RhoA, RhoB, Rac1, Rac2 et Cdc42 est augmentée dans le cancer invasif des ovaires. Une augmentation de l'expression des GDI implique une diminution de la localisation des protéines Rho à la membrane, et de ce fait une probabilité moindre d'être activée, suggérant que le développement du cancer des ovaires est lié à une diminution de l'activation des protéines Rho. A l'inverse, la diminution de RhoGDI 2, et probablement une augmentation de l'activité des GTPases Rho, stimule le développement du cancer métastatique de la vessie (*Jones et al., 2002; Theodorescu et al., 2004*).

Pour la plupart des régulateurs des GTPases Rho (GEF, GAP et GDI), les mécanismes exacts selon lesquels leurs modifications influencent l'activité des GTPases et la progression tumorale restent à élucider. De plus, si des données sont disponibles *in vitro*, la spécificité *in vivo* de la majorité des régulateurs des GTPases Rho ne sont pas encore connues, ce qui engendre des difficultés à l'heure actuelle quant à la compréhension des mécanismes liant les modifications des régulateurs et l'activation des GTPases Rho dans les cancers humains. Enfin, les GTPases Rho contribuant à des étapes différentes du développement tumoral, il n'est pas étonnant de détecter des altérations simultanées de plusieurs GTPases Rho et de leurs voies régulatrices au sein d'une même tumeur humaine. C'est le cas par exemple du cancer du sein, dans lequel une augmentation du niveau d'expression de huit GTPases Rho (RhoA, RhoB, RhoC, RhoG, Rac1, Rac3, Cdc42, Rnd1), des mutations de deux GTPases Rho (Rac1 et RhoA) et une augmentation de l'expression d'un régulateur (MyoGEF, spécifique de RhoA et RhoC) sont observées. Il est donc primordial de considérer l'ensemble des GTPases Rho dans le but d'élucider le rôle de ces protéines dans le cancer. Enfin, une complexité supplémentaire est à souligner, puisque selon le type de tumeur, les GTPases Rho ainsi que les régulateurs considérés, le développement tumoral peut être la conséquence d'une hyperactivité des GTPases Rho mais aussi la conséquence d'une inhibition de leur activation. Il y a donc nécessité d'évaluer plus précisément la relation entre les régulateurs, les niveaux d'expression et d'activités des GTPases Rho et le contexte cellulaire afin d'avoir une vision plus globale de leur rôle dans l'oncogenèse.

| REG | Type d'altération | Protéine | Cible | Type de cancer | Références |
|-----|---------------------------|-------------------|----------------|--|---|
| GEF | Mutation | Tiam1 | Rac1 | Carcinomes rénaux | (Engers et al., 2000) |
| GEF | Surexpression | MyoGEF | RhoA, RhoC | Sein | (Wu et al., 2009) |
| GEF | Surexpression | P-Rex1 | Rac | Adénocarcinomes de la prostate | (Qin et al., 2009) |
| GEF | Surexpression, troncation | Vav-1 | Rac | Neuroblastome, poumons, sein, ovaries, prostate, mélanomes | (Katzav, 2007) |
| GEF | Fusion MLL | LARG | RhoA | Leucémie | (Kourlas et al., 2000) |
| GEF | Fusion | BCR | ? | Leucémie | (Advani and Pendergast, 2002) |
| GEF | Surexpression | ECT-2 | RhoA | Poumons, oesophage | (Hirata et al., 2009) |
| GEF | Surexpression | ARHGEF1 | RhoA | Prostate, | (Li et al., 2013) |
| GEF | Surexpression | | | Gastriques | (Huang et al., 2011) |
| GEF | Mutation | | | Colon | (Sjöblom et al., 2006) |
| GEF | Surexpression | GEF-H1 | RhoA | Nombreux cancers | (Mizuarai et al., 2006) |
| GAP | Inactivation | P190RhoGAP | Rho | Gliome | (Wolf et al., 2003) |
| GAP | Sous-expression | DLC1, DLC2 | RhoA, Cdc42 | Sein Foie | (Yuan et al., 2003) (Ching et al., 2003) |
| GAP | Surexpression | ARHGAP36 | ? | Médulloblastomes | (Rack et al., 2014) |
| GAP | Surexpression | ARHGAP8 | ? | Tumeurs cervicales | (Song et al., 2008b) |
| GDI | Surexpression | RhoGDI1 | Rho, | Ovaires | (Jones et al., 2002) |
| | Sous-expression | RhoGDI2 | Rac, Cdc42 | Vessie | (Theodorescu et al., 2004) |

TABLEAU 11. Liste non exhaustive des régulateurs des GTPases Rho modulés dans les tumeurs humaines. La majorité des modifications découvertes affectent les GEF, pour la plupart identifiés comme spécifiques de RhoA ou Rac. Des changements d'expression des GAP et des GDI sont également observés.

RÉSULTATS

1. RAPPELS DES OBJECTIFS

Actuellement, les mécanismes moléculaires responsables de la perturbation de la sécrétion observée dans les TNE ne sont pas encore élucidés. Nous suggérons dans l'équipe que l'origine de l'hypersécrétion pourrait être la conséquence d'une modulation de protéines impliquées dans le contrôle de la sécrétion. Les données antérieures de l'équipe ont largement contribué à démontrer le rôle des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 dans la régulation de l'exocytose dans les cellules chromaffines. L'idée de s'intéresser à ces protéines régulatrices de l'exocytose dans une pathologie présentant une perturbation de la sécrétion étant séduisante, la deuxième partie de mon projet de thèse a été dédiée à l'étude des GTPases Rho et des protéines régulant leur activité dans les PHEO.

2. ETUDE DES GTPASES RHO ET DE LEURS RÉGULATEURS DANS LES PHEO

2.1. Modèle expérimental utilisé

Une étroite collaboration avec le Pr. Laurent Brunaud (chirurgien du centre hospitalier universitaire de Nancy-Brabois) qui procède régulièrement à des exérèses de PHEO nous a permis d'avoir accès au cours de mon projet de thèse, à des échantillons humains de PHEO, essentiellement bénins et d'origine sporadique (voir partie matériel et méthodes pour plus de détails). Dans l'ensemble des résultats que je présente sur le tissu humain, les échantillons de PHEO sont systématiquement comparés à l'échantillon non tumoral correspondant, prélevé en dehors de la zone tumorale chez le même patient (FIGURE 42).



FIGURE 42. Photographie d'un PHEO humain. La zone tumorale prélevée est de couleur rouge-brun, tandis que la zone saine est de couleur gris-brun. De part et d'autre du tissu sain se trouve la corticosurrénale de couleur jaune.

2.2. Modulation de l'activité et de l'expression des GTPases Rho

Afin d'étudier les voies de signalisation des GTPases Rho dans les PHEO humains, je me suis focalisée sur les trois GTPases Rho les plus largement caractérisées en cancérologie à savoir RhoA, Rac1 et Cdc42. Actuellement, la majorité des études ont révélé majoritairement des variations du niveau d'expression des GTPases Rho dans les tumeurs humaines, en s'intéressant très peu à leur niveau d'activité. Grâce à une méthode de dosage ELISA mise au point au laboratoire par Stéphane Ory (**FIGURE 43A**), j'ai pu quantifier à la fois le niveau d'activité et d'expression des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 dans 18 PHEO sporadiques bénins par rapport à leur médullo-surrénale non tumorale correspondante. Bien que l'expression de RhoA soit légèrement augmentée, son activité ne diffère pas dans le PHEO par rapport au tissu non tumoral. En revanche, j'observe ici que l'activité de Rac1 et de Cdc42 est significativement diminuée dans les PHEO par rapport au tissu non tumoral tandis que l'expression de ces deux GTPases reste inchangée (**FIGURE 43B**).

Ces résultats sont particulièrement inédits et innovants puisqu'ils constituent la première analyse d'activité de GTPases Rho dans une tumeur neuroendocrine humaine et qu'ils révèlent pour la première fois une diminution simultanée de l'activité de deux GTPases Rho, Rac1 et Cdc42, dans une tumeur humaine. Ces résultats soulèvent la question de l'origine moléculaire de cette modification d'activité de Rac1 et Cdc42. Une des hypothèses les plus probables est une modification des régulateurs GEF et GAP des GTPases Rho.

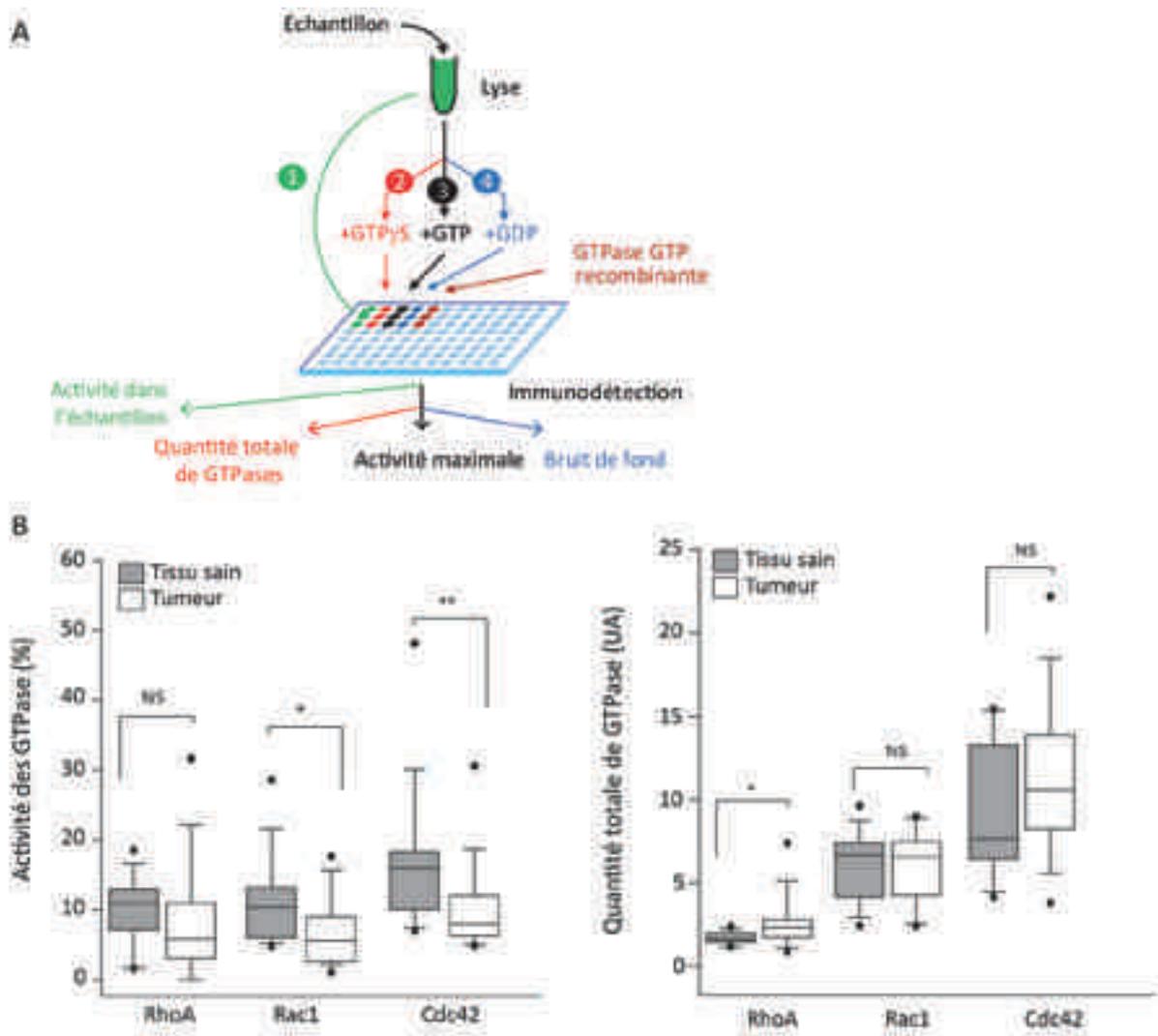


FIGURE 43. Mesure de l'activité et de l'expression des GTPases dans les PHEO humains par dosage ELISA. (A) Protocole expérimental. Fraction 1 : activité des GTPases dans l'échantillon. Fractions 2,3 et 4 : ajout de nucléotides guanidiques en excès, respectivement : GTPγS non hydrolysable (niveau d'expression des GTPases), GTP (activité maximale détectable) et GDP (bruit de fond). (B) Niveau d'activité en pourcentage de RhoA, Rac1 et Cdc42 dans les PHEO comparé au tissu non tumoral et niveau d'expression en unité arbitraire des GTPases dans les PHEO comparé au tissu non tumoral. (n=18), * p<0,05 ; ** p<0,01 ; test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés.

2.3. Modulation des voies régulatrices des GTPases Rho

2.3.1. Stratégie expérimentale utilisée

Afin d'orienter mes recherches vers les régulateurs des GTPases Rho dans les PHEO humains, j'ai profité d'un projet collaboratif en cours entre notre équipe de recherche et l'entreprise Montréalaise Caprion. Ce projet vise à cartographier les variations protéiques dans les PHEO par le biais d'un crible protéomique quantitatif à haut débit permettant de comparer les tumeurs au tissu non tumoral par spectrométrie de masse à partir de six échantillons de

PHEO humains. Habituellement, les cribles protéomiques sont réalisés sur des homogénats totaux. Dans cette étude, le crible a été réalisé sur deux fractions subcellulaires enrichies en compartiments importants pour le trafic membranaire. Les différents compartiments subcellulaires ont été séparés par centrifugation sur gradient de sucrose. Au moment de la réalisation du projet, l'équipe ne disposant que d'échantillons congelés, il était impossible de purifier les granules de sécrétion qui éclatent lors de cycles de congélation/décongélation. C'est pourquoi il a été décidé d'analyser deux fractions différentes : une fraction contenant les protéines cytoplasmiques (fraction cytoplasmique) et une fraction récupérée à l'interface de sucrose 0,8-1,2 molaires (fraction « membranes légères ») contenant la membrane plasmique, l'appareil de Golgi ainsi que diverses membranes légères (endosomes, vésicules de sécrétion constitutives, membranes de granules de sécrétion cassées à la décongélation et granules de sécrétion immatures) (FIGURE 44; voir matériel et méthodes pour les détails techniques). J'ai donc tiré profit des données de ce crible pour analyser spécifiquement les variations d'expression des régulateurs des GTPases dans les PHEO par rapport au tissu sain.

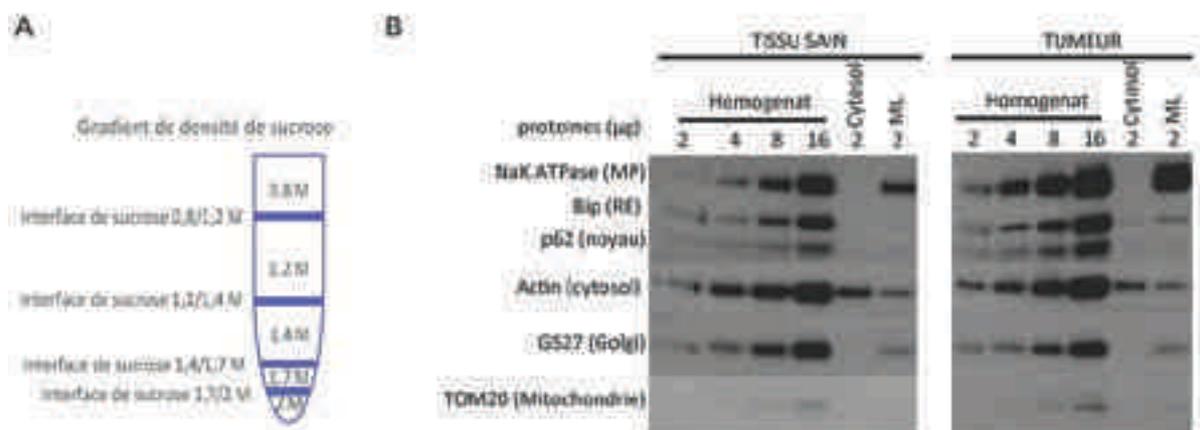


FIGURE 44. Fractionnement subcellulaire réalisé par l'entreprise Caprion. (A) Représentation schématique du fractionnement subcellulaire par gradient de densité de sucrose permettant de purifier les fractions enrichies en cytosol et en membranes légères à l'interface des coussins de sucrose de concentration 0,8-1,2M. (B) Western Blot indiquant la pureté des fractions subcellulaires purifiées. Des anticorps dirigés contre des marqueurs spécifiques de compartiments subcellulaires tels que la membrane plasmique (MP), le réticulum endoplasmique (RE), le noyau, le cytosol, l'appareil de Golgi ou les mitochondries ont été utilisés.

2.3.2. Détection et variation du niveau d'expression des régulateurs de type GEF et GAP spécifiques des GTPases Rho dans les PHEO humains

J'ai recensé neuf protéines GEF et six protéines GAP spécifiques des GTPases Rho dans le crible protéomique, dont trois présentent une variation d'expression significative dans la tumeur par rapport au tissu péri-tumoral : la protéine GAP ARHGAP36 et les deux protéines GEF: FARP1 et ARHGEF1 (TABLEAU 12 et FIGURE 45). Le niveau d'expression de FARP1 est diminué dans les PHEO par rapport au tissu non tumoral dans la fraction cytoplasmique ainsi que dans la fraction membranes légères. En revanche, le niveau d'expression d'ARHGEF1 est diminué dans la fraction cytoplasmique mais la protéine n'a pas été détectée dans la fraction membranes légères. De plus, les résultats indiquent une augmentation du niveau d'expression d'ARHGAP36 dans les deux fractions.

| Nom | Numéro accession | Cytoplasme | Membranes | Modulation |
|----------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| Protéines GEF | | | | |
| ARHGEF1 | 199002.1 | 0,49 ** | ND | Baisse |
| ARHGEF6 | 004840.2 | 0,83 | 1,32 | |
| ARFGEF15 | 173728.3 | ND | 1,42 | |
| Dock7 | 033407.2 | ND | 1,54 | |
| Dock8 | 203447.3 | ND | 0,81 | |
| Dock11 | 144658.3 | ND | 0,99 | |
| FARP1 | 005766.2 | 0,55 ** | 0,51 *** | Baisse |
| OCRL | 000276.3 | 1,28 | 2,75 | |
| Vav2 | 001134398.1 | 1 | ND | |
| Protéines GAP | | | | |
| ARHGAP1 | 004308.2 | 0,94 | 0,99 | |
| ARHGAP17 | 001006634.1 | 0,76 | ND | |
| ARHGAP18 | 033515.2 | 0,5 | ND | |
| ARHGAP36 | 144967.3 | 4,45 *** | 1,55 *** | Augmentation |
| ARHGAP40 | 001164431.1 | 0,54 | ND | |
| ARHGAP47 | 152133.1 | 1,14 | ND | |

TABLEAU 12. Régulateurs des GTPases Rho détectés dans le crible protéomique différentiel (entreprise Caprion). Liste des quinze régulateurs des GTPases Rho identifiés dans le crible protéomique par fractionnement. Les colonnes correspondent au nom du régulateur, le numéro d'accèsion de la protéine, la modulation dans la fraction cytoplasmique et la modulation dans la fraction membranes légère. ND : Non Détecté ; **p<0,01 et q<0,01 ; *** p<0,001 et q<0,001, test ANOVA.

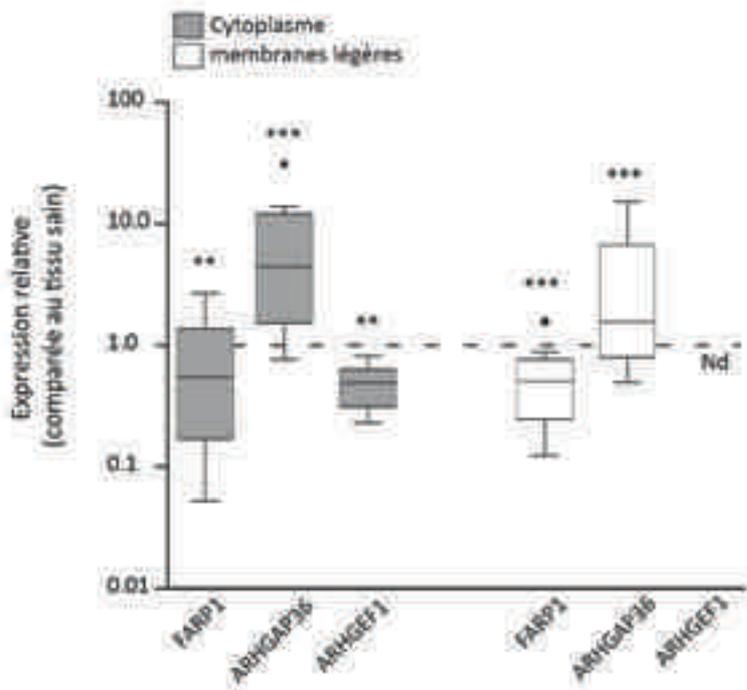


FIGURE 45. Expression subcellulaire de FARP1, ARHGAP36 et ARHGEF1 dans les PHEO. Analyse par spectrométrie de masse. Les données correspondent à la variation moyenne de six échantillons humains. ** $p < 0,01$ et $q < 0,01$; *** $p < 0,001$ et $q < 0,001$, test ANOVA.

Ce premier constat est très intéressant puisqu'une baisse d'expression de protéine GEF et une augmentation de l'expression de protéines GAP aura pour conséquence de diminuer l'activité des GTPases, or c'est bien une baisse d'activité de Rac1 et Cdc42 que nous observons dans les PHEO. L'analyse fractionnée nous apporte une information quant à la modulation du niveau d'expression des régulateurs spécifiquement au sein des deux fractions subcellulaires. Mais qu'en est-il de la variation de ces régulateurs au niveau global ? Pour répondre à cette question, le niveau d'expression d'ARHGEF1, de FARP1 et d'ARHGAP36 a été déterminé à partir d'extraits totaux de protéines par spectrométrie de masse et par PCR quantitative (qPCR) à partir d'extraits d'ARN messagers totaux (FIGURE 46). Le niveau d'expression protéique et génique de FARP1 est significativement diminué dans les PHEO par rapport au tissu non tumoral tandis que la quantité de protéines ARHGAP36 et de son ARNm est considérablement augmentée dans les PHEO. En revanche, tant au niveau de la protéine que de l'ARNm, le niveau d'expression d'ARHGEF1 reste inchangé. Ainsi, la modulation de l'expression de FARP1 et d'ARHGAP36 au sein des fractions subcellulaires se reflète au niveau global. Par contre, le niveau d'expression global d'ARHGEF1 ne varie pas alors que nous avons détecté une diminution de son expression dans la fraction

cytoplasmique. Ces résultats suggèrent que l'inhibition cytoplasmique d'ARHGEF1 est compensée, probablement par une variation de son expression à la hausse dans un autre compartiment subcellulaire.

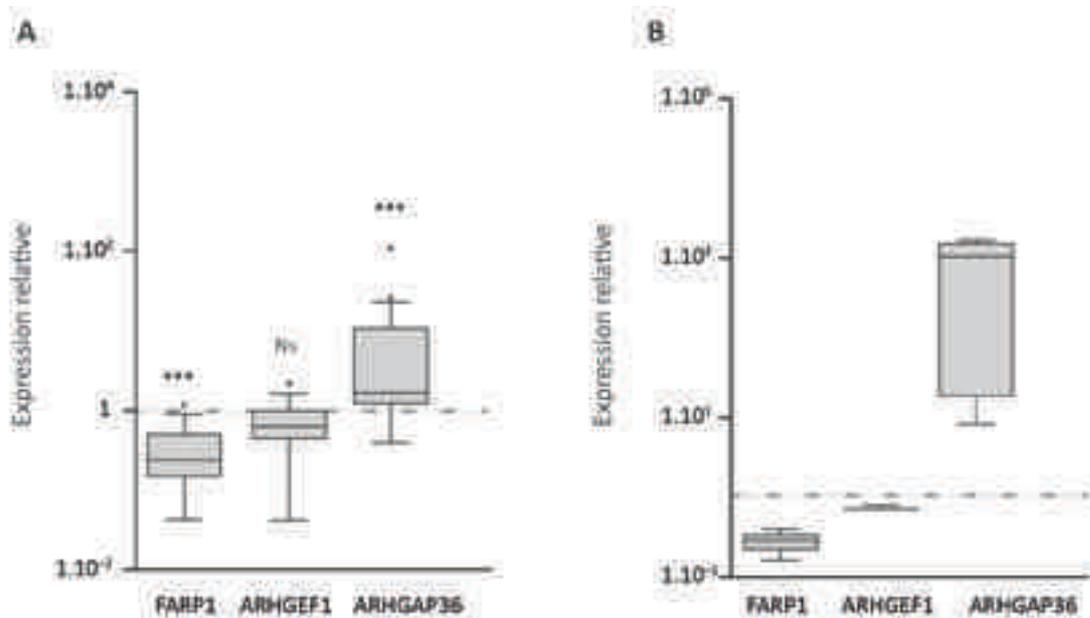


FIGURE 46. Niveau d'expression protéique et génique de FARP1, ARHGEF1 et ARHGAP36. (A) Niveau d'expression protéique relative des trois régulateurs par spectrométrie de masse MRM, Caprion). Les données correspondent à 21 échantillons. NS: non significatif; *** $p < 0,001$, test ANOVA. (B) Niveau d'expression génique relative des trois régulateurs par qPCR, $n=4$.

2.4. Etude de la spécificité des régulateurs envers les GTPases Rho

2.4.1. Etude du domaine GAP d'ARHGAP36

L'activité GEF des protéines FARP1 et ARHGEF1 est bien documentée dans la littérature, en revanche, très peu de données existent concernant ARHGAP36. Afin d'analyser le domaine GAP de cette protéine, j'ai réalisé un alignement de séquence de son domaine GAP avec les séquences des domaines GAP de toutes les protéines GAP des GTPases Rho humaines répertoriées. Le domaine GAP contient une séquence consensus en doigt de zinc ainsi qu'un résidu arginine conservé et nécessaire pour la catalyse de l'activité d'hydrolyse du GTP par les GTPases (Cherfils and Zeghouf, 2013). De façon intéressante, ce résidu arginine (R) dans la séquence consensus du domaine GAP d'ARHGAP36 est remplacé par un résidu thréonine (T) (FIGURE 47). Ce résultat suggère fortement que le domaine GAP d'ARHGAP36 n'est pas fonctionnel. En effet, l'absence de ce résidu arginine est connue pour inhiber totalement l'activité GAP. A titre d'exemple, ce résidu arginine est remplacé par un résidu glutamine (G) dans le domaine GAP de OCRL le rendant complètement inactif (Erdmann et al., 2007;

Pirruccello et al., 2011). La suite de mes travaux consistant à étudier *in vitro* l'effet des ces trois protéines régulatrices sur l'activité de RhoA, Rac1 et Cdc42, j'ai volontairement écarté ARHGAP36 puisque son activité régulatrice des GTPases Rho est compromise. Je me suis donc focalisée sur FARP1 et ARHGEF1.

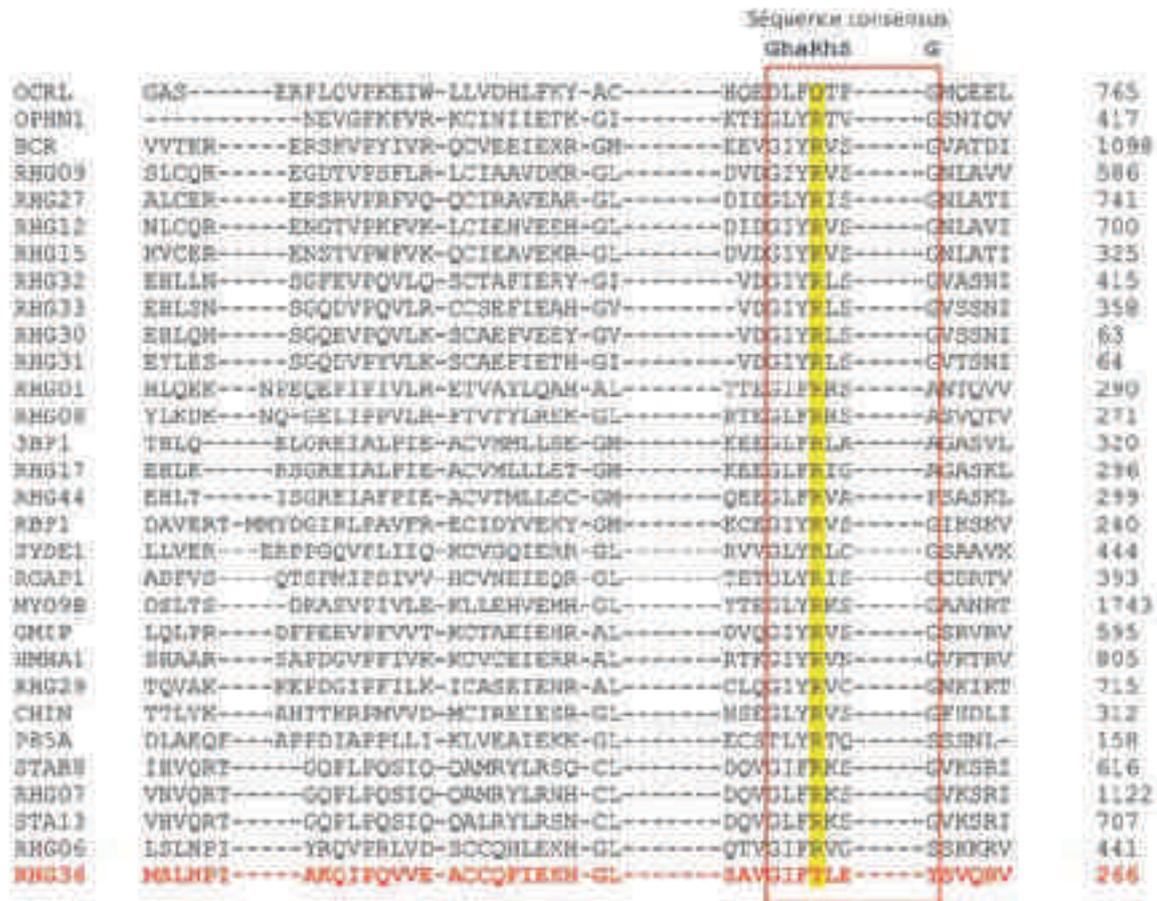


FIGURE 47. Alignement de la séquence du domaine GAP d'ARHGAP36 avec les séquences des domaines GAP de protéines GAP humaines. L'ensemble des protéines GAP n'est pas représenté sur cette figure. L'encadré rouge représente la séquence consensus du domaine GAP : GhaRhSg, avec G=Glycine ou Alanine ; H= résidu hydrophobe; A= résidu aromatique; R= Arginine ; S= Sérine, Thréonine ou Alanine. L'alignement multiple a été réalisé avec ClustalW2.

2.4.2. Etude de la spécificité de FARP1 et ARHGEF1

Afin d'étudier la spécificité de FARP1 et ARHGEF1 envers les GTPases Rho, j'ai choisi d'utiliser une approche perte de fonction en inhibant l'expression de FARP1 et ARHGEF1 par ARN interférence dans les cellules de PHEO de rat (PC12). Les SiRNA dirigés contre FARP1 et ARHGEF1 induisent une inhibition de l'expression des ARNm de $86,3 \pm 3$ et $92,3 \pm 2,3$ pourcents, respectivement. J'ai donc dosé l'activité de Cdc42, RhoA et Rac1 dans les cellules PC12 n'exprimant plus FARP1 ou ARHGEF1 (FIGURE 48). L'inhibition de l'expression de FARP1

et d'ARHGEF1 induit respectivement une diminution de l'activité de Cdc42 et de Rac1 dans les cellules PC12, alors que l'activité de RhoA est inchangée. Ces résultats suggèrent que FARP1 et ARHGEF1 seraient respectivement des GEF spécifiques de Cdc42 et Rac1 et qu'il pourrait y avoir un lien entre la diminution de l'activité de Cdc42 et Rac1 et la modulation de FARP1 et ARHGEF1 observée dans les PHEO.

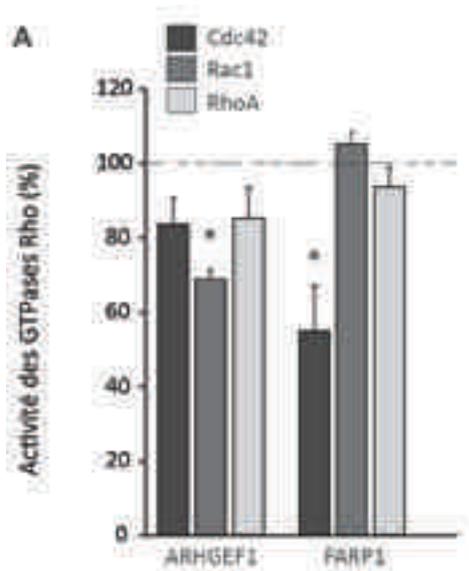


FIGURE 48. Dosage d'activité de RhoA, Rac1 et Cdc42 *in vitro* dans les PC12 (A) Niveau d'activité des GTPases Rho après inhibition de l'expression de FARP1 et ARHGEF1 par ARN interférent dans les PC12. Les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau d'activité dans les cellules contrôles transfectées avec un SiRNA de séquence aléatoire ne ciblant aucun ARN connu chez le rat. n=4, ± SEM. * p<0,05, test de Kruskal-Wallis.

2.5. La modulation d'ARHGEF1 et de FARP1 est-elle spécifique des PHEO humains ?

2.5.1. Modulation d'ARHGEF1 et FARP1 dans un modèle murin de PHEO

Nous avons montré une modulation de l'expression d'ARHGEF1 et de FARP1 dans les PHEO humains par rapport au tissu non tumoral. Qu'en est-il de cette modulation dans un modèle murin ? Pour répondre à cette question, nous avons comparé le niveau d'expression des gènes ARHGEF1 et FARP1 par PCR quantitative des cellules de PHEO de rat (PC12) avec celui de la médullosurrénale saine de rat (FIGURE 49). De façon très intéressante, le niveau d'expression génique de FARP1 est diminué de façon drastique dans les cellules tumorales de rat par rapport au tissu sain tandis que le niveau d'expression d'ARHGEF1 reste inchangé. L'obtention des mêmes résultats chez le rat et l'humain est rassurante. Non seulement ces données valident nos résultats obtenus chez l'homme mais ils indiquent également que les cellules PC12 constituent un bon modèle murin pour l'étude des PHEO humains, notamment en ce qui concerne la voie de régulation des GTPases Rho dans les PHEO.

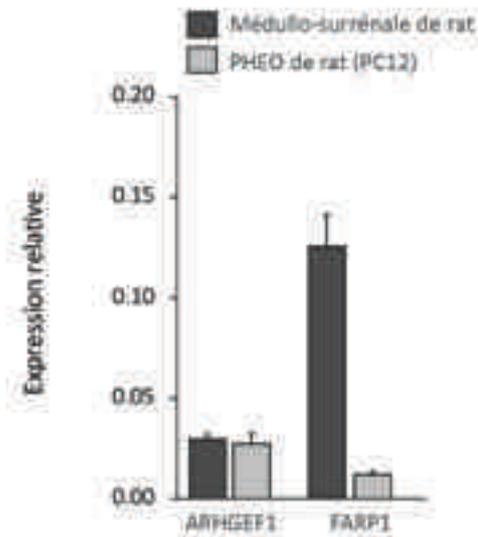


FIGURE 49. Diminution du niveau d'expression génique de FARP1 dans les PC12. Niveau d'expression relative par PCR quantitative d'ARHGEF1 et FARP1 dans les PC12 comparé à la médullosurrénale saine de rat. Les résultats sont présentés en moyenne de 3 expériences indépendantes, \pm SEM.

2.5.2. Modulation d'ARHGEF1 et FARP1 dans diverses tumeurs

Une autre question se pose. La modulation de FARP1 et ARHGEF1 est-elle une caractéristique spécifique des PHEO ou bien est-elle généralisable à d'autres tumeurs de type neuroendocrines ou autres? Afin d'aborder cette question, une étude a été réalisée en collaboration avec Caprion sur des échantillons de différents types de tumeurs neuroendocrines et non neuroendocrines (TABLEAU 13). Nous pouvons noter une augmentation de l'expression de FARP1 dans le cancer du sein ainsi qu'une augmentation de l'expression d'ARHGEF1 dans le cancer de la vessie. Ces résultats indiquent que l'expression protéique de ces deux protéines peut être modulée dans d'autres types de cancers, mais il semblerait que la diminution d'expression de FARP1 et d'ARHGEF1 soit caractéristique des PHEO.

| | Colon | Poumon | Vessie | Sein | Rein | Prostate | Pancréas |
|----------------|-------|--------|----------------|----------------|------|----------|----------|
| FARP1 | 1,15 | 1,78 | 1,23 | 5,73 ** | 0,97 | 1,33 | 9,05 |
| ARHGEF1 | 1,54 | 1,49 | 2,01 ** | 2,45 | 1,46 | 0,98 | 3,31 |

TABLEAU 13. Modulation de l'expression protéique de FARP1 et ARHGEF1 dans les cancers neuroendocrines et non neuroendocrines. Tumeurs neuroendocrines (pancréas, 6 échantillons) et non neuroendocrines (colon, poumons, sein, reins prostate, 30 échantillons de chaque type de tumeurs et vessie, 22 échantillons). Analyse par spectrométrie de masse MRM, test ANOVA, ** $p < 0,01$ et $q < 0,01$ (Caprion).

2.6. Effet de la modulation de FARP1 et ARHGEF1 sur la sécrétion *in vitro*

Par leur capacité à réguler la sécrétion, les voies moléculaires impliquant les GTPases Rho pourraient potentiellement moduler la sécrétion dans les cancers neuroendocrines hypersécrétants. Afin d'étudier l'effet des régulateurs FARP1 et ARHGEF1 sur l'activité sécrétrice, j'ai réalisé des tests de sécrétion dans les cellules PC12 qui surexpriment l'hormone de croissance humaine (hGH) constituant ainsi un marqueur quantifiable de l'activité sécrétrice (FIGURE 50). L'inhibition de l'expression d'ARHGEF1 et de FARP1 par ARN interférence n'induit aucune modification de la sécrétion de la hGH dans les cellules PC12. Ces résultats suggèrent que ces deux régulateurs ne sont pas impliqués dans le contrôle de la sécrétion dans les cellules PC12. Nous pouvons donc en conclure que la diminution de l'expression de FARP1 et ARHGEF1 semble induire respectivement une inhibition de l'activité de Cdc42 et Rac1, de façon indépendante de la régulation du processus de sécrétion.

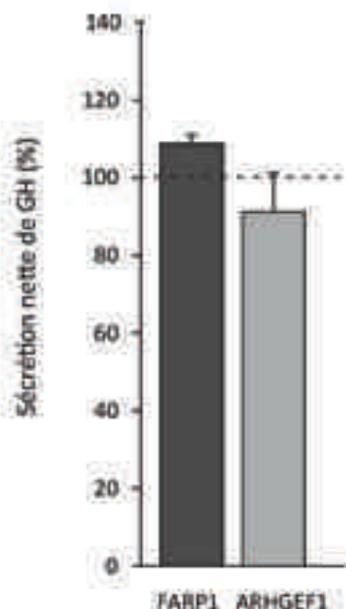


FIGURE 50. Effet de l'inhibition de l'expression par ARN interférence de FARP1 et d'ARHGEF1 sur l'activité sécrétrice des cellules PC12. Histogramme représentant la sécrétion nette de hGH par les cellules PC12. Les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau de sécrétion dans les cellules contrôles transfectées avec un siRNA de séquence aléatoire ne ciblant aucun ARN connu chez le rat. n=3, \pm SEM.

2.7. Conclusion

L'ensemble de ces résultats a permis de démontrer pour la première fois une diminution de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO humains. De façon intéressante, je révèle une modulation dans les PHEO de deux protéines régulatrices des GTPases Rho, FARP1 et ARHGEF1 ainsi qu'une protéine GAP vraisemblablement non fonctionnelle. Les deux

approches d'analyse protéomique utilisées dans cette étude ont permis de révéler des mécanismes probablement différents de régulation de FARP1 et ARHGEF1 dans les PHEO, puisque l'expression de FARP1 est diminuée au niveau global et au sein des fractions subcellulaires cytoplasme et membranes, alors que l'expression d'ARHGEF1 n'est diminuée que dans une seule fraction subcellulaire, le cytoplasme, sans que son niveau global ne varie. Les régulateurs ayant la capacité d'activer les GTPases Rho à la membrane plasmique, la diminution de l'expression de FARP1 au niveau des membranes est en adéquation avec une diminution de l'activation des GTPases Rho. De plus, bien qu'ARHGEF1 n'ait pas été détectée dans les membranes, la diminution de son expression dans le cytoplasme pourrait refléter une diminution de la quantité de la protéine pouvant activer les GTPases Rho. Des études menées dans le but de déterminer la spécificité des régulateurs envers les GTPases Rho ont révélé que FARP1 activerait spécifiquement Cdc42 alors qu'ARHGEF1 serait spécifique de Rac1. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère une corrélation entre l'inhibition de l'activité de Cdc42 et Rac1 et la diminution de l'expression de FARP1 et ARHGEF1 dans les PHEO.

A l'origine, cette étude était menée pour élucider les mécanismes moléculaires responsables de l'hypersécrétion des PHEO. Malheureusement, les données obtenues au cours de ma thèse ne permettent pas de faire un lien entre FARP1, ARHGEF1 et la régulation de la sécrétion dans les cellules PC12, suggérant que la modification de l'expression des régulateurs ne serait pas responsable du dysfonctionnement de la sécrétion des PHEO. Afin de mieux comprendre cette perturbation, il faudra à l'avenir cibler d'autres mécanismes moléculaires susceptibles d'être impliqués dans la modification du processus de sécrétion dans les PHEO. Cependant, l'ensemble de mes données a révélé une modulation de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO, qui a probablement un rôle dans le développement de ces cancers. De façon très intéressante, la modulation de l'expression des régulateurs est une caractéristique des PHEO puisqu'elle ne semble pas être retrouvée dans les tumeurs du pancréas, colon, poumons, vessie, sein, reins ou encore de la prostate.

DISCUSSION

1. APPROCHE MÉTHODOLOGIQUE UTILISÉE

Parmi l'ensemble des quarante PHEO récupérés et analysés dans cette étude (collaboration avec L. Brunaud, chirurgien du centre hospitalier universitaire de Nancy-Brabois), cinq PHEO ont été identifiés comme porteurs d'une mutation dans un gène associé à un syndrome familial (TABLEAU 14). Dans le but d'homogénéiser les données, nous avons volontairement écarté ce petit nombre de PHEO familiaux pour ne garder qu'une cohorte de patients présentant un PHEO sporadique (voir partie Matériel et Méthodes pour la liste complète).

| Numéro | Bénin/Malin | Sporadique/Familial | Mutation identifiées | PGL/PHEO |
|----------|-------------|---------------------|----------------------|----------|
| 04B10794 | Bénin | Familial | NF1 | PHEO |
| 05B01380 | Malin | Familial | SDHB | PHEO |
| 05B05287 | Bénin | Familial | NEM 2a | PHEO |
| 05B05287 | Bénin | Familial | NEM 2a | PHEO |
| 07B00366 | Bénin | Familial | NEM 2a | PHEO |

TABLEAU 14. Liste des cinq PHEO familiaux répertoriés dans l'ensemble des échantillons de PHEO dont nous disposons dans cette étude.

Si nous prenons en compte l'ensemble des PHEO que nous avons récupérés, 12,5% sont d'origine familiale, proportion en adéquation avec la classique «règle des 10» qui considère que 10% des PHEO sont déterminés génétiquement. Or, les données actuelles de la génétique des PHEO rapportent une proportion beaucoup plus importante de PHEO familiaux. En effet, il est admis aujourd'hui que 30% des PHEO sont héréditaires, caractérisés par une mutation germinale dans un des douze gènes de prédisposition connus à l'heure actuelle (voir TABLEAU 5). En considérant ces informations, je suis convaincue qu'il faut rester extrêmement vigilant quant à l'utilisation du terme « PHEO sporadique ». En effet, parmi les trente-cinq patients sélectionnés atteints d'une forme présumée sporadique, seulement onze ont reçu un dépistage génétique concernant les gènes RET, VHL, NF1 et les sous-unités B, C et D de la SDH. De plus, les gènes de prédisposition découverts récemment, tels que MAX, TMEM127, HIF2A ou encore H-RAS n'étaient pas encore testés à l'époque de l'exérèse des PHEO dont je dispose. Par conséquent, nous ne pouvons évidemment pas exclure la

présence potentielle de PHEO familiaux parmi la cohorte de patients regroupés sous le terme de « PHEO sporadiques ». Cependant, nous avons dû faire un choix face à cette liste hétérogène de PHEO. Par souci d'homogénéisation des données, nous limitons considérablement le nombre de PHEO familiaux dans nos échantillons en écartant les cinq patients présentant une mutation génétique.

Notons qu'en plus de la proportion de PHEO familiaux déterminés par une mutation germinale, il faut également ajouter les mutations somatiques découvertes chez une petite proportion des patients atteints d'une forme sporadique (environ 15%). A l'heure actuelle, l'origine de plus de 50% des PHEO sporadiques est donc totalement inconnue. La découverte au cours de mon doctorat, de la modulation de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42 dans la cohorte de patients « PHEO sporadiques » pourrait donc contribuer à une meilleure compréhension du développement de ces formes isolées de PHEO. Par conséquent, il serait intéressant de comparer les activités des GTPases Rho et les variations d'expression des régulateurs de ces protéines entre le groupe « PHEO sporadiques » et le groupe « PHEO familiaux » afin de vérifier si la modulation de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42 est aussi retrouvée dans les formes familiales. Malheureusement, le nombre de PHEO familiaux dans cette étude étant trop faible, il m'a été impossible de réaliser des analyses significatives sur ce groupe de PHEO. Enfin, en espérant à l'avenir obtenir un plus grand nombre de PHEO familiaux, nous pourrions également envisager une distinction entre les PHEO du cluster 1 et les PHEO du cluster 2. Cependant, il est nécessaire de pouvoir classifier de manière précise les différentes formes de PHEO, notamment les PHEO héréditaires et les PHEO sporadiques, mais aussi les différentes formes sporadiques (associées ou non à une mutation somatique) pour pouvoir envisager une corrélation potentielle entre les différents types de PHEO et la modulation de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42. Pour cela, il sera indispensable d'avoir accès à la cartographie des mutations génétiques de chaque patient.

2. INHIBITION DE L'ACTIVITE DE RAC1 ET CDC42 DANS LES PHEO

2.1. Modulation de l'activité de Rac1 et Cdc42 par FARP1 et ARHGEF1

2.1.1. Peut-il y avoir une fraction subcellulaire qui surexprime ARHGEF1 ?

L'étude de la voie de signalisation des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42 dans les PHEO humains a permis de révéler une modulation de l'expression de deux facteurs d'échange, ARHGEF1 et FARP1. L'expression de FARP1, diminuée dans les deux fractions subcellulaires est corrélée avec une diminution de son niveau d'expression à un niveau global. De plus, l'analyse par PCR quantitative révèle une quantité moindre de l'ARNm de FARP1 dans les PHEO, suggérant une activité transcriptionnelle altérée du gène codant pour FARP1. Ainsi, un mécanisme d'inhibition de la transcription de FARP1 dans les PHEO humains pourrait conduire à une diminution de son expression à un niveau global.

Si les mécanismes de régulation conduisant à de telles modifications d'expression de FARP1 semblent évidents, les résultats obtenus pour ARHGEF1 soulèvent de nombreuses questions. Il est communément admis, suite à de nombreuses études de la voie de signalisation d'ARHGEF1, que l'activation de la protéine fait intervenir un mécanisme de translocation de la protéine du compartiment cytoplasmique vers le compartiment membranaire (voir **FIGURE 33**). En effet, dans sa forme inactive, ARHGEF1 est présent sous forme d'oligomères dans le cytoplasme. Lorsque les sous-unités $G\alpha_{12/13}$ -GTP du RCPG sont activées, elles induisent la translocation d'ARHGEF1 sous forme de monomères actifs, depuis le cytoplasme jusqu'à la membrane plasmique. Cette translocation stimule alors l'activité d'échange nucléotidique d'ARHGEF1 conduisant à l'activation des protéines Rho (*Siehler, 2009*). Dans notre étude, nous détectons une diminution du niveau d'expression d'ARHGEF1 dans la fraction cytoplasmique et une absence de variation au niveau global. Naturellement, nous nous attendons à détecter une augmentation de son expression dans un autre compartiment subcellulaire. Au vu de la voie de signalisation décrite ci-dessus, il serait confortable de corrélérer la diminution de l'expression d'ARHGEF1 dans le cytoplasme avec une augmentation dans le compartiment membranaire. Mais de façon surprenante, la protéine n'est pas détectée dans la fraction membranes légères. Comment expliquer ce résultat ?

Dans un premier temps, je pense qu'il est important de prendre en considération les limites de la méthode de fractionnement utilisée dans cette étude. Les différents compartiments

subcellulaires présents dans la cellule ont été séparés par une série de centrifugations puis la pureté des différentes fractions obtenues a été vérifiée par l'immunodétection de protéines présentes en abondance dans ces compartiments, telles que l'actine dans le cytoplasme ou la pompe sodium-potassium (NaK ATPase) dans la membrane plasmique. Cette ATPase est dotée de plusieurs segments transmembranaires permettant son ancrage à la membrane plasmique. Lors de l'isolement de la fraction membranes légères, les protéines transmembranaires fortement associées aux membranes ont de très grandes probabilités d'être incorporées dans cette fraction. Mais qu'en est-il des protéines solubles telles que les protéines régulatrices des GTPases Rho ? En effet, ARHGEF1 activé et recruté à la membrane plasmique se lie de façon transitoire aux protéines $G\alpha_{12/13}$ associées à la membrane par un groupement lipidique. ARHGEF1 n'étant pas directement lié à la membrane plasmique, les séries de centrifugations risquent d'induire une rupture de cette liaison fragile entre ARHGEF1 et les protéines $G\alpha_{12/13}$. Ainsi, l'absence de détection d'ARHGEF1 dans la fraction membranes légères pourrait être la conséquence d'une éventuelle perte de matériel. Notons toutefois que contrairement à ARHGEF1, la protéine FARP1 est détectée dans la fraction membranes légères. Cette différence peut venir du fait que les deux protéines GEF possèdent des domaines distincts induisant des propriétés de liaison différentes aux protéines ancrées à la membrane plasmique (voir **FIGURE 34**). Cependant, seulement deux fractions subcellulaires ont été analysées dans cette étude, le cytoplasme et les membranes légères. Il est donc tout à fait probable que l'absence de ARHGEF1 dans la fraction membranaire ne soit pas la conséquence d'un artefact technique, mais que le niveau d'expression d'ARHGEF1 soit augmenté dans une autre fraction subcellulaire. Le protocole de mise en culture des cellules chromaffines humaines (saines et tumorales) ayant été validé par l'équipe, la localisation des régulateurs dans les différents compartiments subcellulaires des cellules de PHEO humains comparée avec celle des cellules saines aurait pu être vérifiée et complétée par immunohistochimie. Malheureusement, aucun des anticorps testés au laboratoire ne permet actuellement de détecter de façon spécifique FARP1 et ARHGEF1 endogènes.

2.1.2. ARHGEF1, spécifique de RhoA ou de Rac1 ?

Afin de pouvoir établir un lien potentiel entre les altérations des protéines GEF et la diminution de l'activité de Rac1 et Cdc42 observées dans les PHEO, j'ai étudié la spécificité des GEF *in vitro* en réalisant des études fonctionnelles dans les cellules PC12. L'approche utilisée consiste à moduler l'expression de ces GEF en inhibant leur expression par ARN interférent, puis à mesurer le niveau d'activité des GTPases Rho dans les cellules PC12 par une méthode ELISA. Notons qu'il aurait été intéressant de surexprimer FARP1 et ARHGEF1 dans les cellules tumorales humaines afin de voir si le niveau d'activité de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO pouvait être restauré. Cependant, nous avons réalisé plusieurs essais de transfection des cellules de PHEO en culture, sans succès à ce jour.

Les résultats obtenus suggèrent que FARP1 et ARHGEF1 seraient respectivement des GEF spécifiques de Cdc42 et Rac1 dans les PC12. Les données de la littérature révèlent une diversité de la spécificité de FARP1 puisqu'une étude l'identifie comme une GEF de RhoA alors que d'autres indiquent qu'elle active Rac1 ou Cdc42 (*Koyano et al., 2001; Cheadle and Biederer, 2012; Jaiswal et al., 2013*). En revanche, à l'encontre de mes résultats, les données concernant la spécificité d'ARHGEF1 indiquent à l'unanimité qu'ARHGEF1 active spécifiquement RhoA, ainsi que RhoB et RhoC (**TABLEAU 15**). Comment peut-on expliquer cette divergence entre les données de la littérature et les données obtenues dans mon étude ?

Comme l'indique le **TABLEAU 15**, la majorité des études concernant ARHGEF1 ont été menées par des approches *in vitro* de mesure d'échange du GDP/GTP ou par mesure de la fluorescence dans un contexte de surexpression de protéines recombinantes. Par exemple, Jaiswal et collaborateurs utilisent une méthode basée sur la mesure de l'échange d'un analogue fluorescent de nucléotide, le N-méthylanthraniloyl-GTP (mant-GTP) par les GTPases. Après l'ajout de la GEF, l'échange de GDP/GTP peut être mesuré par l'augmentation de la fluorescence du mant-GTP lorsqu'il est lié à la GTPase (*Jaiswal et al., 2011, 2013*). Cette technique constitue l'avantage par rapport à la méthode que j'ai utilisée de proposer un moyen direct de déterminer la spécificité d'une GEF mais nécessite la production de protéines de fusion et ne permet pas l'étude de la protéine endogène.

| Référence | Technique | Modèle cellulaire | Effet sur les GTPases Rho |
|------------------------------|------------------|-----------------------------|---|
| (Hart et al., 1996) | P. recombinantes | NIH3T3 | Activation RhoA mais pas Rac1 et Cdc42 |
| (Glaven et al., 1996a) | P. recombinantes | SF21 | Activation RhoA mais pas Rac1 |
| (Jaiswal et al., 2011, 2013) | P. recombinantes | ? | Activation RhoA, RhoB, RhoC |
| (Chow et al., 2013) | P. recombinantes | HEK 293, HeLa | Activation RhoA |
| (Kher et al., 2014) | P. recombinantes | MCF7, MCF10, MDAMB231 | Activation RhoA |
| (Dubash et al., 2007) | ARN interférent | REFS2 | Inhibition de l'activité de RhoA en co-transfection avec LARG |
| (Guilluy et al., 2010) | ARN interférent | Cellules muscles lisses rat | Inhibition de l'activité de RhoA |

TABLEAU 15. Spécificité d'ARHGEF1 dans la littérature. L'ensemble des données indiquent une spécificité envers RhoA ainsi que RhoB et RhoC. P=protéine.

De façon intéressante, dans un contexte de surexpression, mes résultats sont en adéquation avec les données de la littérature puisque je montre une augmentation de l'activité de RhoA mais pas de Rac1 ni de Cdc42 lorsque ARHGEF1 est surexprimé dans les cellules PC12 (**FIGURE 51**).

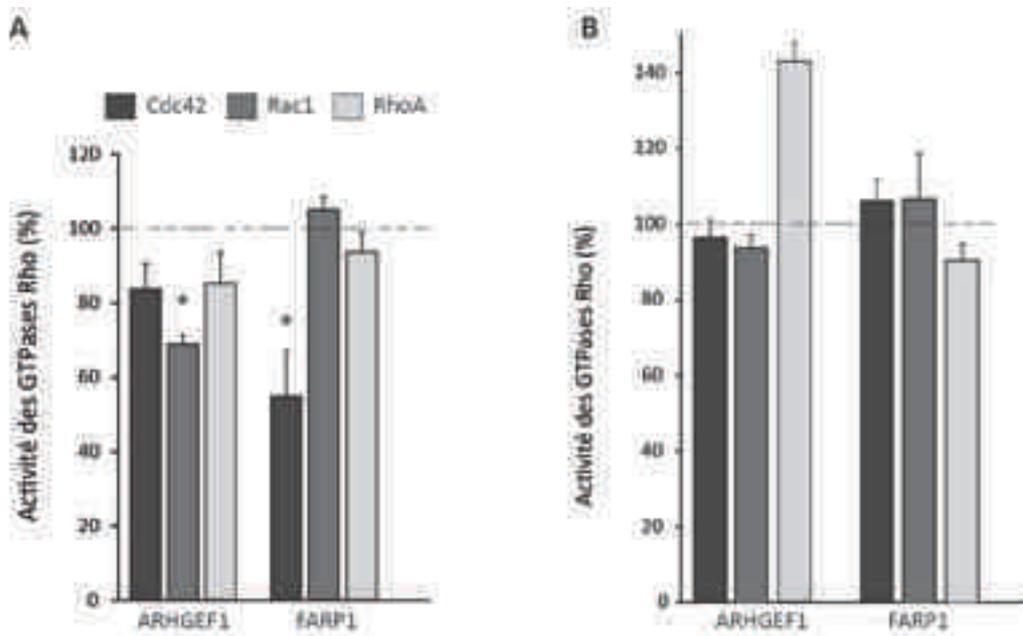


FIGURE 51. Comparaison de l'effet de la surexpression et de l'inhibition de l'expression de FARP1 et d'ARHGEF1 sur l'activité des GTPases Rho in vitro. Niveau d'activité des GTPases dans les cellules PC12 (A) Après extinction de l'expression de FARP1 et ARHGEF1 par ARN interférent (B) Après surexpression de FARP1 et ARHGEF1. Les résultats sont présentés en moyenne de 4 expériences indépendantes, \pm SEM

Les résultats des études d'ARHGEF1 dans un système endogène *via* une extinction de son expression par ARN interférent présentent quelques nuances. En effet, Dubash et collaborateurs ont analysé ARHGEF1 et un autre membre de la famille des RH-RhoGEF, LARG, dans le processus de régulation des fibres de stress médiées par RhoA. Dans cette étude, des fibroblastes sont transfectés par des ARN interférents dirigés contre ARHGEF1 et/ou LARG. Les auteurs n'observent aucune différence dans la formation des fibres de stress médiées par RhoA lorsque l'expression d'ARHGEF1 ou LARG est inhibée individuellement. Par contre, la co-transfection des ARN interférents conduit à une diminution de l'activation de RhoA indiquant qu'ARHGEF1 seul ne peut pas catalyser l'activité d'échange de RhoA (*Dubash et al., 2007*). En revanche, l'inhibition de l'expression d'ARHGEF1 par ARN interférent dans des cellules en culture de muscles lisses aortiques de rat est suffisante pour réduire l'activité de RhoA (*Guilluy et al., 2010*). Ces données suggèrent donc une capacité différente d'ARHGEF1 à catalyser la réaction d'échange de RhoA selon les modèles cellulaires utilisés.

L'inhibition de l'expression d'ARHGEF1 sur l'activité de Rac1 n'a jamais été étudiée dans un système endogène puisque seule l'activité de RhoA a été analysée dans ces deux études. Ainsi, il est tout à fait plausible que dans les cellules PC12, l'extinction d'ARHGEF1 seul n'induit aucune altération de l'activité de RhoA comme dans l'étude de Dubash et coll, mais conduise à une diminution de l'activité de Rac1. En revanche, je montre qu'ARHGEF1 devient capable d'activer RhoA dans une situation de surexpression. Cependant, je suis convaincue que les modifications observées en absence de la protéine endogène sont plus fiables que lors de la surexpression de la protéine exogène qui peut conduire à l'activation de voies de signalisation non spécifiques de la protéine. En conclusion, il est vraisemblable qu'ARHGEF1 soit spécifique de Rac1 dans les cellules PC12 et que les résultats que nous observons avec la surexpression de la protéine exogène constituent des artéfacts dus à la surexpression de la protéine.

2.1.3. Quel lien entre FARP1/ARHGEF1 et les GTPases Rho dans les PHEO ?

L'étude de l'activité des GTPases Rho a mis en évidence une inhibition de l'activité de Rac1 et de Cdc42 dans les PHEO. FARP1 étant spécifique de Cdc42 *in vitro*, nous pouvons supposer que la diminution de l'activité de Cdc42 observée dans les PHEO peut être la

conséquence de la diminution de l'expression de FARP1. En revanche, la situation est moins évidente concernant le lien entre ARHGEF1 et Rac1 puisque deux hypothèses permettent d'expliquer la diminution de son expression dans le cytoplasme. Comme je l'ai décrit précédemment, il est possible que ARHGEF1 soit relocalisée à la membrane plasmique mais qu'elle n'ait pas été détectée dans notre étude, ou que la protéine soit séquestrée dans un autre compartiment subcellulaire non analysé.

Selon la voie de signalisation d'ARHGEF1 décrite dans la littérature, sa relocalisation à la membrane plasmique conduit à une augmentation de la forme active d'ARHGEF1 à la membrane plasmique. Si nous considérons qu'ARHGEF1 est spécifique de Rac1, l'augmentation de sa forme active à la membrane conduirait à une augmentation de l'activité de cette dernière. Or, nous observons une diminution de l'activité de Rac1 dans les PHEO. Le parallèle avec les données chez l'humain nécessiterait alors de proposer des phénomènes de mutations afin d'expliquer la diminution de l'état activé de Rac1 malgré une augmentation d'ARHGEF1 à la membrane plasmique. Des mutations inactivatrices des protéines Rho ayant déjà été reportées, il n'est pas aberrant d'imaginer de telles mutations de Rac1 (*Sakata-Yanagimoto et al., 2014; Yoo et al., 2014*). De plus, une mutation induisant une diminution de la capacité d'ARHGEF1 à catalyser l'échange nucléotidique de Rac1 est également possible, de la même façon que Chow et collaborateurs montrent qu'ARHGEF1 présentant une mutation de la sérine 330 est moins compétente pour catalyser l'échange nucléotidique de RhoA (*Chow et al., 2013*). Afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse, il me semble indispensable de séquencer ARHGEF1 et Rac1 dans les tissus de PHEO en comparaison avec le tissu sain dans le but de pouvoir déceler des éventuelles mutations dans ces protéines.

Si toutefois des phénomènes de mutation sont envisageables, l'hypothèse de séquestration d'ARHGEF1 dans un autre compartiment subcellulaire est plus directe et plus plausible. En effet, la séquestration de la protéine dans un compartiment autre que la membrane plasmique serait corrélée avec une diminution de l'expression de la protéine dans le cytoplasme, ce qui conduit à une diminution de la quantité d'ARHGEF1 pouvant être recruté à la membrane plasmique. Cette hypothèse permettrait ainsi d'expliquer le lien entre la diminution de l'expression d'ARHGEF1 dans le cytoplasme et la diminution d'activité de Rac1 observée dans les PHEO.

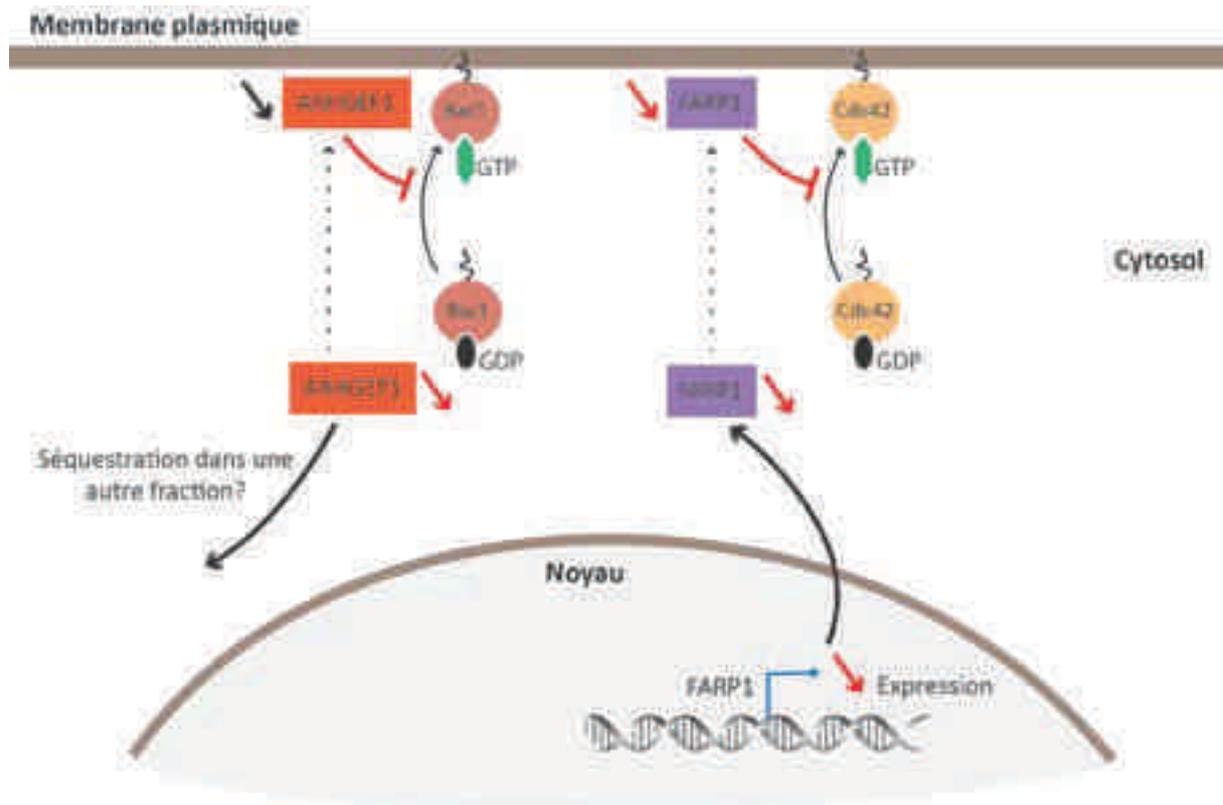


FIGURE 52. Modèle de la voie de signalisation d'ARHGEF1 et FARP1 modulée dans les PHEO.

Actuellement, la majorité des études a révélé des variations du niveau d'expression des GTPases Rho dans les tumeurs humaines en s'intéressant rarement à leur niveau d'activité. Aucune variation de l'expression de Cdc42 ni de Rac1 n'a été mise en évidence dans notre étude. Par contre, une augmentation de l'expression de RhoA est observée dans les PHEO, mais nous ne mesurons aucune modification de son activité. L'effet biologique des GTPases Rho étant déterminé par leur cycle d'activation et de désactivation, ce résultat met en exergue l'importance de mesurer le niveau d'activité des GTPases Rho en plus de mesurer leur niveau d'expression dans les tumeurs humaines.

Néanmoins, il peut être intéressant d'approfondir l'origine et les conséquences de l'augmentation d'expression de RhoA. Des mesures du niveau d'expression des ARNm par analyse qPCR dans les échantillons de PHEO permettraient de vérifier si l'augmentation d'expression de RhoA est la conséquence d'une modification transcriptionnelle du gène codant pour RhoA suite à des altérations oncogéniques. Cependant, cette modification peut aussi refléter un changement direct du niveau d'expression protéique de RhoA, par un mécanisme d'échappement à la dégradation. Nous pourrions étudier l'hypothèse d'une

éventuelle contribution des régulateurs des GTPases Rho dans la voie du protéasome. Pour cela, il faudrait mesurer le niveau total des GTPases en plus de mesurer le niveau d'activité des GTPases après inhibition de l'expression des régulateurs dans les cellules PC12, en séparant le lysat en deux fractions. L'une nous donnant accès au niveau d'activité de la GTPase dans notre échantillon, et dans l'autre, l'ajout de GTP non hydrolysable nous donnera accès à la quantité totale des GTPase Rho dans l'échantillon. De plus, nous ne pouvons pas exclure une interconnection entre les voies de signalisation des GTPases Rho. La méthode utilisée pour déterminer la spécificité des régulateurs n'étant pas directe, nous pouvons envisager qu'une augmentation de l'expression de RhoA dépendante d'une inhibition de l'expression des régulateurs puisse induire une diminution de l'activité de Rac1 ou de Cdc42.

2.2. Rôles de la diminution de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO

Actuellement, nous ne disposons pas d'une grande quantité de données concernant les mutations des GTPases Rho dans les tumeurs humaines. Cependant, de plus en plus de mutations dans les GTPases Rho sont détectées et il s'avère que toutes n'ont pas les mêmes conséquences sur l'état d'activation des GTPases. Si certaines mutations de Rac1 et Cdc42 observées dans des tumeurs humaines semblent conférer une conformation active des protéines, la mutation de RhoA retrouvée dans les lymphomes à cellules T conduit à la génération d'un mutant inactif (Hodis *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2012; Sakata-Yanagimoto *et al.*, 2014; Yoo *et al.*, 2014). Ces données indiquent que le rôle des GTPases Rho dans la progression tumorale peut être la conséquence d'une inhibition de leur activation.

De plus, plusieurs études *in vitro* et *in vivo* montrent que ce n'est pas toujours la forme active de Rac1 et Cdc42 qui est impliquée dans le processus tumoral. Ainsi, en 2001, l'équipe de O'Brien a montré que le dominant négatif de Rac1 conduit à une perte de la polarité *in vitro*, phénomène impliqué dans l'invasion tumorale (O'Brien *et al.*, 2001). A l'inverse, un mutant constitutivement actif de Rac1 inhibe la migration cellulaire en favorisant les adhésions cellulaires, suggérant ainsi un rôle anti-tumoral de la forme active de Rac1 (Engers *et al.*, 2001). De plus, des souris n'exprimant pas Tiam1, la protéine GEF de Rac1, et par conséquent Rac1 dans sa forme inactive, développent moins de tumeurs mais les tumeurs

formées sont plus agressives (*Malliri et al., 2002*). Ainsi, si l'activation de Rac1 semble être impliquée dans l'initiation tumorale *via* un effet sur la survie et la prolifération cellulaire, l'inactivation de Rac1 jouerait un rôle dans le processus d'invasion tumorale *via* un effet sur les adhésions cellulaires. Enfin, une étude a montré que des souris invalidées pour Cdc42 spécifiquement dans les cellules hépatiques développent spontanément des cancers du foie, suggérant un rôle de l'inactivation de Cdc42 dans l'initiation de ce type de tumeurs (*van Hengel et al., 2008*). Le parallèle avec ces données et les mécanismes de tumorigénèse des PHEO est intéressant, puisque l'inactivation de Cdc42 pourrait favoriser l'initiation des PHEO d'origine sporadique, alors que l'inactivation de Rac1 serait impliquée dans les phases plus tardives de leur développement.

ARHGEF1 a été découvert à l'origine pour ses propriétés transformantes (*Whitehead et al., 1996*) et il est actuellement reconnu que cette protéine possède des caractéristiques oncogéniques. Si des études attribuent un rôle de l'augmentation de l'expression d'ARHGEF1 dans le développement des cancers de la prostate et des cancers gastriques (*Huang et al., 2011; Li et al., 2013*), d'autres ont montré que ce régulateur détient des propriétés de régulation de l'épithélium en agissant comme une protéine suppresseur de tumeur. En effet, la perte d'ARHGEF1 conduit à une diminution des jonctions adhérentes ce qui augmente le processus d'invasion (*Kher et al., 2014*). Ainsi, ce rôle suppresseur de tumeur d'ARHGEF1 pourrait avoir un lien avec l'inactivation de Rac1 dans la tumorigénèse des PHEO. En effet, la diminution de l'activité de Rac1 étant également impliquée dans la perte des jonctions cellulaires, ces données permettent d'envisager un lien entre la diminution de l'expression d'ARHGEF1 dans les PHEO, l'inhibition de l'activité de Rac1 qui s'ensuit et le processus d'invasion tumorale.

Contrairement à ARHGEF1, très peu de données sont disponibles concernant le rôle de FARP1 dans la tumorigénèse. Une seule étude lui attribue des propriétés transformantes dans les fibroblastes en culture. En effet, les auteurs montrent que la surexpression de FARP1 conduit à la formation de points focaux (*Koyano et al., 2001*). Son action sur le remodelage de l'actine pourrait impliquer FARP1 dans la protrusion cellulaire et la migration des cellules tumorales. Cependant, trop peu de données sont disponibles à l'heure actuelle pour déterminer si une diminution de l'expression de FARP1 pourrait être impliquée dans le développement tumoral.

Pour préciser l'effet de la diminution de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42 dans le développement des PHEO, il faudrait compléter l'étude avec des expériences *in vitro* de l'extinction de l'expression des GTPases Rho ou de FARP1 et ARHGEF1 dans des cellules chromaffines. Des analyses des propriétés tumorales, telles que la mesure de la capacité des cellules à proliférer en absence d'adhérence, de la capacité d'invasion par des tests de migration ainsi que l'étude de la morphologie des cellules, nous apporteraient des informations quant au rôle de la diminution de la voie de signalisation de Cdc42 et de Rac1. Pour finir, il serait judicieux d'élargir l'étude à d'autres GTPases dans les PHEO par rapport au tissu sain afin d'avoir une vision complète de la possible altération de l'activité des GTPases Rho dans les PHEO. Par exemple, il serait intéressant de voir si RhoB, identifiée comme protéine suppresseur de tumeur, présente une altération de son activité dans les PHEO.

2.3. Quel(s) rôle(s) pour ARHGAP36 ?

Dans mon étude, je montre une augmentation drastique de l'expression d'ARHGAP36 dans les PHEO, protéine GAP qui semble être non fonctionnelle. ARHGAP36 est une protéine encore très peu étudiée à l'heure actuelle. Cependant, une étude récente l'a identifiée comme actrice potentielle dans la tumorigénèse. En effet, ARHGAP36 est surexprimée dans les médulloblastomes et elle semble avoir les capacités de réguler la voie de signalisation Hedgehog *in vitro* et *in vivo*, dont l'activation incontrôlée conduit à de nombreux cancers (Teglund and Toftgård, 2010; Rack et al., 2014). Les médulloblastomes ayant la même origine embryologique que les PHEO, il serait intéressant d'étudier cette voie de signalisation pour analyser de quelle manière ARHGAP36 peut être impliqué dans la tumorigénèse des PHEO.

Un parallèle avec les données de la littérature nous amène à envisager un autre rôle possible pour ARHGAP36. En effet, il a été montré que la protéine OCRL, qui possède un résidu glutamine à la place du résidu arginine dans son domaine GAP, fonctionne comme un effecteur des GTPases Rho (Erdmann et al., 2007; Pirruccello et al., 2011). De même, la protéine IQGAP1, une RasGAP dont le résidu arginine du domaine GAP est remplacé par un résidu thréonine agirait comme une protéine effectrice de Cdc42 et Rac (Kurella et al., 2009). Si nous émettons l'hypothèse qu'ARHGAP36 n'est pas une GAP fonctionnelle, nous pouvons

imaginer que le résidu thréonine d'ARHGAP36 lui confère un rôle effecteur de Cdc42 et de Rac1. L'augmentation du niveau d'expression d'ARHGAP36 semble être la conséquence d'une activité transcriptionnelle plus importante du gène codant pour ARHGAP36 puisque l'analyse par PCR quantitative révèle une quantité accrue de l'ARNm d'ARHGAP36 dans les PHEO. Les niveaux d'activité de Rac1 et Cdc42 étant diminués dans les PHEO, nous pouvons imaginer un phénomène de compensation conduisant à l'augmentation de la transcription des gènes codant pour les protéines effectrices de Rac1 et Cdc42 (dans notre cas ARHGAP36) et permettant ainsi à la cellule de conserver la réponse biologique liée à la voie de signalisation de ces deux GTPases Rho. Il est d'ailleurs intéressant de souligner que les effecteurs des GTPases Rho détectés dans le crible protéomique présentent en majorité une augmentation de leur niveau d'expression dans les PHEO par rapport au tissu sain. En effet, mise à part INF2 (Inverted Formin 2) dont le niveau d'expression est diminué, les protéines Diaphanous-2 ainsi que PAK1 et PAK3 ont leur niveau d'expression augmenté dans les PHEO. Enfin, pour vérifier l'hypothèse du rôle d'ARHGAP36 en tant qu'effecteur des GTPases Rho, il faudrait s'intéresser à l'effet de l'extinction de l'expression d'ARHGAP36 sur les effets biologiques majeurs médiés par ces deux GTPases, tels que la formation de filopodes par Cdc42 et la formation de replis membranaires et de lamellipodes par Rac1.

2.4. GTPases Rho, régulateurs et sécrétion : quel lien potentiel ?

Les données antérieures de l'équipe ont largement contribué à démontrer le rôle de Rac1 et Cdc42 dans la régulation de l'exocytose dans les cellules chromaffines. En effet, Cdc42 activé par la GEF Intersectine-1L induit la formation de filaments d'actine et favorise ainsi la sécrétion régulée dans les cellules PC12. De même, l'activation de Rac1 par sa RhoGEF β Pix conduit à la stimulation de la phospholipase D et favorise le processus d'exocytose (*Malacombe et al., 2006b; Momboisse et al., 2009a*).

Mes données révèlent une diminution de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO, suggérant une altération de l'activité sécrétrice des cellules. Cependant, la mesure de l'activité des GTPases Rho dans les tissus de PHEO humains correspond à une mesure globale, qui peut difficilement révéler les phénomènes transitoires d'activation et de désactivation des GTPases Rho mis en jeu dans le processus de sécrétion. En effet, les études précédentes de l'équipe menées dans les PC12 reflètent des mesures de l'activation de

Cdc42 et Rac1 suite à une stimulation de dix minutes par un sécrétagogue. Ainsi, afin de vérifier si l'activité des GTPases Rho peut être modulée de façon transitoire dans les PHEO et établir un lien avec le processus de sécrétion, il serait intéressant de comparer leur niveau d'activité dans des cellules tumorales humaines mises en culture, au repos et après stimulation par un sécrétagogue.

De plus, le lien entre l'inhibition de l'activité de Rac1/Cdc42 dans les PHEO et une altération potentielle du processus de sécrétion a été compromis par nos données *in vitro*. En effet, nous montrons que l'inhibition de l'expression de FARP1 et d'ARHGEF1 conduit à une diminution de l'activité de Cdc42 et de Rac1, respectivement. Or, il s'avère que l'extinction de l'expression de FARP1 et ARHGEF1 n'induit aucune modification de l'activité sécrétrice des cellules PC12. Il apparaît donc que les voies de signalisation de Cdc42 et Rac1 médiées par FARP1 et ARHGEF1 ne seraient pas impliquées dans la régulation de la sécrétion des PC12. Cependant, l'étude du rôle de FARP1 et ARHGEF1 dans le contrôle de la sécrétion a été réalisée dans la lignée cellulaire PC12 dérivant d'un PHEO de rat et je pense qu'il serait plus juste de se placer dans un modèle cellulaire sain, comme par exemple des cellules chromaffines de souris. Enfin, pour étudier directement l'implication de ces régulateurs dans le processus de sécrétion des PHEO, nous pourrions mesurer par ampérométrie à fibre de carbone l'éventuelle restauration de la quantité de catécholamine sécrétée suite à une surexpression de FARP1 et d'ARHGEF1 dans les cellules de PHEO humaines mises en culture. Cependant, les premiers essais de transfection de cellules de PHEO humaines en culture qui ont été réalisés au laboratoire ne sont actuellement pas convaincants.

Suite aux données obtenues au cours de mon doctorat, si FARP1 et ARHGEF1 ne sont pas impliquées dans le dérèglement de la sécrétion observée dans les PHEO, nous pouvons nous demander quels autres mécanismes moléculaires pourraient être responsables d'un tel dysfonctionnement. L'exploitation du crible protéomique par l'équipe, au-delà de l'étude des régulateurs des GTPases Rho a permis d'identifier une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans les différentes étapes du processus de sécrétion. En effet, une augmentation du niveau d'expression des protéines impliquées dans la fusion est détectée dans les PHEO : les protéines SNARE telles que SNAP25 ou VAMP2/3 ou encore la protéine Rab3A, indiquant une facilitation du processus de fusion dans les PHEO (FIGURE 53). Dans

l'ensemble, ces premiers résultats constituent une piste prometteuse pour expliquer l'hypersécrétion observée dans les PHEO.

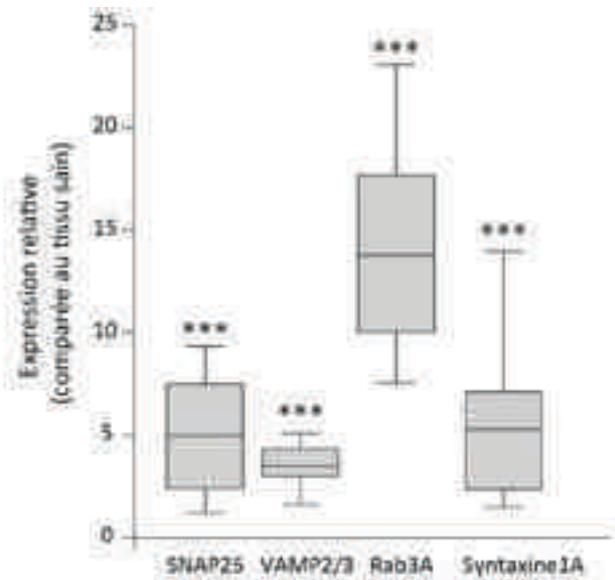


FIGURE 53. Niveau d'expression relatif des protéines impliquées dans la sécrétion régulée dans la fraction membranes légères des PHEO. Les données correspondent à 6 échantillons. ** $p < 0,01$ et $q < 0,01$; *** $p < 0,001$ et $q < 0,001$, test ANOVA.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de préciser les mécanismes mis en jeu dans le développement des PHEO. Pour la première fois, je mets en évidence l'importance de la sécrétion dans le développement des tumeurs dérivant des PC12, en proposant une corrélation directe entre la sécrétion des cellules et la croissance tumorale. En association avec les données de l'équipe qui démontrent que l'hypersécrétion des PHEO n'est pas la conséquence d'un effet de masse mais bien d'une augmentation de la sécrétion à un niveau cellulaire, mes résultats suggèrent que l'augmentation de la sécrétion dans les PHEO pourrait contribuer à leur développement. Si ce projet a permis de lever le voile sur l'importance de la sécrétion dans le développement des PHEO, l'origine de l'hypersécrétion reste encore méconnue. Cependant, les données de l'équipe proposent des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la dérégulation de la sécrétion dans ce type de cancers. Ainsi, grâce à l'ensemble des recherches futures de l'équipe, ce projet pourra permettre à terme d'élucider les bases moléculaires responsables de l'hypersécrétion conduisant au développement des PHEO.

L'étude des GTPases Rho a permis de mettre en lumière une inhibition de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42 dans les PHEO humains. Les résultats obtenus sont très prometteurs puisque la démonstration de la diminution de l'activité de Rac1 et Cdc42 dans une tumeur humaine est inédite. L'ensemble des données obtenues au cours de mon doctorat ont permis d'établir un lien potentiel entre l'inhibition de l'activité de Cdc42 et de Rac1 et la modulation de deux régulateurs des GTPases Rho, FARP1 et ARHGEF1 dans les PHEO humains. L'inhibition de la voie de signalisation de Rac1 et Cdc42 a vraisemblablement un rôle primordial dans le développement de ces cancers puisque l'inactivation de Cdc42 et de Rac1 ont déjà été corrélées à la survenue spontanée de cancer et à l'invasion tumorale *in vivo*, respectivement. De façon très intéressante, la diminution d'expression de FARP1 et ARHGEF1 semble être une caractéristique des PHEO. Ainsi, mes résultats pourraient constituer une « pierre à l'édifice » en contribuant à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués spécifiquement dans la tumorigénèse des PHEO.

1. MATERIEL UTILISÉ

1.1. Outils de biologie moléculaire

1.1.1. Plasmides

Les plasmides codant pour les protéines FARP1 et ARHGEF1 ont été décrits précédemment (Guilluy *et al.*, 2010; Cheadle and Biederer, 2012). La construction codant pour la séquence murine de FARP1 (pCAGGS GFP-FARP1) a été fournie par T. Biederer (Yale University, USA). Le plasmide contenant la séquence codant pour la protéine humaine ARHGEF1 (pCEFL-AU1-p115) a été fourni par G. Loirand (Université de Nantes, France).

1.1.1.1. Transformation et culture bactérienne

Environ 100 ng de plasmide sont ajoutés à 50 µl de bactéries *Escherichia Coli* (souche DH5α). Après une incubation de 20 minutes sur glace, l'entrée du plasmide est provoquée par un choc thermique (45 secondes à 42°C puis 2 minutes dans la glace). Les bactéries sont alors incubées dans 1 ml de milieu de culture LB à 37 °C pendant 1 heure, puis étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB solide et l'antibiotique nécessaire à la sélection des clones. Les plasmides contiennent un gène de résistance à un antibiotique (en général ampicilline ou kanamycine) et seules les bactéries ayant incorporé le plasmide survivront. La culture bactérienne est réalisée à 37°C pendant au moins 12 heures.

1.1.1.2. Purification de plasmides recombinants : maxi préparation d'ADN

La purification des plasmides recombinants est réalisée grâce à un kit de purification (Qiagen). Une colonie isolée de bactéries contenant le plasmide à amplifier est utilisée pour inoculer 2 à 5 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié (ampicilline : 100 µg/ml ; kanamycine : 30 µg/ml). Après incubation pendant environ 8 heures à 37°C sous agitation (250 rpm), la pré-culture est diluée dans 200 ml de milieu LB contenant l'antibiotique. Cette suspension bactérienne est incubée pendant 12 à 16 heures sous agitation. Après 15 minutes de centrifugation à 5000 rpm à 4°C (Sorvall, SLA 1500), le culot bactérien est repris dans 10 ml de tampon de P1, les bactéries sont ensuite lysées dans 10 ml de tampon P2.

L'ADN génomique et les protéines sont précipités par addition de 10 ml d'un tampon P3 à 4°C pendant 20 minutes. Le lysat obtenu est centrifugé à 13 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C (Sorvall, SA 600). Le surnageant est déposé sur une colonne de résine échangeuse d'anions équilibrée avec 10 ml de tampon QBT, puis la colonne est lavée deux fois avec 30 ml de tampon QC. Le plasmide est élué dans 15 ml de tampon QF puis précipité avec 10,5 ml d'isopropanol et centrifugé à 11000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'ADN plasmidique est ensuite lavé avec 5 ml d'éthanol à 70% et re-centrifugé 10 minutes à 10000 rpm. A l'issue de cette centrifugation, le culot d'ADN est séché à l'air puis re-suspendu dans un volume adéquat d'eau stérile (300 à 500 µl selon la taille du culot). La densité optique de l'échantillon est mesurée (à 260 et 280 nm) afin de déterminer la concentration et la pureté du plasmide. Si le rapport A260/280 est supérieur ou égal à 1,7 et que la concentration est d'au moins 1 µg/µl, nous estimons que le plasmide est utilisable pour une transfection.

1.1.2. ARN interférents

Des ARN interférents (ARNi) ont été établis à partir de la séquence des gènes cibles ARHGEF1 et FARP1 et fournis sous forme de mélange de quatre duplexes (Dharmacon, *Thermo Scientific*). Les ARNi sont suspendus dans un tampon à une concentration de 100µM et stockés à -80°C. Notez qu'une séquence aléatoire d'ARNi ne ciblant aucun ARN connu chez le rat est utilisée en contrôle de chaque expérience.

Séquence des ARNi dirigés contre ARHGEF1 et FARP1

| | |
|-------------|---------------------------------|
| Rat ARHGEF1 | 5' GAA GUG GUC AUC AAA CAA C 3' |
| Rat FARP1 | 5' CAU CAA GAG UGC CAA ACG A 3' |

1.2. Lignées cellulaires

1.2.1. Culture

La lignée cellulaire PC12 et leurs clones dérivés (C-27, A35C, C-27^{CgA+}, A35C^{CgA+} et les PC12^{CgA}) sont cultivées dans un milieu DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, *Sigma D5796*) contenant 4,5 g/l de glucose et 30 mM de NaHCO₃. Le milieu est complété avec 5% de sérum foetal bovin, 10% de serum de cheval et 1% d'un mélange d'antibiotique (pénicilline (100U/ml) et Streptomycine (100µg/ml)). La culture est réalisée dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre, et les cellules sont passées en moyenne une fois par semaine. Le jour du passage, le décollement des cellules du support plastique est réalisé *via* l'incubation avec de

la trypsine (*Gibco*). Après ajout de milieu complet afin d'inactiver la trypsine, la suspension cellulaire est centrifugée (800 rpm, 5 minutes), le surnageant est aspiré et le culot est suspendu dans le milieu complet. Toutes les cultures se font à 37°C sous atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

1.2.2. Transfection des cellules par agent lipidique

La veille de la transfection, les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits dans 500µl du milieu complet, de manière à ce qu'elles atteignent 70-90% de confluence dans le cas d'une transfection avec de l'ADN et 60-80% de confluence dans le cas d'une transfection avec des ARNi. Une heure avant la transfection, le milieu est remplacé par du milieu Opti-MEM appauvri en sérum (*Gibco*). Pour chaque transfection, les acides nucléiques (ADN ou ARNi) sont complexés avec un agent lipidique, la lipofectamine (*Invitrogen*). Les acides nucléiques et la lipofectamine sont dilués séparément dans la solution d'opti-MEM de la manière suivante. Pour une transfection avec un plasmide, 0,8µg d'ADN par puits et 2µl de lipofectamine (*Lipofectamine2000*) sont dilués séparément dans 50µl d'Opti-MEM. Pour une transfection avec des ARNi, 4µl d'ARN de concentration 10µM par puits (concentration finale de 80nM par puits) et 4µl de lipofectamine (*Lipofectamine RNAimax*) sont dilués séparément dans 25µl d'Opti-MEM. Les deux solutions sont ensuite mélangées et après une incubation de 5 minutes, la solution contenant le complexe acide nucléique-lipofectamine est ajouté aux cellules. Les cellules sont placées dans l'étuve à 37°C puis le milieu est remplacé par du milieu complet 4 à 6 heures après la transfection. Les expériences sont effectuées 48h après la transfection.

1.2.3. Etablissement des lignées cellulaires CgA⁺ et CgA⁻ stables

1.2.3.1. Infection virale des clones C-27 et A35C

Une construction lentivirale de la CgA humaine a été utilisée (*AMSBIO*). La séquence codante de la CgA humaine a été clonée dans un vecteur lentiviral sous l'expression d'un promoteur suCMV contenant un marqueur puromycine. Un lentivirus contrôle a aussi été généré, par clonage d'une séquence nulle dans le même vecteur. Les cellules sontensemencées à une concentration de 3000 cellules/puits dans une plaque 96 puits. 24h après l'ensemencement, les cellules sont traitées pendant 2 heures au polybrène (8µg/ml). Le milieu de

pré-traitement au polybrène est aspiré et les cellules sont incubées avec le mélange d'infection pendant 4 à 5 heures : 12µl de lentivirus ; 87µl de milieu complet de culture ; 1µl polybrène à 1mg/ml. 24h après l'infection, de la puromycine (4µg/ml) est ajouté dans les puits afin de sélectionner uniquement les clones infectés. Notons que les lignées stables ainsi générées sont cultivées en présence de 2µg/ml de puromycine.

1.2.3.2. Infection virale des cellules PC12 sauvages

Partie réalisée par l'équipe «Génomique Fonctionnelle et Physiopathologie Neuroendocrine» de l'Unité INSERM 982 à Rouen. Des vecteurs lentiviraux VIRHD-bla exprimant un ShRNA dirigé contre la CgA et possédant un gène de résistance à la blasticidine ont été utilisés. Les cellules sontensemencées dans un flasque 25 cm³ à 60-80% de confluence. 24h après l'infection avec les lentivirus, de la blasticidine (1µg/ml) est ajouté dans les puits afin de sélectionner uniquement les clones infectés.

Séquence des ShRNA dirigés contre la CgA

ShRNA⁽¹⁾

5' AATTCGAAAAACAGGCAGCTTTCTAGAAGTTTTCTTGA AAAACTTCTAGAAAGCTGCCTGCG 3'

ShRNA⁽²⁾

5' AATTCGAAAAAGATGAACTCTCGGAAGTATTTTCTTGA AAAATACTTCCGAGAGTTCATCCG 3'

1.3. Echantillons de PHEO humains

Les échantillons de PHEO humains sont récupérés en sortie de bloc opératoire après exérèse réalisée par le Pr. L. Brunaud, chirurgien du centre hospitalier universitaire de Nancy-Brabois. Du tissu péri-tumoral chez le même patient est prélevé en dehors de la zone tumorale. Les échantillons sont ensuite directement congelés dans de l'azote liquide. Le tableau ci-dessous regroupe les données de chaque PHEO (bénin ou malin ; sporadique ou familial ; PGL ou PHEO ; les tests génétiques effectués ; et les analyses menées sur les échantillons de PHEO). Notons que sur la totalité des échantillons récupérés, les cinq PHEO surlignés en gris dans le tableau présentent une mutation dans un gène associé à un syndrome familial. Par soucis d'homogénéisation des données, ces PHEO familiaux ont été retirés des analyses.

| Numéro | B/M | Spo/Fam | Mutation | PGL/pheo | mutations négatives | Analyse |
|----------|-----|---------|----------|-------------|---------------------|----------------|
| 04B10794 | B | Fam | NF1 | Phéo | / | Rho, spectro |
| 05B00672 | B | Spo | / | Phéo | RET, SDH, VHL, NF1 | Rho |
| 05B01380 | M | Fam | SDHB | Phéo | / | Spectro |
| 05B03227 | B | Spo | / | Phéo | / | qPCR |
| 05B05287 | B | Fam | NEM 2a | Phéo | / | MRM |
| 05B05287 | B | Fam | NEM 2a | Phéo | / | qPCR |
| 06B00692 | B | Spo | / | Phéo | / | Rho, MRM, qPCR |
| 06B00803 | B | Spo | / | Phéo | / | Rho, MRM |
| 06B02257 | B | Spo | / | Phéo | / | Rho, MRM, qPCR |
| 06B03535 | B | Spo | / | Phéo | / | Rho, spectro |
| 06B04350 | B | Spo | / | Phéo (PGL?) | / | Rho, MRM |
| 06B05737 | B | Spo | / | Phéo | / | Rho, MRM |
| 06B07184 | B | Spo | / | Phéo | / | MRM |
| 06B08726 | B | spo | / | Phéo | / | Rho, MRM |
| 07B00366 | B | Fam | NEM 2a | Phéo | / | MRM |
| 07B01792 | B | spo | / | Pheo | RET, VHL, SDH | Rho, MRM |
| 07B06265 | B | spo | / | pheo | / | Rho, MRM |
| 08B00786 | B | spo | / | pheo | / | Rho |
| 08B02342 | B | spo | / | pheo | / | Rho, MRM |
| 08B03781 | B | spo | / | pheo | / | MRM |
| 08B03835 | B | spo | / | phéo | / | Rho |
| 09B02945 | B | spo | / | phéo | / | Rho |
| 09B02979 | B | spo | / | phéo | / | Rho, MRM |
| 09B04722 | B | spo | / | phéo | / | Rho, MRM |
| 09B06922 | B | spo | / | phéo | / | Rho, MRM |
| 09B06984 | B | spo | / | phéo | / | Rho, MRM |
| 10B01136 | B | spo | / | Phéo | / | MRM |
| 10B01153 | B | spo | / | Phéo | RET, VHL, SDH | MRM |
| 10B02044 | B | spo | / | Phéo | SDHB, C, D et VHL | Spectro |
| 10B02300 | B | spo | / | Phéo | SDHB, C, D et VHL | MRM |
| 10B03335 | B | spo | / | Phéo | / | Spectro, qPCR |
| 10B04638 | B | spo | / | Phéo | VHL, SDH | Spectro |
| 10B06228 | B | spo | / | Phéo | / | MRM |
| 10B06284 | B | spo | / | Phéo | RET, VHL, SDH | Spectro |
| 11B03225 | B | spo | / | Phéo | / | MRM |
| 11B06453 | B | spo | / | Phéo | RET, VHL, SDH | MRM |
| 12B03401 | B | spo | / | Phéo | VHL, SDHB, C, D | Spectro |
| 12B05355 | B | spo | / | Phéo | VHL | MRM |
| 12B06972 | B | spo | / | Phéo | / | MRM |
| 13B00011 | B | spo | / | Phéo | VHL, SDHB, C, D | MRM |
| 13B02042 | B | spo | / | Pheo | / | MRM |

2. METHODES ET TECHNIQUES D'ANALYSE

2.1. Quantification par PCR en temps réel (RTqPCR)

La technique de PCR quantitative a été utilisée pour déterminer les niveaux d'expression relatifs de FARP1 et ARHGEF1 dans les tissus humains tumoraux et péri-tumoraux, dans les échantillons murins (lignée PC12 de PHEO de rat et glande médullosurrénale saine de rat) ainsi que pour déterminer le taux d'extinction de l'expression des gènes après transfection des cellules PC12 par les ARNi dirigés contre FARP1 et ARHGEF1.

2.1.1. Préparation des ARNs

A partir des tissus ou des cellules, les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit d'extraction d'ARN « GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit » (*Sigma-Aldrich*). Les échantillons sont lysés et homogénéisés dans un tampon de lyse afin de libérer l'ARN et inactiver les RNases. Les lysats sont déposés dans une colonne de filtration et centrifugés à 14000g pendant 2 minutes pour éliminer les débris cellulaires. Le filtrat est ensuite appliqué sur une colonne de silice permettant de lier l'ARN total, suivi par des étapes de lavages puis une étape finale d'élution. La qualité et la concentration des ARNs sont ensuite estimées au spectrophotomètre (NanoDrop 2000c, *Thermo Scientific*) et par migration des ARNs sur gel d'agarose 1%. Les ARNs extraits sont soumis à un traitement à la DNase I (*ThermoScientific*) afin de supprimer l'ADN génomique des préparations d'ARN. Un mélange de volume final 10µl (contenant 1µg d'ARN ; 1µl de tampon de réaction 10X ; 1µl de DNase I et de l'eau stérile) est réalisé. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, de l'EDTA 5mM est ajouté au mélange et incubé pendant 10 minutes à 65°C. Les échantillons d'ARN ainsi obtenus sont ensuite rétrotranscrits en ADNc en utilisant le kit « Maxima First Strand cDNA Synthesis » (*Thermo Scientific*), dans un volume final de 20 µl (contenant 4µl de Mix de réaction 5X ; 2µl de mélange contenant la reverse Transcriptase ; 10 µl de l'ARN traité à la DNase I ; 4 µl H₂O). Le programme suivant a été utilisé en routine : incubation pendant 10 minutes à 25°C, suivie par 15 minutes à 50°C. La réaction se termine par un chauffage à 85°C pendant 5 minutes.

2.1.2. Réaction de PCR en temps réel

La réaction de PCR en temps réel est réalisée par un thermocycleur MyIQ (*Biorad*) pour plaques 96 puits couplé à une lampe UV et à un spectrophotomètre, piloté par ordinateur grâce au logiciel BioRad IQ5. Une gamme étalon est réalisée, contenant un mélange des ADNc des gènes d'intérêt. Le mélange des réactions de PCR pour un puits et pour un gène donné se compose comme suit : 7,5µl de Syber Green 2X (*BioRad*) ; 7µl d'eau RNase free ; 0,25µl d'amorce sens (30µM) ; 0,25µl d'amorce anti-sens (30µM). 14µl de mélange PCR pour 1µl d'échantillon d'ADNc sont déposés par puits. Chaque échantillon d'ADNc est dilué au préalable (3X), et testé en triple points. Le programme PCR utilisé est le suivant : 36 cycles de 20 secondes à 95°C ; 20 secondes à 62°C ; 20 secondes à 72°C. La spécificité des amorces est contrôlée après analyse des courbes de fusion des produits d'amplification. Le gène de ménage GAPDH (Glyceraldéhyde-3 phosphate deshydrogénase) est systématiquement utilisé pour normaliser les données. Le calcul de la modulation d'ARNm est le suivant (d'après la méthode Haimes et al, Thermo Fischer Scientific, Lafayette, CO, USA) : les données sont normalisées en vue d'obtenir le ΔCq , correspondant aux cycles du gène d'intérêt normalisés par rapport aux cycles du gène de ménage (cycles (gène intérêt)- cycles (GAPDH)). Une transformation exponentielle $2^{-\Delta Cq}$ est réalisée, puis une moyenne des triplicats est effectuée et enfin la déviation standard est calculée.

Séquences des amorces utilisées

| | |
|--------------|-----------------------------|
| Hum ARHGEF1 | 5'-GCCACCGATCACAAAGCCTTC-3' |
| Hum FARP1 | 5'-GCACAGCTCCACGGTACGAT-3' |
| Hum ARHGAP36 | 5'-AGGTTGTTGAGGCTTGCTGC-3' |
| Hum GAPDH | 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3' |
| Rat ARHGEF1 | 5'-GTGGGGACAAGAAGTCAGGG-3' |
| Rat FARP1 | 5'-CCCAACCGACAAGGCATACT-3' |
| Rat GAPDH | 5'-GGCCTCCGTGTTCTACT-3' |

2.2. Mesure de l'activité sécrétrice des cellules *in vitro*

2.2.1. Protocole de stimulation de la sécrétion des cellules *in vitro*

Les cellules sont lavées deux fois avec une solution de Locke Normal puis incubées 5 minutes dans une solution de Locke Normal (condition repos) ou d'une solution Locke dépolarisante contenant 59mM de potassium (condition stimulé).

| Solution Locke normal | Solution Locke 59mM potassium |
|---|--|
| 140 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 2,5 mM CaCl ₂ ; 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,2 mM MgSO ₄ ; 0,001 mM EDTA; 11 mM glucose et 15 mM Hepes pH 7,2. | 86,9 mM NaCl; 59 mM KCl; 2,5 mM CaCl ₂ ; 1,2 mM KH ₂ PO ₄ ; 1,2 mM MgSO ₄ ; EDTA 0,01mM ; 11mM glucose et 15mM HEPES pH 7,4. |

Les surnageants sont récupérés et centrifugés 5 min à 14 000 rpm. Les cellules au fond des puits sont incubées dans du tampon phosphate, puis lysées par 3 cycles de congélation/décongélation à -80°C, et enfin récupérées et centrifugées pendant cinq minutes à 14 000 rpm. L'activité sécrétrice est exprimée en pourcentage du composé sécrété dans le milieu (surnageant) par rapport à la quantité totale produite par les cellules : $\text{Sécrétion} = \frac{\text{composé sécrété}}{\text{composé sécrété} + \text{composé non sécrété}} \times 100$. La sécrétion nette des cellules correspond à la différence entre le pourcentage de sécrétion des cellules ayant subi une stimulation et le pourcentage de sécrétion des cellules non stimulées.

2.2.2. Dosage des catécholamines par méthode ELISA

Après obtention des deux fractions (culot et surnageant) comme décrit ci-dessus, la quantité de catécholamines est dosée à l'aide d'un kit 3-CAT research ELISA (BA E-5600, *Labor Diagnostika Nord*). Pour prévenir l'oxydation des catécholamines, de l'EDTA (1mM) et du sodium bisulfite (4mM) sont ajoutés dans chacune des deux fractions. Ce kit permet de doser de façon simultanée les trois catécholamines : dopamine, adrénaline et noradrénaline. La composition des réactifs du kit n'est pas communiquée par le fournisseur.

Le volume final d'échantillon à déposer dans les puits étant de 500µl, les échantillons sont dilués dans de l'eau distillée pour obtenir un volume de 500 µl. En parallèle, une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues de catécholamines. Une première étape d'extraction des catécholamines est réalisée en déposant 25µl d'un tampon d'extraction dans les puits suivi d'une incubation d'une heure à température ambiante sous agitation. Après deux lavages de 5 minutes avec le tampon de lavage, une incubation de 20 minutes à température ambiante avec un réactif d'acylation est réalisée. Deux lavages sont à nouveau réalisés, puis de l'acide hydrochlorique est ajouté dans les puits afin de réguler l'acidité des échantillons. 190µl de la gamme, des échantillons contrôles et des échantillons précédemment extraits sont déposés dans une plaque de micro-titration. Les puits sont ensuite exposés à une solution enzymatique pendant deux heures à 37 °C. Une plaque de

micro-titration spécifique de chaque catécholamine, contenant des anticorps spécifiques dirigés respectivement contre l'adrénaline la noradrénaline ou la dopamine est utilisée pour doser séparément les trois catécholamines. Une incubation avec de l'anti-sérum (adrénaline, noradrénaline ou dopamine) est réalisée pendant 15-20 heures à 4°C. Après 4 lavages, les échantillons sont exposés pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation à une solution contenant un conjugué spécifique. Après lavage, le substrat de l'enzyme est incubé à température ambiante sous agitation. Une solution permettant d'arrêter la réaction est ajoutée après 20 à 30 minutes d'incubation avec le substrat. L'absorbance des solutions est lue à 450 nm avec un fluorimètre Mithras LB 940 (logiciel Mikrowin 2000, *Berthold Technology*), l'absorbance à 620 nm servant de valeur de référence. Une régression non linéaire à partir des valeurs de densités optiques de la gamme est réalisée à l'aide du logiciel Sigma Plot, afin d'obtenir la concentration des échantillons en catécholamines. Le pourcentage de sécrétion de catécholamines est ensuite calculé comme décrit ci-dessus.

2.2.3. Dosage de la hGH par méthode ELISA

Une technique alternative à la mesure de l'activité sécrétrice par dosage des catécholamines consiste à transfecter les cellules PC12 avec un plasmide codant pour l'hormone de croissance humaine (hGH), qui constitue un marqueur quantifiable de l'activité sécrétrice. Après obtention des deux fractions (culot et surnageant) comme décrit ci-dessus, la quantité de hGH est mesurée à l'aide d'un kit « hGH ELISA » (*Roche Diagnostics*). Ce kit fournit des plaques de microtitrations recouvertes d'anticorps anti-hGH. 200 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits et incubés 1 heure à 37°C. En parallèle, une gamme étalon est réalisée avec des concentrations connues de hGH. Les échantillons sont alors lavés 6 fois dans du tampon de lavage fourni dans le Kit puis incubés avec un anticorps anti-hGH (100 µg/ml). Après une heure d'incubation à 37°C et une nouvelle série de 6 lavages, les puits sont remplis par une solution d'anticorps anti-DIG couplé à la peroxydase. Après une heure d'incubation supplémentaire, le milieu est remplacé par une solution contenant un substrat de la peroxydase. L'enzyme va cliver le substrat et générer un produit coloré quantifiable par mesure de l'absorbance des solutions à 405 nm avec un fluorimètre Mithras LB 940 (logiciel Mikrowin 2000, *Berthold Technology*), l'absorbance à 490 nm servant de valeur de référence. Le pourcentage de sécrétion de la hGH est calculé comme décrit précédemment.

2.3. Dosage de la chromogranine A par Western Blot

2.3.1. Dosage de la CgA dans les lignées PC12^{CgA}

Partie réalisée par l'équipe «Génomique Fonctionnelle et Physiopathologie Neuroendocrine» de l'Unité INSERM 982 à Rouen. Les cellules sont lavées dans du PBS puis incubées sur glace dans un tampon de lyse pendant 1 minute (*invitrogen*). Après grattage, les extraits cellulaires sont centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C. Après un dosage protéique, du tampon de charge Leammi est ajouté aux échantillons, qui sont ensuite dénaturés par chauffage à 95°C pendant 3 minutes. Les protéines (10µg/puits) sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 4-10% en conditions dénaturantes SDS-PAGE (MES SDS Running Buffer NuPage, *Invitrogen*) à 180 Volts puis transférées électriquement sur une membrane de nitrocellulose (transfert humide).

Les membranes sont lavées dans du TBS, puis saturées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de blocage TBS contenant 5% de lait et 0,1% de tween (TBS-0,1%T). La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire dirigé contre la CgA dilué dans la solution TBS-0,1%T (EI35 ; 1 :1000) pendant la nuit à 4°C. Après trois lavages de 10 minutes dans le TBS-0,1%T, la membrane est exposée à l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (*Santa-Cruz* ; 1 :2000) pendant 40 minutes à température ambiante. Après trois lavages de 10 minutes dans le TBS-0,1%T, l'activité de la peroxydase est révélée par chimio-luminescence (ECL Supersignal® Substrate System, *Pierce*). Le signal est détecté en utilisant le système d'acquisition d'images par chemiluminescence « ChemiDoc XRS » (*Biorad*). Après lavages, la membrane est incubée à nouveau avec un anticorps primaire monoclonal de souris dirigé contre la tubuline (*Sigma* ; 1 :5000), puis les étapes précédemment décrites de lavages, d'incubation avec un anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase et de révélation ont été réalisées. Les bandes immunoréactives sont quantifiées et normalisées par rapport à la tubuline à partir du logiciel Image Lab.

2.3.2. Dosage de la CgA sécrétée dans les clones C-27^{CgA+} et A35C^{CgA+}

Les cellules sont lavées deux fois avec une solution de Locke Normal puis incubées 5 minutes dans une solution de Locke Normal (condition repos) ou d'une solution Locke dépolarisante contenant 59mM de potassium (condition stimulé). Les surnageants sont récupérés et

centrifugés 5 min à 14 000 rpm. Pour récupérer la fraction cellulaire, les cellules sont incubées sur glace dans un tampon de lyse (*invitrogen*). Après grattage, les extraits cellulaires sont centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C. Un cocktail d'inhibiteur de protéases (*Sigma-P8340*, 500X) est ajouté aux deux fractions obtenues. La quantité de protéines est ensuite mesurée par la méthode de Bradford. La gamme étalon est effectuée avec du sérum albumine bovine. La densité optique est mesurée à la longueur d'onde de 595 nm avec un fluorimètre Mithras LB 940 (logiciel Mikrowin 2000, *Berthold Technology*).

Du tampon de charge (Tris HCl 10mM pH7.0, EDTA 1mM, DTT 20mM, SDS 3%, glycérol 10%, bromophénol 0,01%) est ajouté aux échantillons, qui sont ensuite dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines (5µg/puits) sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 4-12% en conditions dénaturantes SDS-PAGE (MES SDS Running Buffer NuPage, *Invitrogen*) à 180 Volts puis transférées électriquement sur une membrane de nitrocellulose (transfert à sec, *Biorad*). L'efficacité du transfert est vérifiée en colorant la membrane dans une solution de rouge ponceau. Les membranes sont lavées dans du TBS, puis saturées pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de blocage TBS contenant 5% de lait et 0,1% de tween. Tous les lavages et les dilutions des anticorps sont réalisés dans cette solution. La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre la CgA (*Abcam*, 1:2000) pendant 1h à température ambiante. Après un lavage rapide puis deux lavages de 15 minutes la membrane est exposée à l'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase (*Pierce*, 1 :20000) pendant 45 minutes à température ambiante. Après un lavage rapide puis deux lavages de 15 minutes, l'activité de la peroxydase est révélée par chimio-luminescence (ECL Supersignal® Substrate System, *Pierce*). Le signal est détecté en utilisant le système d'acquisition d'images par chemiluminescence « Chemi-smart 5000 » (*Vilber Lourmat*). Les bandes immunoréactives sont quantifiées à partir du logiciel ImageJ. Le pourcentage de sécrétion de la CgA est ensuite calculé comme décrit précédemment.

2.4. Dosage de l'activité des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42

Le dosage de l'activité de Rac1, RhoA et Cdc42 est réalisé en utilisant les kits « G-LISA™ Activation Assay » (*Cytoskeleton*). Le principe de ce test est basé sur la liaison spécifique de la GTPase sous sa forme active liée au GTP avec un ligand spécifique qui se trouve dans les

puits. La GTPase est ensuite détectée par un anticorps spécifique. Cette méthode a été utilisée pour doser l'activité des GTPases Rho dans des lysats de cellules PC12 ainsi que dans des lysats de tissus humains sains ou péri-tumoraux. La composition des réactifs du kit n'est pas communiquée par le fournisseur.

La lyse des échantillons est effectuée à froid à l'aide de 75 µl d'un tampon de lyse fourni dans le Kit. Après avoir effectué un dosage protéique, 60µg de protéines pour chaque échantillon sont déposés dans les puits de la microplaque qui est incubée 15 à 30 minutes (selon la GTPases dosée) à 4°C sous agitation à 400 rpm. Après deux lavages à l'aide du tampon de lavage, la plaque est incubée 2 minutes à température ambiante dans une solution permettant de démasquer les antigènes. Après une série de 3 lavages, une incubation de 30 à 45 min à température ambiante sous agitation à 400 rpm est effectuée avec une solution d'anticorps primaire anti-Rac, anti-Cdc42 ou anti-RhoA. Après 3 lavages, les puits sont incubés 30 à 45 min à température ambiante sous agitation à 400 rpm dans une solution d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase et reconnaissant l'anticorps primaire précédemment incubé. Enfin, une dernière série de lavage est effectuée suivie d'une incubation avec une solution « HRP Detection Reagent » permettant de révéler l'activité de la peroxydase. L'absorbance émise à 490 nm est mesurée au fluorimètre Mithras (*Berthold*).

Notez que dans le cas des échantillons de tissus humains uniquement, le lysat est divisé en quatre fractions. La première fraction permet de détecter l'activité des GTPases dans l'échantillon. Dans les trois autres fractions est ajoutée une solution contenant 10µl de nucléotide guanidique (GTPγS, GTP ou GDP), 2µl d'EDTA 0,5M et 0,6µl de MgCl₂. L'ajout de GTP non hydrolysable (GTPγS) permet de détecter la quantité totale de GTPase, l'ajout de GTP nous donne accès à l'activité maximale et l'ajout de GDP permet de détecter le bruit de fond. L'activité de chaque GTPase est exprimée en pourcentage d'activité, en soustrayant le signal lié au bruit de fond et en divisant par l'activité maximale obtenue dans l'expérience :

$$\text{Activité} = (\text{activité GTPase de l'échantillon} - \text{bruit de fond}) / (\text{activité maximale} - \text{bruit de fond}) \times 100.$$

2.5. Mesure de la vitesse de prolifération *in vitro*

2.5.1. Mesure par comptage des cellules au cytomètre en flux

Les cellules sont ensemencées en triplicat dans une plaque 24 puits, à une concentration de 15000 cellules par puits. Toutes les 24h pendant 4 jours, les cellules sont trypsinisées, puis le culot est repris dans 500 µl de PBS-1% BSA en vue d'analyser les échantillons au cytomètre en flux (MACSQuant Analyser *Miltenyi Biotec*). Afin d'exclure la population de cellules mortes, un agent intercalant de l'ADN est utilisé : une solution d'iodure de propidium (PI, *Macs Miltenyi Biotec*) est ajoutée dans les tubes, à une concentration finale de 0,5µg/ml. Excité par un laser de 488 nm, avec application d'un filtre 655-730 nm, le PI est détecté permet de sélectionner la population de cellules vivantes, négative pour le PI.

2.5.2. Mesure par méthode fluorimétrique

Partie réalisée par l'équipe «Génomique Fonctionnelle et Physiopathologie Neuroendocrine» de l'Unité INSERM 982 à Rouen. Les cellules sont ensemencées à une densité de 5000 cellules par puits. La prolifération cellulaire a été évaluée par une méthode fluorimétrique à l'aide du kit CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (*Promega*), permettant d'estimer le nombre de cellules viables. Ce test repose sur la capacité métabolique des cellules vivantes à réduire la résazurine (*via* la succinate déshydrogénase mitochondriale) en résorufine, un produit fluorescent à 590 nm. La résazurine a été directement ajoutée aux cellules et la fluorescence a été mesurée après 3 h d'incubation à 37°C sur le lecteur de microplaques Flexstation3 (*Molecular Devices*). Les cellules non viables ne produisent pas de signal fluorescent puisqu'elles perdent leurs capacités métaboliques et ne peuvent pas réduire la résazurine. Le signal fluorescent obtenu est ainsi proportionnel au nombre de cellules viables.

2.6. Mesure de la vitesse de prolifération en absence d'adhérence

La solution d'agar 1,2% (Noble agar, *Sigma-Aldrich*) est chauffée aux micro-ondes, puis conservé à 42°C pour éviter la solidification de l'agar. Le milieu DMEM concentré 2X (*Gibco*) est préparé, filtré, puis chauffé à 40°C pendant 30 minutes avant l'expérience. Le milieu agarose 1,2% est dilué 2X dans le DMEM concentré 2X pour obtenir une solution d'agar à

0,6%, et conservé à 40°C. La solution d'agarose (800µl/boite) est déposée dans les boîtes de Pétri 35mm, et la solidification de l'agar est réalisée sous la hotte, pendant 2 heures. Une quantité de 2500 cellules est diluée dans 500µl de milieu de culture complet. Les tubes sont mis à 37°C pendant 20min. 500µl d'agar 0,6% sont ensuite ajoutés aux cellules. La couche d'agar 0,3% contenant les cellules diluées est déposée sur la première couche d'agar, et la solidification est réalisée pendant 30 minutes à température ambiante sous la hotte, puis pendant 1h à 4°C. Les boîtes de 35mm sont disposées dans des boîtes de 10cm dans l'incubateur et quelques gouttes d'eau stérile sont déposées afin de réaliser une chambre humide afin d'éviter que l'agar ne sèche. Après 3 jours de culture, du milieu complet est ajouté. Après 15 jours de culture, les colonies sont lavées deux fois dans du PBS, puis fixées pendant 5 minutes dans du paraformaldéhyde 4%. Une incubation de 30 minutes avec du Crystal violet 0,005 % (*Sigma-Aldrich*) est ensuite réalisée afin de colorer les colonies. L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un appareil photo numérique, et le comptage des colonies est effectué sur le logiciel ImageJ.

2.7. Xénogreffes sous-cutanées de cellules PC12 chez des souris Nude

Les études expérimentales réalisées sur les animaux sont en accord avec la réglementation française imposant l'obtention d'une autorisation d'expérimenter sur les animaux vivants. Les animaux utilisés sont des souris femelles immunodéficientes issues d'une lignée mutante non consanguine: NMRI-nu (RjOrl:NMRI-*Foxn1^{nu}* /*Foxn1^{nu}*), provenant du centre d'élevage René Janvier. Elles sont âgées de 6 semaines au moment de l'expérimentation (poids : 27 ± 0,2 g). Un ensemble de 40 animaux a été utilisé, et hébergé à raison de 4 souris par cage (une souris de chaque condition) selon les normes d'hébergement des animaux en animalerie transgénique.

Après une semaine d'acclimatation en animalerie, les souris reçoivent une injection de 100µl de NaCl physiologique (9g/L) contenant 2 millions de cellules ou une injection de solution saline. Pour chaque souris, le prélèvement sanguin est d'abord réalisé puis les cellules sont injectées. Pendant toute la durée de ces deux manipulations, la souris est maintenue anesthésiée au masque (2% isoflurane), après avoir été anesthésiée dans la boîte (4% isoflurane). Une lancette stérile permettant de piquer au niveau du point de concours de la veine rétro-orbitale et de la veine sous mandibulaire est utilisée pour chaque souris (*Golde*

et al., 2005). Le sang (environ 200-300µl) est récupéré dans un tube Eppendorff muni d'une gouttière et contenant au préalable 1µl d'héparine 25U. Lorsqu'un volume de 200µl de sang est prélevé, 2µl d'EDTA-HCL est ajouté immédiatement dans le tube qui est ensuite placé à 4°C. Les 100µl de suspension cellulaire sont injectées en sous-cutané avec une aiguille 25G au niveau du flanc droit de la souris. Lorsque le prélèvement sanguin et l'injection des cellules sont réalisés pour chacune des quatre souris de la cage, les tubes de sang sont centrifugés pendant dix minutes à 13000 rpm, à 4°C. Le plasma (50-100µl) est prélevé et transféré dans un nouveau tube, protégé de la lumière par du papier aluminium, puis congelé immédiatement dans de la carboglace. A la fin de l'expérience, les catécholamines plasmatiques sont dosées par une méthode ELISA, à l'aide du kit 3-CAT research ELISA (BA E-5600, *Labor Diagnostika Nord*), de la même façon que le dosage dans les lysats cellulaires décrits dans la partie « dosage des catécholamines par méthode ELISA ».

Tous les trois jours, les souris sont pesées et un suivi de l'état général est réalisé selon une grille de score. Le volume de la tumeur est mesuré en utilisant un pied à coulisse électronique, puis calculé *via* la formule suivante : $l \times L \times h \times 0.5236$. Une fois par semaine, un prélèvement sanguin sous-mandibulaire est réalisé. Quand le volume des tumeurs atteint un volume supérieur à 1cm^3 , les souris sont sacrifiées et la tumeur est extraite.

Après linéarisation des données de volume tumoral par transformation en \log_2 , le temps de doublement des tumeurs correspondant au temps nécessaire pour que la tumeur double de volume, est calculé dans la partie linéaire de la courbe. Le retard de croissance, correspondant au temps nécessaire pour que la tumeur atteigne le volume fixé à $0,8\text{cm}^3$ et le retard de l'initiation tumorale, correspondant au temps nécessaire pour que la tumeur atteigne le volume d'initiation fixé à 5mm^3 sont également calculés. Notez qu'en dessous du seuil de 5mm^3 , la mesure précise du volume tumoral en trois dimensions n'est pas possible.

2.8. Analyse ultrastructurale en microscopie électronique

Les cellules sont mises en culture sur des lamelles découpées dans des feuilles d'Aclar (*EMS*). Après un jour de culture, les cellules sont fixées chimiquement en remplaçant le milieu de culture par du glutaraldéhyde 1% dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,3 pendant 1h à température ambiante puis par du glutaraldéhyde 0,1% dans le tampon phosphate pendant la nuit à 4°C. Le lendemain, le fixateur est rincé trois fois 15 minutes avec du tampon

phosphate puis les cellules sont post-fixées dans du tetroxyde d'osmium 0,5% dans le tampon phosphate pendant 1h à température ambiante. La déshydratation est effectuée par des bains d'éthanol de concentration croissante de 8 minutes (50, 70, 95, 2x 100%) puis un mélange 50% éthanol- 50% oxyde de propylène et enfin deux bains d'oxyde de propylène de 8 minutes. Les cellules sont ensuite imprégnées dans un mélange 50% Araldite- 50% oxyde de propylène la nuit à 4°C, puis dans l'Araldite pure deux fois 2 heures avant polymérisation à 60°C pendant 48h. Des coupes ultrafines de 60 à 80 nm d'épaisseur sont réalisées sur un ultramicrotome Leica et observées au microscope électronique par transmission (*Hitachi 7500*) équipé d'une caméra numérique AMT Hamamatsu.

2.9. Immunofluorescence et microscopie confocale

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : anticorps monoclonal de souris dirigé contre VAMP2 (*SySy* ; 1:600) ; anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la CgA (*Abcam* ; 1 :200) ; anticorps monoclonal de souris dirigé contre le récepteur à la transferrine (*Zymed*, 1 :200). Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés : anticorps anti-lapin ou anti-souris couplés à un fluorochrome Alexa 488 ou 555 (*Molecular probe* ; 1 :1000).

Les cellules sont incubées deux fois deux minutes dans une solution de Locke, puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de PBS puis perméabilisées 12 minutes dans une solution de PBS contenant 0,1% de triton X-100. Après 5 lavages dans du PBS, les cellules sont incubées dans une solution de saturation (3% de BSA dans du PBS) pendant 1h à température ambiante. Les lamelles sont incubées avec 80µl d'anticorps primaires dilués dans une solution de PBS-3%BSA pendant 45 minutes à température ambiante. Après 5 lavages de 5 minutes dans du PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution PBS-3%BSA, pendant 30 minutes à température ambiante. Après 5 lavages de 5 minutes, les lamelles sont séchées puis montées sur lames dans un milieu de montage Mowiol 4-88 (*Calbiochem*). Après polymérisation du milieu de montage, les cellules pourront être observées en microscopie à fluorescence. Les acquisitions sont effectuées à l'aide du microscope confocal à balayage laser LEICA SP5 avec le programme LAS-AF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence). Les protéines fluorescentes sont observées par

l'utilisation de différents lasers permettant d'exciter les fluorophores à des longueurs d'ondes de 488 et 555 nm (Argon : λ 488nm, Hélium/néon : λ 555nm).

2.10. Analyse protéomique des échantillons de PHEO humains

Partie réalisée par l'entreprise de protéomique Caprion (Montréal, CANADA).

2.10.1. Préparation des fractions subcellulaires

Les tissus humains tumoraux et péri-tumoraux sont décongelés puis coupés en petits fragments (cubes d'environ 3mm de côté) et 1,5 ml de tampon d'homogénéisation (0,25M sucrose ; 10 mM Tris pH 7,4 ; 100 unités/ml de DNase I ; 5 mM MgCl₂, cocktail d'inhibiteur de protéase sans EDTA) sont ajoutés par échantillon de tissu. Les échantillons sont homogénéisés trois fois 10 secondes. Les homogénats ainsi obtenus sont filtrés à travers une membrane de nylon (180 μ m) et le volume est complété à 1,25ml avec du tampon d'homogénéisation si nécessaire. Pour obtenir la fraction cytoplasmique, les échantillons d'homogénats (200 μ l par échantillons) sont centrifugés à 100000g pendant 60 minutes à 4°C (Rotor TLA55), les lipides sont retirés de la partie supérieure des échantillons et 150 μ l de surnageants sont prélevés puis congelés à -80°C. Pour obtenir la fraction enrichie en membranes légères, 1ml de solution de sucrose (2,55M sucrose ; 10 mM Tris pH 7,4) est ajoutée à chaque homogénat pour obtenir une solution finale de sucrose 1,4M. La fraction membranes légères a été isolée par centrifugation en utilisant des gradients de sucrose discontinus. Les échantillons sont recouverts de deux couches superposées de sucrose de concentration différente : 1,8 ml d'une solution de sucrose 1,2M et 0,5 ml d'une solution de sucrose 0,8M. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 155000g pendant deux heures à 4°C. Après centrifugation, la fraction membranes légères, localisée au niveau de l'interface de sucrose 0,8M-1,2M est collectée puis congelée à -80°C.

2.10.2. Spectrométrie de masse par chromatographie liquide (LCMS)

Tous les échantillons sont digérés avec de la trypsine pendant 12h et désalés par extraction de phase solide en utilisant une plaque de désalinisation 3M (*Empore C18*). Les peptides obtenus sont séparés par chromatographie liquide échangeuse de cations (SCX) en trois fractions par échantillons. Chaque fraction est analysée par LCMS en utilisant un

spectromètre de masse Waters QTOF. Les peptides sont détectés et appariés dans tous les échantillons et l'intensité relative du pic est comparée à l'aide du logiciel Elucidator (*Rosetta Biosciences*). Toutes les valeurs d'intensité sont transformées en log avec des valeurs <0 remplacées par des données d'intensité de 0. Un sous-ensemble d'échantillon est utilisé pour créer un échantillon de référence par rapport auquel les données d'intensité de tous les échantillons ont ensuite été normalisées. Les facteurs de normalisation ont été choisis de telle sorte que la médiane des rapports de log entre chaque échantillon et l'échantillon de référence sur l'ensemble des peptides soit ajustée à zéro. Pour la correction de « l'effet-lots », une analyse de variance (ANOVA un facteur) $I_{ij} = M + D_i + \varepsilon_{ij}$ (I : intensité, M : interception globale et D : facteur lot) a été réalisée et les paramètres D_i ($i=1...3$) sous la contrainte de $\sum_{i=1}^3 (N_i \times D_i) = 0$ ont été obtenus. Les valeurs de D_i ont ensuite été soustraites des intensités normalisées pour former les intensités « effet lots corrigé ». L'analyse ANOVA a ensuite été appliquée pour identifier les peptides exprimés de façon différentielle. Modèle d'analyse de variance : $I_{ij} = M + C_i + D_i + \varepsilon_{ij}$ où I est l'intensité de peptides, M est l'intensité moyenne globale, C est le facteur « groupe clinique » et ε est l'erreur aléatoire. Le taux de fausse détection et la q-valeur ont été calculées sur la base des p-valeurs obtenues à partir de l'analyse de variance en utilisant la méthode de Storey. Les analyses de contrastes « post-hoc » ont été réalisées en utilisant la méthode HSD de Tuckey pour calculer les p-valeurs pour chaque comparaison appariée.

L'identification des protéines a été effectuée par analyse de spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les peptides exprimés de façon différentielle ont été ciblés par séquençage et les modèles de fragmentation résultants ont été appariés à des séquences correspondantes trouvées dans une base de données de protéines en utilisant un logiciel Mascot (*Matrice Sciences*). Une analyse du niveau en protéines a ensuite été appliquée par l'introduction d'un « facteur de peptides » dans l'analyse de variance décrite ci-dessus : $I_{ijk} = M + C_i + P_j + \varepsilon_{ijk}$, où I est l'intensité protéique, M est la constante globale, C est le « groupe clinique » et P le « facteur de peptide ». Le nombre de niveau de P est dépendant des protéines et égal au nombre de peptides de la protéine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aasheim HC, Pedeutour F, Smeland EB (1997) Characterization, expression and chromosomal localization of a human gene homologous to the mouse Lsc oncogene, with strongest expression in hematopoietic tissues. *Oncogene* 14:1747–1752.
- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353:668–670.
- Advani AS, Pendergast AM (2002) Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leuk Res* 26:713–720.
- Agarwal A, Mehrotra PK, Jain M, Gupta SK, Mishra A, Chand G, Agarwal G, Verma a K, Mishra SK, Singh U (2010) Size of the tumor and pheochromocytoma of the adrenal gland scaled score (PASS): can they predict malignancy? *World J Surg* 34:3022–3028.
- Aghazadeh B, Lowry WE, Huang XY, Rosen MK (2000) Structural basis for relief of autoinhibition of the Dbl homology domain of proto-oncogene Vav by tyrosine phosphorylation. *Cell* 102:625–633.
- Ahras M, Otto GP, Tooze SA (2006) Synaptotagmin IV is necessary for the maturation of secretory granules in PC12 cells. *J Cell Biol* 173:241–251.
- Alan JK, Berzat AC, Dewar BJ, Graves LM, Cox AD (2010) Regulation of the Rho family small GTPase Wrch-1/RhoU by C-terminal tyrosine phosphorylation requires Src. *Mol Cell Biol* 30:4324–4338.
- Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC (2010) 1,25(OH)₂vitamin D₃ inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119:73–83.
- Aspenström P, Ruusala A, Pacholsky D (2007) Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res* 313:3673–3679.
- Astuti D, Latif F, Dallol A, Dahia PL, Douglas F, George E, Sköldberg F, Husebye ES, Eng C, Maher ER (2001) Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet* 69:49–54.
- Aunis D, Langley K (1999) Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* 167:89–97.

B

- Bader M-F, Doussau F, Chasserot-Golaz S, Vitale N, Gasman S (2004) Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: a role for Rho and ARF GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1742:37–49.
- Basu S, Nagy J, Pal S, Vasile E, Eckelhoefer I, Bliss VS, Manseau EJ, Dasgupta PS, Dvorak HF, Mukhopadhyay D (2001) The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 7:569–574.
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B (2000) Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science* 287:848–851.
- Becherer U, Rettig J (2006) Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* 326:393–407.
- Belloni D, Scabini S, Foglieni C, Veschini L, Giazzon A, Colombo B, Fulgenzi A, Helle KB, Ferrero ME, Corti A, Ferrero E (2007) The vasostatin-I fragment of chromogranin A inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *FASEB J* 21:3052–3062.
- Bellovin DI, Simpson KJ, Danilov T, Maynard E, Rimm DL, Oettgen P, Mercurio M (2006) Reciprocal regulation of RhoA and RhoC characterizes the EMT and identifies RhoC as a prognostic marker of colon carcinoma. *Oncogene* 25:6959–6967.
- Ben-Eliyahu S, Yirmiya R, Liebeskind JC, Taylor AN, Gale RP (1991) Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system. *Brain Behav Immun* 5:193–205.
- Berzat AC, Buss JE, Chenette EJ, Weinbaum CA, Shutes A, Der CJ, Minden A, Cox AD (2005) Transforming activity of the Rho family GTPase, Wrch-1, a Wnt-regulated Cdc42 homolog, is dependent on a novel carboxyl-terminal palmitoylation motif. *J Biol Chem* 280:33055–33065.
- Betz A, Okamoto M, Benseler F, Brose N (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J Biol Chem* 272:2520–2526.
- Bhavsar PJ, Infante E, Khwaja A, Ridley AJ (2013) Analysis of Rho GTPase expression in T-ALL identifies RhoU as a target for Notch involved in T-ALL cell migration. *Oncogene* 32:198–208.
- Bishop A, Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2:241–255.

- Bittner GD, Kennedy D (1970) Quantitative aspects of transmitter release. *J Cell Biol* 47:585–592.
- Blank A, Schmitt AM, Korpershoek E, van Nederveen F, Rudolph T, Weber N, Strebel RT, de Krijger R, Komminoth P, Perren A (2010) SDHB loss predicts malignancy in pheochromocytomas/sympathetic paragangliomas, but not through hypoxia signalling. *Endocr Relat Cancer* 17:919–928.
- Brazier H, Pawlak G, Vives V, Blangy A (2009) The Rho GTPase *Wrch1* regulates osteoclast precursor adhesion and migration. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1391–1401.
- Bruce AW, Donaldson IJ, Wood IC, Yerbury S a, Sadowski MI, Chapman M, Göttgens B, Buckley NJ (2004) Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10458–10463.
- Bruce AW, Krejčí A, Ooi L, Deuchars J, Wood IC, Dolezal V, Buckley NJ (2006) The transcriptional repressor REST is a critical regulator of the neurosecretory phenotype. *J Neurochem* 98:1828–1840.
- Brunet N, Morin A, Olofsson B (2002) RhoGDI-3 regulates RhoG and targets this protein to the Golgi complex through its unique N-terminal domain. *Traffic* 3:342–357.
- Bülbring E, Tomita T (1987) Catecholamine action on smooth muscle. *Pharmacol Rev* 39:49–96.
- Burnichon N, Cascon A, Schiavi F et al. (2012a) MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res* 18:2828–2837.
- Burnichon N, Brière J-J, Libé R, Vescovo L, Rivière J, Tissier F, Jouanno E, Jeunemaitre X, Bénit P, Tzagoloff A, Rustin P, Bertherat J, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P (2010) SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet* 19:3011–3020.
- Burnichon N, Buffet A, Parfait B, Letouzé E, Laurendeau I, Lorient C, Pasmant E, Abermil N, Valeyrie-Allanore L, Bertherat J, Amar L, Vidaud D, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P (2012b) Somatic NF1 inactivation is a frequent event in sporadic pheochromocytoma. *Hum Mol Genet* 21:5397–5405.
- Burnichon N, Vescovo L, Amar L, Libé R, de Reynies A, Venisse A, Jouanno E, Laurendeau I, Parfait B, Bertherat J, Plouin P-F, Jeunemaitre X, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P (2011) Integrative genomic analysis reveals somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma. *Hum Mol Genet* 20:3974–3985.
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM (2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29:356–370.

C

- Cahill AL, Herring BE, Fox AP (2006) Stable silencing of SNAP-25 in PC12 cells by RNA interference. *BMC Neurosci* 7:9.
- Ceridono M, Ory S, Momboisse F, Chasserot-Golaz S, Houy S, Calco V, Haeberlé A-M, Demais V, Bailly Y, Bader M-F, Gasman S (2011) Selective recapture of secretory granule components after full collapse exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells. *Traffic* 12:72–88.
- Chakroborty D, Sarkar C, Mitra RB, Banerjee S, Dasgupta PS, Basu S (2004) Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 10:4349–4356.
- Chanat E, Huttner WB (1991) Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network. *J Cell Biol* 115:1505–1519.
- Cheadle L, Biederer T (2012) The novel synaptogenic protein Farp1 links postsynaptic cytoskeletal dynamics and transsynaptic organization. *J Cell Biol* 199:985–1001.
- Cheadle L, Biederer T (2014) Activity-dependent regulation of dendritic complexity by semaphorin 3A through Farp1. *J Neurosci* 34:7999–8009.
- Chenette EJ, Abo A, Der CJ (2005) Critical and distinct roles of amino- and carboxyl-terminal sequences in regulation of the biological activity of the Chp atypical Rho GTPase. *J Biol Chem* 280:13784–13792.
- Cheng L, Rossman KL, Mahon GM, Worthylake DK, Korus M, Sondek J, Whitehead IP (2002) RhoGEF specificity mutants implicate RhoA as a target for Dbs transforming activity. *Mol Cell Biol* 22:6895–6905.
- Cherfils J, Zeghouf M (2013) Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev* 93:269–309.
- Ching Y-P, Wong C-M, Chan S-F, Leung TH-Y, Ng DC-H, Jin D-Y, Ng IO (2003) Deleted in liver cancer (DLC) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 278:10824–10830.
- Chino JP, Sampson JH, Tucci DL, Brizel DM, Kirkpatrick JP (2009) Paraganglioma of the head and neck: long-term local control with radiotherapy. *Am J Clin Oncol* 32:304–307.
- Chow CR, Suzuki N, Kawamura T, Hamakubo T, Kozasa T (2013) Modification of p115RhoGEF Ser(330) regulates its RhoGEF activity. *Cell Signal* 25:2085–2092.

- Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Meldolesi J (2007) Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both. *Traffic* 8:742–757.
- Corradi N, Borgonovo B, Clementi E, Bassetti M, Racchetti G, Consalez GG, Huttner WB, Meldolesi J, Rosa P (1996) Overall lack of regulated secretion in a PC12 variant cell clone. *J Biol Chem* 271:27116–27124.
- Corti A (2010) Chromogranin A and the tumor microenvironment. *Cell Mol Neurobiol* 30:1163–1170.
- Coupland R, Pyper A, Hopwood D (1964) A method for differentiating between noradrenaline- and adrenaline-storing cells in the light and electron microscope. *Nature* 201:1240–1242.
- Courel M, El Yamani F-Z, Alexandre D, El Fatemi H, Delestre C, Montero-Hadjadje M, Tazi F, Amarti A, Magoul R, Chartrel N, Anouar Y (2014) Secretogranin II is overexpressed in advanced prostate cancer and promotes the neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Eur J Cancer*:3039–3049.
- Courel M, Rodemer C, Nguyen ST, Pance A, Jackson AP, O’connor DT, Taupenot L (2006) Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J Biol Chem* 281:38038–38051.
- Crespo P, Schuebel KE, Ostrom AA, Gutkind JS, Bustelo XR (1997) Phosphotyrosine-dependent activation of Rac-1 GDP/GTP exchange by the vav proto-oncogene product. *Nature* 385:169–172.
- Crippa L, Bianco M, Colombo B, Gasparri AM, Ferrero E, Loh YP, Curnis F, Corti A (2013) A new chromogranin A-dependent angiogenic switch activated by thrombin. *Blood* 121:392–402.
- Crivellato E, Nico B, Ribatti D (2008) The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec (Hoboken)* 291:1587–1602.
- Croisé P, Estay-Ahumada C, Gasman S, Ory S (2014) RhoGTPases, phosphoinositides, and actin: A tripartite framework for efficient vesicular trafficking. *Small GTPases* 5.
- Crona J, Delgado Verdugo A, Maharjan R, Stålberg P, Granberg D, Hellman P, Björklund P (2013) Somatic mutations in H-RAS in sporadic pheochromocytoma and paraganglioma identified by exome sequencing. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E1266–E1271.
- Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD (1985) Autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Cancer Surv* 4:707–727.

D

- D'Alessandro R, Klajn A, Stucchi L, Podini P, Malosio ML, Meldolesi J (2008) Expression of the neurosecretory process in PC12 cells is governed by REST. *J Neurochem* 105:1369–1383.
- Dahia PLM (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer* 14:108–119.
- Daily NJ, Boswell KL, James DJ, Martin TFJ (2010) Novel interactions of CAPS (Ca²⁺-dependent activator protein for secretion) with the three neuronal SNARE proteins required for vesicle fusion. *J Biol Chem* 285:35320–35329.
- Darchen F, Goud B (2000) Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. *Biochimie* 82:375–384.
- Davenport C, Liew A, Doherty B, Win HHN, Misran H, Hanna S, Kealy D, Al-Nooh F, Agha A, Thompson CJ, Lee M, Smith D (2011) The prevalence of adrenal incidentaloma in routine clinical practice. *Endocrine* 40:80–83.
- De Diego a MG, Gandía L, García a G (2008) A physiological view of the central and peripheral mechanisms that regulate the release of catecholamines at the adrenal medulla. *Acta Physiol (Oxf)* 192:287–301.
- De Martin M, Pecori Giraldi F, Cavagnini F (2006) Cushing's disease. *Pituitary* 9:279–287.
- Denorme M, Yon L, Roux C, Gonzalez BJ, Baudin E, Anouar Y, Dubessy C (2014) Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a xenograft model. *Cancer Lett* 352:236–244.
- Dhanvantari S, Loh YP (2000) Lipid raft association of carboxypeptidase E is necessary for its function as a regulated secretory pathway sorting receptor. *J Biol Chem* 275:29887–29893.
- Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Borges R (2008) Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192:145–163.
- Díaz-Vera J, Camacho M, Machado JD, Domínguez N, Montesinos MS, Hernández-Fernaud JR, Luján R, Borges R (2012) Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. *FASEB J* 26:430–438.
- Díaz-Vera J, Morales YG, Hernández-Fernaud JR, Camacho M, Montesinos MS, Calegari F, Huttner WB, Borges R, Machado JD (2010) Chromogranin B gene ablation reduces the

catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *J Neurosci* 30:950–957.

Dransart E, Olofsson B, Cherfils J (2005) RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* 6:957–966.

Dubash AD, Wennerberg K, García-Mata R, Menold MM, Arthur WT, Burridge K (2007) A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *J Cell Sci* 120:3989–3998.

Dulubova I, Sugita S, Hill S, Hosaka M, Fernandez I, Südhof TC, Rizo J (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* 18:4372–4382.

Dutt S, Matasci M, Sommer L, Zimmermann DR (2006) Guidance of neural crest cell migration: the inhibitory function of the chondroitin sulfate proteoglycan, versican. *ScientificWorldJournal* 6:1114–1117.

E

Eisenhofer G, Goldstein DS, Sullivan P, Csako G, Brouwers FM, Lai EW, Adams KT, Pacak K (2005a) Biochemical and clinical manifestations of dopamine-producing paragangliomas: utility of plasma methoxytyramine. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2068–2075.

Eisenhofer G, Huynh T-T, Elkahloun A, Morris JC, Bratslavsky G, Linehan WM, Zhuang Z, Balgley BM, Lee CS, Mannelli M, Lenders JWM, Bornstein SR, Pacak K (2008) Differential expression of the regulated catecholamine secretory pathway in different hereditary forms of pheochromocytoma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1223–E1233.

Eisenhofer G, Keiser H, Friberg P, Mezey E, Huynh TT, Hiremagalur B, Ellingson T, Duddempudi S, Eijsbouts A, Lenders JW (1998) Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2175–2185.

Eisenhofer G, Lenders JWM, Goldstein DS, Mannelli M, Csako G, Walther MM, Brouwers FM, Pacak K (2005b) Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines. *Clin Chem* 51:735–744.

Eisenhofer G, Lenders JWM, Siegert G, Bornstein SR, Friberg P, Milosevic D, Mannelli M, Linehan WM, Adams K, Timmers HJ, Pacak K (2012) Plasma methoxytyramine: a novel biomarker of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in relation to established risk factors of tumour size, location and SDHB mutation status. *Eur J Cancer* 48:1739–1749.

- Eisenhofer G, Pacak K, Huynh T-T, Qin N, Bratslavsky G, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Grebe SK, Timmers HJ, Bornstein SR, Lenders JWM (2011) Catecholamine metabolomic and secretory phenotypes in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer* 18:97–111.
- Eisenhofer G, Walther MM, Huynh TT, Li ST, Bornstein SR, Vortmeyer A, Mannelli M, Goldstein DS, Linehan WM, Lenders JW, Pacak K (2001) Pheochromocytomas in von Hippel-Lindau syndrome and multiple endocrine neoplasia type 2 display distinct biochemical and clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1999–2008.
- Elias S, Delestre C, Ory S, Marais S, Courel M, Vazquez-Martinez R, Bernard S, Coquet L, Malagon MM, Driouich A, Chan P, Gasman S, Anouar Y, Montero-Hadjadje M (2012) Chromogranin A induces the biogenesis of granules with calcium- and actin-dependent dynamics and exocytosis in constitutively secreting cells. *Endocrinology* 153:4444–4456.
- Ellenbroek SIJ, Collard JG (2007) Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin Exp Metastasis* 24:657–672.
- Engel A, Von Euler US (1950) Diagnostic value of increased urinary output of pheochromocytoma. *Lancet* 2:387.
- Engers R, Springer E, Michiels F, Collard JG, Gabbert HE (2001) Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* 276:41889–41897.
- Engers R, Zwaka TP, Gohr L, Weber A, Gerharz CD, Gabbert HE (2000) Tiam1 mutations in human renal-cell carcinomas. *Int J Cancer* 88:369–376.
- Erdmann KS, Mao Y, Mc Crea HJ, Zoncu R, Lee S, Paradise S, Modregger J, Biemesderfer D, Toomre D, De Camilli P (2007) A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway. *Dev Cell* 13:377–390.

F

- Favier J, Plouin P-F, Corvol P, Gasc J-M (2002) Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. *Am J Pathol* 161:1235–1246.
- Fleming IN, Batty IH, Prescott AR, Gray A, Kular GS, Stewart H, Downes CP (2004) Inositol phospholipids regulate the guanine-nucleotide-exchange factor Tiam1 by facilitating its binding to the plasma membrane and regulating GDP/GTP exchange on Rac1. *Biochem J* 382:857–865.

- Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, Futreal PA (2011) COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res* 39:D945–D950.
- Francis SA, Shen X, Young JB, Kaul P, Lerner DJ (2006) Rho GEF Lsc is required for normal polarization, migration, and adhesion of formyl-peptide-stimulated neutrophils. *Blood* 107:1627–1635.
- Fulop T, Radabaugh S, Smith C (2005) Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci* 25:7324–7332.

G

- Gaidano G, Pasqualucci L, Capello D, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Maria Larocca L, Gloghini A, Carbone A, Dalla-Favera R (2003) Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 102:1833–1841.
- Galan SR, Kann PH (2013) Genetics and molecular pathogenesis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 78:165–175.
- Gandasi NR, Barg S (2014) Contact-induced clustering of syntaxin and munc18 docks secretory granules at the exocytosis site. *Nat Commun* 5:3914.
- Garcia-Mata R, Boulter E, BurrIDGE K (2011) The “invisible hand”: regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:493–504.
- Garrett MD, Self AJ, van Oers C, Hall A (1989) Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins. *J Biol Chem* 264:10–13.
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Hubert P, Aunis D, Bader MF (1998) Identification of a potential effector pathway for the trimeric Go protein associated with secretory granules. Go stimulates a granule-bound phosphatidylinositol 4-kinase by activating RhoA in chromaffin cells. *J Biol Chem* 273:16913–16920.
- Gasman S, Chasserot-Golaz S, Malacombe M, Way M, Bader M (2004) Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell* 15:520–531.
- Gimenez-Roqueplo A-P, Dahia PL, Robledo M (2012) An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res* 44:328–333.

- Girkontaite I, Missy K, Sakk V, Harenberg A, Tedford K, Pötzel T, Pfeffer K, Fischer KD (2001) Lsc is required for marginal zone B cells, regulation of lymphocyte motility and immune responses. *Nat Immunol* 2:855–862.
- Glaven JA., Whitehead IP, Nomanbhoy T, Kay R, Cerione R a. (1996a) Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. *J Biol Chem* 271:27374–27381.
- Glaven JA, Whitehead IP, Nomanbhoy T, Kay R, Cerione R (1996b) Lfc and Lsc oncoproteins represent two new guanine nucleotide exchange factors for the Rho GTP-binding protein. *J Biol Chem* 271:27374–27381.
- Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL (2005) A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* 34:39–43.
- Goldstein RE, O’Neill JA, Holcomb GW, Morgan WM, Neblett WW, Oates JA, Brown N, Nadeau J, Smith B, Page DL, Abumrad NN, Scott HW (1999) Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma. *Ann Surg* 229:755–764; discussion 764–766.
- Gorvel JP, Chang TC, Boretto J, Azuma T, Chavrier P (1998) Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett* 422:269–273.
- Grabner CP, Price SD, Lysakowski A, Fox AP (2005) Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J Neurophysiol* 94:2093–2104.
- Gratzl M, Breckner M, Prinz C (2004) Mechanisms of storage and exocytosis in neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 15:1–16.
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2424–2428.
- Gubar O, Morderer D, Tsyba L, Croisé P, Houy S, Ory S, Gasman S, Rynditch A (2013) Intersectin: The Crossroad between Vesicle Exocytosis and Endocytosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:109.
- Guillemot J, Guérin M, Thouënnon E, Montéro-Hadjadje M, Leprince J, Lefebvre H, Klein M, Muresan M, Anouar Y, Yon L (2014) Characterization and plasma measurement of the WE-14 peptide in patients with pheochromocytoma. *PLoS One* 9:e88698.
- Guilluy C, Brégeon J, Toumaniantz G, Rolli-Derkinderen M, Retailleau K, Loufrani L, Henrion D, Scalbert E, Bril A, Torres RM, Offermanns S, Pacaud P, Loirand G (2010) The Rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat Med* 16:183–190.

Gulyás-Kovács A, De Wit H, Milosevic I, Kochubey O, Toonen R, Klingauf J, Verhage M, Sørensen JB (2007) Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J Neurosci* 27:8676–8686.

H

Hakem A, Sanchez-Sweatman O, You-Ten A, Duncan G, Wakeham A, Khokha R, Mak TW (2005) RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* 19:1974–1979.

Han J, Das B, Wei W, Van Aelst L, Mosteller RD, Khosravi-Far R, Westwick JK, Der CJ, Broek D (1997) Lck regulates Vav activation of members of the Rho family of GTPases. *Mol Cell Biol* 17:1346–1353.

Hao H, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley J-P, Kunst H, Devilee P, Cremers CWRJ, Schiffman JD, Bentz BG, Gygi SP, Winge DR, Kremer H, Rutter J (2009) SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science* 325:1139–1142.

Harata NC, Aravanis AM, Tsien RW (2006) Kiss-and-run and full-collapse fusion as modes of exo-endocytosis in neurosecretion. *J Neurochem* 97:1546–1570.

Harenberg A, Girkontaite I, Giehl K, Fischer K-D (2005) The Lsc RhoGEF mediates signaling from thromboxane A2 to actin polymerization and apoptosis in thymocytes. *Eur J Immunol* 35:1977–1986.

Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Cerione RA (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* 354:311–314.

Hart MJ, Sharma S, ElMasry N, Qiu RG, McCabe P, Polakis P, Bollag G (1996) Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J Biol Chem* 271:25452–25458.

Hata Y, Slaughter CA, Südhof TC (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366:347–351.

Hatsuzawa K, Lang T, Fasshauer D, Bruns D, Jahn R (2003) The R-SNARE motif of tomosyn forms SNARE core complexes with syntaxin 1 and SNAP-25 and down-regulates exocytosis. *J Biol Chem* 278:31159–31166.

Heider MR, Munson M (2012) Exorcising the exocyst complex. *Traffic* 13:898–907.

Hendy GN, Li T, Girard M, Feldstein RC, Mulay S, Desjardins R, Day R, Karaplis AC, Tremblay ML, Canaff L (2006) Targeted ablation of the chromogranin a (Chga) gene: normal

- neuroendocrine dense-core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol Endocrinol* 20:1935–1947.
- Herbst RS (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59:21–26.
- Hirata D, Yamabuki T, Miki D, Ito T, Tsuchiya E, Fujita M, Hosokawa M, Chayama K, Nakamura Y, Daigo Y (2009) Involvement of epithelial cell transforming sequence-2 oncoantigen in lung and esophageal cancer progression. *Clin Cancer Res* 15:256–266.
- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV et al. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150:251–263.
- Houy S, Croisé P, Gubar O, Chasserot-Golaz S, Tryoen-Tóth P, Bailly Y, Ory S, Bader M-F, Gasman S (2013) Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells: inseparable membranes! *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:135.
- Hu J, Strauch P, Rubtsov A, Donovan EE, Pelanda R, Torres RM (2008) Lsc activity is controlled by oligomerization and regulates integrin adhesion. *Mol Immunol* 45:1825–1836.
- Hu KQ, Settleman J (1997) Tandem SH2 binding sites mediate the RasGAP-RhoGAP interaction: a conformational mechanism for SH3 domain regulation. *EMBO J* 16:473–483.
- Huang C, Liu S, Miller RT (2011) Role of p115RhoGEF in the regulation of extracellular Ca(2+)-induced choline kinase activation and prostate cancer cell proliferation. *Int J Cancer* 128:2833–2842.
- Huang H, Abraham J, Hung E, Averbuch S, Merino M, Steinberg SM, Pacak K, Fojo T (2008) Treatment of malignant pheochromocytoma/paraganglioma with cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine: recommendation from a 22-year follow-up of 18 patients. *Cancer* 113:2020–2028.
- Humeau Y, Vitale N, Chasserot-Golaz S, Dupont JL, Du G, Frohman M a, Bader MF, Poulain B (2001) A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15300–15305.
- Hwang SL, Hong YR, Sy WD, Lieu AS, Lin CL, Lee KS, Howng SL (2004) Rac1 gene mutations in human brain tumours. *Eur J Surg Oncol* 30:68–72.

J

- Jackson MB, Chapman ER (2006) Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 35:135–160.
- Jahn R, Scheller RH (2006) SNAREs-engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:631–643.
- Jaiswal M, Dvorsky R, Ahmadian MR (2013) Deciphering the molecular and functional basis of Dbl family proteins: a novel systematic approach toward classification of selective activation of the Rho family proteins. *J Biol Chem* 288:4486–4500.
- Jaiswal M, Gremer L, Dvorsky R, Haeusler LC, Cirstea IC, Uhlenbrock K, Ahmadian MR (2011) Mechanistic insights into specificity, activity, and regulatory elements of the regulator of G-protein signaling (RGS)-containing Rho-specific guanine nucleotide exchange factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and leukemia-associated RhoGEF (LARG). *J Biol Chem* 286:18202–18212.
- Jones MB, Krutzsch H, Shu H, Zhao Y, Liotta LA, Kohn EC, Petricoin EF (2002) Proteomic analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics* 2:76–84.
- Joneson T, Bar-Sagi D (1999) Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol* 19:5892–5901.

K

- Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C (2009) Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1796:91–98.
- Karnoub AE, Worthylake DK, Rossman KL, Pruitt WM, Campbell SL, Sondek J, Der CJ (2001) Molecular basis for Rac1 recognition by guanine nucleotide exchange factors. *Nat Struct Biol* 8:1037–1041.
- Katzav S (2007) Flesh and blood: the story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies. *Cancer Lett* 255:241–254.
- Kher SS, Struckhoff AP, Alberts AS, Worthylake RA (2014) A novel role for p115RhoGEF in regulation of epithelial plasticity. *PLoS One* 9:e85409.

- Kikuta A, Murakami T (1982) Microcirculation of the rat adrenal gland: a scanning electron microscope study of vascular casts. *Am J Anat* 164:19–28.
- Kim T, Gondré-Lewis MC, Arnaoutova I, Loh YP (2006) Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology (Bethesda)* 21:124–133.
- Kim T, Tao-Cheng JH, Eiden LE, Loh YP (2001) Chromogranin A, an “on/off” switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* 106:499–509.
- Kim T, Zhang C, Sun Z, Wu H, Loh YP (2005) Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis. *J Neurosci* 25:6958–6961.
- Kirikoshi H, Katoh M (2002) Expression of WRCH1 in human cancer and down-regulation of WRCH1 by beta-estradiol in MCF-7 cells. *Int J Oncol* 20:777–783.
- Kissil JL, Walmsley MJ, Hanlon L, Haigis KM, Bender Kim CF, Sweet-Cordero A, Eckman MS, Tuveson D a, Capobianco AJ, Tybulewicz VLJ, Jacks T (2007) Requirement for Rac1 in a K-ras induced lung cancer in the mouse. *Cancer Res* 67:8089–8094.
- Kourlas PJ, Strout MP, Becknell B, Veronese ML, Croce CM, Theil KS, Krahe R, Ruutu T, Knuutila S, Bloomfield CD, Caligiuri MA (2000) Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2145–2150.
- Koyano Y, Kawamoto T, Kikuchi A, Shen M, Kuruta Y, Tsutsumi S, Fujimoto K, Noshiro M, Fujii K, Kato Y (2001) Chondrocyte-derived ezrin-like domain containing protein (CDEP), a rho guanine nucleotide exchange factor, is inducible in chondrocytes by parathyroid hormone and cyclic AMP and has transforming activity in NIH3T3 cells. *Osteoarthritis Cartilage* 9 Suppl A:S64–S68.
- Krauthammer M, Kong Y, Ha BH et al. (2012) Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 44:1006–1014.
- Kumar GK, Overholt JL, Bright GR, Hui KY, Lu H, Gratzl M, Prabhakar NR (1998) Release of dopamine and norepinephrine by hypoxia from PC-12 cells. *Am J Physiol* 274:C1592–C1600.
- Kurella VB, Richard JM, Parke CL, Lecour LF, Bellamy HD, Worthylake DK (2009) Crystal structure of the GTPase-activating protein-related domain from IQGAP1. *J Biol Chem* 284:14857–14865.

L

- Lamberts SW, Hofland LJ, Nobels FR (2001) Neuroendocrine tumor markers. *Front Neuroendocrinol* 22:309–339.
- Laurin M, Côté J-F (2014) Insights into the biological functions of Dock family guanine nucleotide exchange factors. *Genes Dev* 28:533–547.
- Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway L a, Golub TR, Meyerson M, Gabriel SB, Lander ES, Getz G (2014) Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505:495–501.
- Le Douarin N, Dieterlen-Lièvre F, Creuzet S, Teillet M-A (2008) Quail-chick transplantations. *Methods Cell Biol* 87:19–58.
- Lee EW, Michalkiewicz M, Kitlinska J, Kalezic I, Switalska H, Yoo P, Sangkharat A, Ji H, Li L, Michalkiewicz T, Ljubisavljevic M, Johansson H, Grant DS, Zukowska Z (2003) Neuropeptide Y induces ischemic angiogenesis and restores function of ischemic skeletal muscles. *J Clin Invest* 111:1853–1862.
- Lee J-W, Shahzad MMK, Lin YG, Armaiz-Pena G, Mangala LS, Han H-D, Kim H-S, Nam EJ, Jennings NB, Halder J, Nick AM, Stone RL, Lu C, Lutgendorf SK, Cole SW, Lokshin AE, Sood AK (2009) Surgical stress promotes tumor growth in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 15:2695–2702.
- Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo A-P, Grebe SKG, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 99:1915–1942.
- Lenders JWM, Eisenhofer G, Mannelli M, Pacak K (2005) Pheochromocytoma. *Lancet* 366:665–675.
- Lenders JWM, Pacak K, Eisenhofer G (2002) New advances in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma: moving beyond catecholamines. *Ann N Y Acad Sci* 970:29–40.
- Letouzé E, Martinelli C, Loriot C, Burnichon N, Abermil N, Ottolenghi C, Janin M, Menara M, Nguyen AT, Benit P, Buffet A, Marcaillou C, Bertherat J, Amar L, Rustin P, De Reyniès A, Gimenez-Roqueplo A-P, Favier J (2013) SDH mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell* 23:739–752.
- Li X-J, Luo Y, Yi Y-F (2013) P115 promotes growth of gastric cancer through interaction with macrophage migration inhibitory factor. *World J Gastroenterol* 19:8619–8629.

- Liu AX, Rane N, Liu JP, Prendergast GC (2001) RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* 21:6906–6912.
- Liu X, Wang H, Eberstadt M, Schnuchel A, Olejniczak ET, Meadows RP, Schkeryantz JM, Janowick D a, Harlan JE, Harris E a, Staunton DE, Fesik SW (1998) NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell* 95:269–277.
- Liu Y, Schirra C, Stevens DR, Matti U, Speidel D, Hof D, Bruns D, Brose N, Rettig J (2008) CAPS facilitates filling of the rapidly releasable pool of large dense-core vesicles. *J Neurosci* 28:5594–5601.
- Lo CY, Lam KY, Wat MS, Lam KS (2000) Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis. *Am J Surg* 179:212–215.
- Lozano E, Betson M, Braga VMM (2003) Tumor progression: Small GTPases and loss of cell-cell adhesion. *Bioessays* 25:452–463.

M

- Madaule P, Axel R (1985) A novel ras-related gene family. *Cell* 41:31–40.
- Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim APS, Mahata M, Ray S, Staite E, Wu H, Gu Y, Dalton N, Kennedy BP, Ziegler MG, Ross J, Mahata SK (2005) Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest* 115:1942–1952.
- Malacombe M, Bader M-F, Gasman S (2006a) Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763:1175–1183.
- Malacombe M, Ceridono M, Calco V, Chasserot-Golaz S, McPherson PS, Bader M-F, Gasman S (2006b) Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *EMBO J* 25:3494–3503.
- Malliri A, van der Kammen R a, Clark K, van der Valk M, Michiels F, Collard JG (2002) Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417:867–871.
- Malliri A, van Es S, Huveneers S, Collard JG (2004) The Rac exchange factor Tiam1 is required for the establishment and maintenance of cadherin-based adhesions. *J Biol Chem* 279:30092–30098.

- Malosio ML, Benfante R, Racchetti G, Borgonovo B, Rosa P, Meldolesi J (1999) Neurosecretory cells without neurosecretion: evidence of an independently regulated trait of the cell phenotype. *J Physiol* 520 Pt 1:43–52.
- Malumbres M, Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459–465.
- Marquèze B, Berton F, Seagar M (2000) Synaptotagmins in membrane traffic: which vesicles do the tagmins tag? *Biochimie* 82:409–420.
- Martucci VL, Pacak K (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma: diagnosis, genetics, management, and treatment. *Curr Probl Cancer* 38:7–41.
- Melamed R, Rosenne E, Shakhar K, Schwartz Y, Abudarham N, Ben-Eliyahu S (2005) Marginating pulmonary-NK activity and resistance to experimental tumor metastasis: suppression by surgery and the prophylactic use of a beta-adrenergic antagonist and a prostaglandin synthesis inhibitor. *Brain Behav Immun* 19:114–126.
- Merajver SD, Usmani SZ (2005) Multifaceted role of Rho proteins in angiogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10:291–298.
- Mertens AEE, Rygiel TP, Olivo C, van der Kammen R, Collard JG (2005) The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol* 170:1029–1037.
- Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG (2000) Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:185–189.
- Mizuarai S, Yamanaka K, Kotani H (2006) Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer Res* 66:6319–6326.
- Moghadam PK, Jackson MB (2013) The functional significance of synaptotagmin diversity in neuroendocrine secretion. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:124.
- Momboisse F, Houy S, Ory S, Calco V, Bader M-F, Gasman S (2011) How important are Rho GTPases in neurosecretion? *J Neurochem* 117:623–631.
- Momboisse F, Lonchamp E, Calco V, Ceridono M, Vitale N, Bader M-F, Gasman S (2009a) betaPIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *J Cell Sci* 122:798–806.
- Momboisse F, Ory S, Calco V, Malacombe M, Bader M-F, Gasman S (2009b) Calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells: intersectin-1L stimulates actin polymerization and exocytosis by activating Cdc42. *Ann N Y Acad Sci* 1152:209–214.

- Montero-Hadjadje M, Elias S, Chevalier L, Benard M, Tanguy Y, Turquier V, Galas L, Yon L, Malagon MM, Driouich A, Gasman S, Anouar Y (2009) Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem* 284:12420–12431.
- Montesinos MS, Machado JD, Camacho M, Diaz J, Morales YG, Alvarez de la Rosa D, Carmona E, Castañeyra A, Viveros OH, O'Connor DT, Mahata SK, Borges R (2008) The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *J Neurosci* 28:3350–3358.
- Montuenga LM, Guembe L, Burrell MA, Bodegas ME, Calvo A, Sola JJ, Sesma P, Villaro AC (2003) The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Prog Histochem Cytochem* 38:155–272.
- Morrison SF, Cao WH (2000) Different adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and norepinephrine secretion. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279:R1763–R1775.
- Moskalenko S, Henry DO, Rosse C, Mirey G, Camonis JH, White M a (2002) The exocyst is a Ral effector complex. *Nat Cell Biol* 4:66–72.
- Mravec B (2005) A new focus on interoceptive properties of adrenal medulla. *Auton Neurosci* 120:10–17.

NO

- Na S, Li B, Grewal IS, Enslin H, Davis RJ, Hanke JH, Flavell RA (1999) Expression of activated CDC42 induces T cell apoptosis in thymus and peripheral lymph organs via different pathways. *Oncogene* 18:7966–7974.
- Neumann HPH, Vortmeyer A, Schmidt D, Werner M, Erlic Z, Cascon A, Bausch B, Januszewicz A, Eng C (2007) Evidence of MEN-2 in the original description of classic pheochromocytoma. *N Engl J Med* 357:1311–1315.
- Niemann S, Müller U (2000) Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* 26:268–270.
- O'Brien LE, Jou TS, Pollack AL, Zhang Q, Hansen SH, Yurchenco P, Mostov KE (2001) Rac1 orientates epithelial apical polarity through effects on basolateral laminin assembly. *Nat Cell Biol* 3:831–838.
- Olson MF, Ashworth A, Hall A (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269:1270–1272.

Onaitis MW, Kirshbom PM, Hayward TZ, Quayle FJ, Feldman JM, Seigler HF, Tyler DS (2000) Gastrointestinal carcinoids: characterization by site of origin and hormone production. *Ann Surg* 232:549–556.

P

Paduch M, Jeleń F, Otlewski J (2001) Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim Pol* 48:829–850.

Pance A, Morgan K, Guest PC, Bowers K, Dean GE, Cutler DF, Jackson AP (1999) A PC12 variant lacking regulated secretory organelles: aberrant protein targeting and evidence for a factor inhibiting neuroendocrine gene expression. *J Neurochem* 73:21–30.

Papke JB, Moore-Dotson JM, Watson DJ, Wedell CD, French LR, Rendell SR, Harkins a B (2012) Titration of synaptotagmin I expression differentially regulates release of norepinephrine and neuropeptide Y. *Neuroscience* 218:78–88.

Pearse AG, Takor TT (1976) Neuroendocrine embryology and the APUD concept. *Clin Endocrinol (Oxf)* 5 Suppl:229S – 244S.

Pirruccello M, Swan LE, Folta-Stogniew E, De Camilli P (2011) Recognition of the F&H motif by the Lowe syndrome protein OCRL. *Nat Struct Mol Biol* 18:789–795.

Platko J V, Leonard DA, Adra CN, Shaw RJ, Cerione RA, Lim B (1995) A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2974–2978.

Poirier É, Thauvette D, Hogue J-C (2013) Management of exclusively dopamine-secreting abdominal pheochromocytomas. *J Am Coll Surg* 216:340–346.

Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, Dallery-Prudhomme E, Lantoine D, Laï JL, Daudignon A, Adenis C, Bauters F, Fenaux P, Kerckaert JP, Galiègue-Zouitina S (2000) Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* 19:2023–2032.

QR

- Qin J, Xie Y, Wang B, Hoshino M, Wolff DW, Zhao J, Scofield MA, Dowd FJ, Lin M-F, Tu Y (2009) Upregulation of PIP3-dependent Rac exchanger 1 (P-Rex1) promotes prostate cancer metastasis. *Oncogene* 28:1853–1863.
- Qin Y, Yao L, King EE, Buddavarapu K, Lenci RE, Chocron ES, Lechleiter JD, Sass M, Aronin N, Schiavi F, Boaretto F, Opocher G, Toledo RA, Toledo SPA, Stiles C, Aguiar RCT, Dahia PLM (2010) Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet* 42:229–233.
- Qiu RG, Chen J, Kirn D, McCormick F, Symons M (1995) An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374:457–459.
- Rack PG, Ni J, Payumo AY, Nguyen V, Crapster JA, Hovestadt V, Kool M, Jones DTW, Mich JK, Firestone AJ, Pfister SM, Cho Y-J, Chen JK (2014) Arhgap36-dependent activation of Gli transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:11061–11066.
- Reuther GW, Lambert QT, Booden MA, Wennerberg K, Becknell B, Marcucci G, Sondek J, Caligiuri M a, Der CJ (2001) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor, a Dbl family protein found mutated in leukemia, causes transformation by activation of RhoA. *J Biol Chem* 276:27145–27151.
- Ridley AJ, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389–399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70:401–410.
- Roof RW, Haskell MD, Dukes BD, Sherman N, Kinter M, Parsons SJ (1998) Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c-Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol Cell Biol* 18:7052–7063.
- Rossetto O, Scorzeto M, Megighian A, Montecucco C (2013) Tetanus neurotoxin. *Toxicon* 66:59–63.
- Rossmann KL, Campbell SL (2000) Bacterial expressed DH and DH/PH domains. *Methods Enzymol* 325:25–38.
- Rossmann KL, Der CJ, Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:167–180.

- Rubtsov A, Strauch P, Digiacomio A, Hu J, Pelanda R, Torres RM (2005) Lsc regulates marginal-zone B cell migration and adhesion and is required for the IgM T-dependent antibody response. *Immunity* 23:527–538.
- Rudolf R, Salm T, Rustom A, Gerdes HH (2001) Dynamics of immature secretory granules: role of cytoskeletal elements during transport, cortical restriction, and F-actin-dependent tethering. *Mol Biol Cell* 12:1353–1365.
- Russo C, Gao Y, Mancini P, Vanni C, Porotto M, Falasca M, Torrisi MR, Zheng Y, Eva A (2001) Modulation of oncogenic DBL activity by phosphoinositol phosphate binding to pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 276:19524–19531.

S

- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K et al. (2014) Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 46:171–175.
- Saras J, Wollberg P, Aspenström P (2004) Wrch1 is a GTPase-deficient Cdc42-like protein with unusual binding characteristics and cellular effects. *Exp Cell Res* 299:356–369.
- Sarkar C, Chakroborty D, Basu S (2013) Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: the role of catecholamines. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:7–14.
- Scharrer E (1954) Neurosecretion and anterior pituitary in the dog. *Experientia* 10:264–266.
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C (1992) Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359:832–835.
- Schmidt A, Hall A (2002) The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *J Biol Chem* 277:14581–14588.
- Schwartz M (2004) Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* 117:5457–5458.
- Scoazec J (2005) [Endocrine tumors: biology and physiopathology]. *Ann Pathol* 25:447–461.
- Shen C, Kaelin WG (2013) The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 23:18–25.
- Shutes A, Berzat AC, Cox AD, Der CJ (2004) Atypical mechanism of regulation of the Wrch-1 Rho family small GTPase. *Curr Biol* 14:2052–2056.

- Siddhanta A, Backer JM, Shields D (2000) Inhibition of phosphatidic acid synthesis alters the structure of the Golgi apparatus and inhibits secretion in endocrine cells. *J Biol Chem* 275:12023–12031.
- Siehler S (2009) Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 158:41–49.
- Sivaram MVS, Saporita JA, Furgason MLM, Boettcher AJ, Munson M (2005) Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry* 44:6302–6311.
- Sjöblom T, Jones S, Wood LD et al. (2006) The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314:268–274.
- Snyder JT, Worthylake DK, Rossman KL, Betts L, Pruitt WM, Siderovski DP, Der CJ, Sondek J (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol* 9:468–475.
- Song JH, Chaudhry FS, Mayo-Smith WW (2008a) The incidental adrenal mass on CT: prevalence of adrenal disease in 1,049 consecutive adrenal masses in patients with no known malignancy. *AJR Am J Roentgenol* 190:1163–1168.
- Song JY, Lee JK, Lee NW, Jung HH, Kim SH, Lee KW (2008b) Microarray analysis of normal cervix, carcinoma in situ, and invasive cervical cancer: identification of candidate genes in pathogenesis of invasion in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 18:1051–1059.
- Song K, Cornelius SC, Danielpour D (2003) Development and characterization of DP-153, a nontumorigenic prostatic cell line that undergoes malignant transformation by expression of dominant-negative transforming growth factor beta receptor type II. *Cancer Res* 63:4358–4367.
- Sørensen JB (2004) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448:347–362.
- Stransky N, Egloff AM, Tward AD et al. (2011) The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 333:1157–1160.
- Sugita S (2008) Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiol (Oxf)* 192:185–193.

T

- Taïeb D, Timmers HJ, Hindié E, Guillet BA, Neumann HP, Walz MK, Opocher G, de Herder WW, Boedeker CC, de Krijger RR, Chiti A, Al-Nahas A, Pacak K, Rubello D (2012) EANM

- 2012 guidelines for radionuclide imaging of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 39:1977–1995.
- Taïeb D, Yang C, Delenne B, Zhuang Z, Barlier A, Sebag F, Pacak K (2013) First report of bilateral pheochromocytoma in the clinical spectrum of HIF2A-related polycythemia-paraganglioma syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 98:E908–E913.
- Tao W, Pennica D, Xu L, Kalejta RF, Levine AJ (2001) Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev* 15:1796–1807.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348:1134–1149.
- Taylor SC, Peers C (1998) Hypoxia evokes catecholamine secretion from rat pheochromocytoma PC-12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248:13–17.
- Taylor SC, Roberts ML, Peers C (1999) Acid-evoked quantal catecholamine secretion from rat pheochromocytoma cells and its interaction with hypoxia-evoked secretion. *J Physiol* 519 Pt 3:765–774.
- Tcherkezian J, Lamarche-Vane N (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* 99:67–86.
- Teglund S, Toftgård R (2010) Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 1805:181–208.
- Thaker PH, Han LY, Kamat AA et al. (2006) Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat Med* 12:939–944.
- Theodorescu D, Sapinoso LM, Conaway MR, Oxford G, Hampton GM, Frierson HF (2004) Reduced expression of metastasis suppressor RhoGDI2 is associated with decreased survival for patients with bladder cancer. *Clin Cancer Res* 10:3800–3806.
- Theurl M, Schgoer W, Albrecht K, Jeschke J, Egger M, Beer AGE, Vasiljevic D, Rong S, Wolf AM, Bahlmann FH, Patsch JR, Wolf D, Schratzberger P, Mahata SK, Kirchmair R (2010) The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *Circ Res* 107:1326–1335.
- Thiery JP, Sleeman JP (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131–142.
- Thomas EK, Cancelas JA, Chae H-D, Cox AD, Keller PJ, Perrotti D, Neviani P, Druker BJ, Setchell KDR, Zheng Y, Harris CE, Williams DA (2007) Rac guanosine triphosphatases represent integrating molecular therapeutic targets for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell* 12:467–478.

- Thompson LDR (2002) Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score (PASS) to separate benign from malignant neoplasms: a clinicopathologic and immunophenotypic study of 100 cases. *Am J Surg Pathol* 26:551–566.
- Tilan J, Kitlinska J (2010) Sympathetic Neurotransmitters and Tumor Angiogenesis-Link between Stress and Cancer Progression. *J Oncol* 2010:539706.
- Toledo RA, Qin Y, Srikantan S, Morales NP, Li Q, Deng Y, Kim S-W, Pereira MAA, Toledo SPA, Su X, Aguiar RCT, Dahia PLM (2013) In vivo and in vitro oncogenic effects of HIF2A mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer* 20:349–359.
- Tooze J, Tooze SA (1986) Clathrin-coated vesicular transport of secretory proteins during the formation of ACTH-containing secretory granules in AtT20 cells. *J Cell Biol* 103:839–850.
- Tsuboi T, Fukuda M (2006) Rab3A and Rab27A cooperatively regulate the docking step of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *J Cell Sci* 119:2196–2203.

UV

- Urbé S, Dittié AS, Tooze SA (1997) pH-dependent processing of secretogranin II by the endopeptidase PC2 in isolated immature secretory granules. *Biochem J* 321 (Pt 1:65–74.
- Van Hengel J, D’Hooge P, Hooghe B, Wu X, Libbrecht L, De Vos R, Quondamatteo F, Klempt M, Brakebusch C, van Roy F (2008) Continuous cell injury promotes hepatic tumorigenesis in cdc42-deficient mouse liver. *Gastroenterology* 134:781–792.
- Vega FM, Ridley AJ (2008) Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* 582:2093–2101.
- Veschini L, Crippa L, Dondossola E, Doglioni C, Corti A, Ferrero E (2011) The vasostatin-1 fragment of chromogranin A preserves a quiescent phenotype in hypoxia-driven endothelial cells and regulates tumor neovascularization. *FASEB J* 25:3906–3914.
- Vitale ML, Seward EP, Trifaró JM (1995) Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 14:353–363.
- Voets T, Moser T, Lund PE, Chow RH, Geppert M, Südhof TC, Neher E (2001) Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11680–11685.

W

- Wang Z, Oh E, Thurmond DC (2007) Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *J Biol Chem* 282:9536–9546.
- Wang Z, Thurmond DC (2009) Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis - roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J Cell Sci* 122:893–903.
- Welander J, Larsson C, Bäckdahl M, Hareni N, Sivlér T, Brauckhoff M, Söderkvist P, Gimm O (2012) Integrative genomics reveals frequent somatic NF1 mutations in sporadic pheochromocytomas. *Hum Mol Genet* 21:5406–5416.
- Wendler F, Tooze S (2001) Syntaxin 6: the promiscuous behaviour of a SNARE protein. *Traffic* 2:606–611.
- Whitehead IP, Khosravi-Far R, Kirk H, Trigo-Gonzalez G, Der CJ, Kay R (1996) Expression cloning of *Isc*, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 271:18643–18650.
- Whitelaw BC, Prague JK, Mustafa OG, Schulte K-M, Hopkins PA, Gilbert JA, McGregor AM, Aylwin SJB (2014) Pheochromocytoma crisis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 80:13–22.
- Wolf RM, Draghi N, Liang X, Dai C, Uhrbom L, Eklöf C, Westermark B, Holland EC, Resh MD (2003) p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3. *Genes Dev* 17:476–487.
- Wu D, Asiedu M, Wei Q (2009) Myosin-interacting guanine exchange factor (MyoGEF) regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC. *Oncogene* 28:2219–2230.
- Wu MM, Grabe M, Adams S, Tsien RY, Moore HP, Machen TE (2001) Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 276:33027–33035.

XYZ

- Xiao M, Yang H, Xu W, Ma S, Lin H, Zhu H, Liu L, Liu Y, Yang C, Xu Y, Zhao S, Ye D, Xiong Y, Guan K-L (2012) Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev* 26:1326–1338.

- Yamboliev IA, Smyth LM, Durnin L, Dai Y, Mutafova-Yambolieva VN (2009) Storage and secretion of beta-NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells. *Eur J Neurosci* 30:756–768.
- Yang C, Zhuang Z, Flidner SMJ, Shankavaram U, Sun MG, Bullova P, Zhu R, Elkahlon AG, Kourlas PJ, Merino M, Kebebew E, Pacak K (2014) Germ-line PHD1 and PHD2 mutations detected in patients with pheochromocytoma/paraganglioma-polycythemia. *J Mol Med (Berl)*.
- Yoo HY, Sung MK, Lee SH, Kim S, Lee H, Park S, Kim SC, Lee B, Rho K, Lee J-E, Cho K-H, Kim W, Ju H, Kim J, Kim SJ, Kim WS, Lee S, Ko YH (2014) A recurrent inactivating mutation in RHOA GTPase in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 46:371–375.
- Yoshioka K, Nakamori S, Itoh K (1999) Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells. *Cancer Res* 59:2004–2010.
- Yuan B-Z, Zhou X, Durkin ME, Zimonjic DB, Gumundsdottir K, Eyfjord JE, Thorgeirsson SS, Popescu NC (2003) DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity. *Oncogene* 22:445–450.
- Zalcman G, Closson V, Camonis J, Honoré N, Rousseau-Merck MF, Tavitian A, Olofsson B (1996) RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem* 271:30366–30374.
- Zhang J-S, Koenig A, Young C, Billadeau DD (2011) GRB2 couples RhoU to epidermal growth factor receptor signaling and cell migration. *Mol Biol Cell* 22:2119–2130.
- Zhuang B, Su YS, Sockanathan S (2009) FARP1 promotes the dendritic growth of spinal motor neuron subtypes through transmembrane Semaphorin6A and PlexinA4 signaling. *Neuron* 61:359–372.
- Zielke A, Bresalier RS, Siperstein AE, Clark OH, Rothmund M, Duh QY (1998) A unique allogenic model of metastatic pheochromocytoma: PC12 rat pheochromocytoma xenografts to nude mice and establishment of metastases-derived PC12 variants. *Clin Exp Metastasis* 16:341–352.
- Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ (1998) Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene* 17:1415–1438.
- Zukowska-Grojec Z, Karwatowska-Prokopczuk E, Rose W, Rone J, Movafagh S, Ji H, Yeh Y, Chen WT, Kleinman HK, Grouzmann E, Grant DS (1998) Neuropeptide Y: a novel angiogenic factor from the sympathetic nerves and endothelium. *Circ Res* 83:187–195.

PUBLICATIONS RELATIVES À MA FORMATION DOCTORALE

Revues (Annexe 1)

Gubar O, Morderer D, Tsyba L, Croisé P, Houy S, Ory S, Gasman S and Rynditch A (2013) Intersectin : the crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis. Front Endocrinol 27;4:109.

Houy S, Croisé P, Gubar O, Chasserot-Golaz S, Tryoen-Tóth P, Bailly Y, Ory S, Bader MF and Gasman S (2013) Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells : inseparable membranes.. Front Endocrinol 2;4:135.

Croisé P, Estay C, Gasman S and Ory S. Small GTPases (2014) RhoGTPases, phosphoinositides and actin: a tripartite framework for efficient vesicular trafficking. 5:e29469.

Article en révision (Annexe 2)

Houy S, Estay-Ahumada C, Croisé P, Calco V, Haeberlé AM, Bailly Y, Billuart P, Vitale N, Bader MF, Ory S and Gasman S. Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells. En révision favorable à Journal of Neuroscience.

Article rédigé et prochainement soumis (Annexe 3)

Gubar O*, Croisé P*, Tryoen-Toth P, Calco V, Sauvonnet N, Rynditch A, Blangy A, Gasman S and Ory S. The atypical Rho GTPase RhoU interacts with Intersectins to regulate endosomal recycling pathways. (** Les deux auteurs ont contribué de façon identique*).

Articles en préparation

Croisé P, Houy S, Lanoix J, Calco V, Brunaud L, Paramithiotis E, Chelsky D, Tryoen P, Ory S and Gasman S Subcellular modulation of FARP1 and ARHGEF1 expression controls Cdc42 and Rac1 activity in human pheochromocytoma.

Houy S, Estay E, Croisé P, Lanoix J, Paramithiotis E, Chelsky D, Ory S and Gasman S. Proteomic and amperometric analysis reveals severe dysfunction of secretion in human pheochromocytoma.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES LORS DE CONGRÈS

16^{ème} Colloque du Club Exocytose-Endocytose, La Grande Motte (France) ; Mai 2013

Croisé P, Houy S, Lanoix J, Calco V, Brunaud L, Paramithiotis E, Chelsky D, Tryoen P, Ory S and Gasman S. Regulated exocytosis and neuroendocrine tumor: a potential link? (Obtention du prix de la meilleure présentation affichée)

Gubar O, **Croisé P**, Tryoen-Toth P, Calco V, Rynditch A, Gasman S and Ory S. Identification of Intersectins as new binding partners of the atypical Rho GTPase RhoU: function in endocytosis?

17^{ème} Symposium International de la Biologie des Cellules Chromaffines, Rouen (France) ; Juillet 2013

Croisé P, Houy S, Lanoix J, Calco V, Brunaud L, Paramithiotis E, Chelsky D, Tryoen P, Ory S and Gasman S. Regulated exocytosis and neuroendocrine tumor: a potential link?

4th International Symposium on Pheochromocytoma and paraganglioma (ISP), Kyoto (Japon) ; Septembre 2014

Croisé P, Houy S, Lanoix J, Calco V, Brunaud L, Paramithiotis E, Chelsky D, Tryoen P, Ory S and Gasman S. Molecular mechanisms of hypersecretion in pheochromocytoma and its impact in tumor development. (Obtention de bourses de voyage du Cancéropôle Grand-Est et de la Société de Biologie Cellulaire Française)

8ème forum Cancéropôle Grand Est, Strasbourg (France) ; Novembre 2014

Molecular mechanisms of hypersecretion in pheochromocytoma and its impact in tumor development. **Croisé P**, Houy S, Lanoix J, Calco V, Brunaud L, Paramithiotis E, Chelsky D, Tryoen P, Ory S and Gasman S.

REVUES

Revue 1

Intersectin : the crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis.

Gubar O, Morderer D, Tsyba L, Croisé P, Houy S, Ory S, Gasman S and Rynditch A (2013).
Front Endocrinol 27;4:109.

Revue 2

Exocytosis and endocytosis in neuroendocrine cells : inseparable membranes.

Houy S, Croisé P, Gubar O, Chasserot-Golaz S, Tryoen-Tóth P, Bailly Y, Ory S, Bader MF and
Gasman S (2013). Front Endocrinol 2;4:135.

Revue 3

RhoGTPases, phosphoinositides and actin : a tripartite framework for efficient vesicular trafficking.

Croisé P, Estay C, Gasman S and Ory S. Small GTPases (2014). 5:e29469.

Au cours de mes trois ans de thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à l'écriture de deux revues qui font le bilan des mécanismes d'exocytose et d'endocytose dans les cellules neuroendocrines. La revue 1 présente l'implication d'une protéine régulatrice des GTPases Rho, l'intersectine, dans le couplage exocytose-endocytose tandis que la revue 2 décrit la notion de couplage entre la fusion des granules de sécrétion et le recyclage de leur membrane. J'ai également assuré la conception et la rédaction d'une autre revue, que je signe en premier auteur et dans laquelle mes collaborateurs et moi faisons l'état des lieux de l'implication des GTPases Rho dans le trafic membranaire (revue 3).

ARTICLE EN RÉVISION

Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells

Houy S, Estay-Ahumada C, **Croisé P**, Calco V, Haeberlé AM, Bailly Y, Billuart P, Vitale N, Bader MF, Ory S and Gasman S. En révision favorable à Journal of Neuroscience.

L'oligophrénine-1 possède un domaine GAP permettant l'inactivation de certaines GTPases de type Rho ainsi qu'un domaine « BAR » qui est un senseur de courbure membranaire. A l'époque de ce projet, le rôle fonctionnel de l'oligophrénine-1 au cours de l'exocytose régulée et de l'endocytose compensatrice dans les cellules chromaffines n'était pas encore connu. En utilisant des souris « Knock-out » pour le gène de l'oligophrénine-1, ce travail a permis de montrer que l'absence d'oligophrénine-1 empêche l'endocytose compensatrice des vésicules de sécrétion après exocytose et perturbe la formation du pore de fusion au cours de l'exocytose. Au cours de ma thèse, j'ai eu l'opportunité de participer à ce projet en étudiant notamment si l'absence d'oligophrénine-1 modifiait la quantité de catécholamine présente dans les granules de sécrétion. J'ai ainsi réalisé des dosages ELISA de la quantité de catécholamines à partir de glandes médullosurrénales extraites de souris KO pour l'oligophrénine-1 que j'ai comparé à celle des souris sauvages. L'ensemble de ce travail a permis de montrer pour la première fois l'implication de l'oligophrénine-1 dans le cycle d'exo-endocytose des granules de sécrétion des cellules neuroendocrines. De plus, les résultats suggèrent que l'oligophrénine-1 est impliquée dans la régulation de ces deux fonctions par l'intermédiaire de domaines distincts. En effet, son domaine GAP contrôle la fusion tandis que le domaine BAR est impliqué dans l'endocytose.

ARTICLE RÉDIGÉ ET PROCHAINEMENT SOUMIS

The atypical Rho GTPase RhoU interacts with Intersectins to regulate endosomal recycling pathways

Gubar O*, **Croisé P***, Tryoen-Toth P, Calco V, Sauvonnnet N, Rynditch A, Blangy A, Gasman S and Ory S. (** Les deux auteurs ont contribué de façon identique à ce travail*).

RhoU est une GTPase dite atypique de la famille Rho (voir introduction). Elle partage des homologies de séquence et de fonction avec Cdc42. Par exemple RhoU et Cdc42 induisent la formation de filopodes, interagissent et activent la protéine kinase PAK1 et sont nécessaires à l'établissement de la polarité cellulaire. Cependant, RhoU possède deux extensions (en N- et C-terminal) qui lui confèrent des propriétés différentes dont celle d'interagir avec des protéines adaptatrices à domaines SH3, telles que Nck β et Grb2. L'interaction est établie grâce à deux motifs riches en proline (PxxPxR) localisés dans la région N-terminale de RhoU. Le domaine C-terminal est sujet à des modifications post-traductionnelles qui contrôlent l'ancrage membranaire de RhoU. Ainsi, deux fonctions distinctes peuvent être attribuées aux domaines N- et C-terminaux de RhoU : la régulation de son activité par la liaison à des protéines adaptatrices grâce à son domaine N-terminal et la régulation de sa localisation par son domaine C-terminal. Ainsi, il a été montré que RhoU participe à la transmission du signal EGF en formant un complexe avec Grb2 et le récepteur à l'EGF (EGFR) et colocalise avec le complexe au cours de l'endocytose du récepteur.

Afin de mieux comprendre la fonction de RhoU, nous avons entrepris d'identifier de nouveaux partenaires de RhoU. Des données préliminaires obtenues par les Dr. Anne Blangy et Stéphane Ory suggèrent une possible interaction entre Rho et des membres de la famille de l'intersectine (ITSN). Grâce à des expériences de GST-pull down et d'immunoprécipitation, nous avons pu confirmer cette hypothèse et montrer que les deux ITSNs interagissent avec RhoU et que la liaison de RhoU avec l'ITSN1 est médiée par trois des cinq domaines SH3 de l'ITSN1 et par le second motif PxxPxR de RhoU.

Les ITSNs sont connues pour intervenir dans l'endocytose dépendante de la clathrine. Bien que RhoU ait été localisé sur les vésicules d'endocytose positives pour la transferrine (Tf) ou l'EGFR, aucune étude ne s'est intéressée au rôle potentiel de RhoU dans l'endocytose de récepteurs. En utilisant des siRNA spécifiques de RhoU et des ITSNs, nous avons pu montrer par cytométrie en flux et immunofluorescence que l'extinction de RhoU n'a pas d'effet sur l'endocytose de l'EGFR mais augmente celle de la Tf dans les cellules HeLa. En revanche, l'extinction des ITSNs diminue l'endocytose de l'EGFR et seule l'ITSN2 a un effet sur la Tf en augmentant son endocytose. Une première expérience de chasse montre que le recyclage de la Tf est réduit dans les cellules n'exprimant plus RhoU ou les ITSNs indiquant que RhoU et les ITSNs pourraient contrôler les voies de recyclage des récepteurs. Pour confirmer une interaction fonctionnelle potentielle, nous avons co-exprimé RhoU et l'ITSN1 dans les cellules HEK293T. Contrairement aux données publiées, la surexpression de l'ITSN1 n'inhibe pas totalement l'endocytose de la Tf. Cependant, au lieu de s'accumuler dans une région périnucléaire typique des endosomes de recyclage, les vésicules contenant la Tf sont éparpillées dans le cytoplasme. Lorsque RhoU est co-exprimé avec l'ITSN1, les vésicules retrouvent une distribution périnucléaire normale. Cette redistribution n'est cependant pas observée quand un mutant de RhoU ayant perdu la capacité d'interagir avec l'ITSN1 est co-exprimé. De plus, la distribution de l'ITSN1 est modifiée en présence de RhoU. D'ordinaire membranaire et cytoplasmique dans les HEK293T, l'ITSN1 est recrutée sur les vésicules positives pour la Tf quand RhoU est co-exprimé. Cette redistribution n'est pas observée en présence du mutant de RhoU. Cependant, quelque soit sa capacité à interagir avec l'ITSN1, RhoU est toujours localisé sur les endosomes positif pour la Tf. Ces données suggèrent que l'interaction de RhoU avec l'ITSN1 pourraient contrôler le transport des vésicules d'endocytoses de la membrane plasmique vers les endosomes de recyclage et que RhoU recrute l'ITSN1 pour ce processus. Ce travail a donc permis de montrer pour la première fois que le complexe RhoU/ITSN1 intervient dans le contrôle des voies de recyclage endosomales. Je joins ici une première version de l'article qui rassemble l'ensemble de ces données.



Pauline CROISE



Sécrétion des phéochromocytomes : impact sur le développement tumoral et rôle des GTPases Rho

Résumé

La sécrétion d'hormones et de neuropeptides par les cellules neuroendocrines est assurée par un processus d'exocytose, contrôlé notamment par les GTPases Rho. La compréhension des mécanismes moléculaires régulant la sécrétion neuroendocrine est primordiale. En effet, la majorité des cancers neuroendocrines tels que les phéochromocytomes, sont associés à une perturbation du processus de sécrétion. Actuellement, les mécanismes moléculaires qui induisent de telles perturbations de la sécrétion ainsi que l'impact de l'activité sécrétrice sur le développement des tumeurs neuroendocrines ne sont pas élucidés. Mes travaux de thèse proposent pour la première fois un lien fonctionnel direct entre l'activité sécrétrice des cellules et la vitesse de développement des phéochromocytomes ainsi qu'une altération des voies moléculaires impliquant certaines protéines Rho, en démontrant un lien entre la baisse de l'activité de Rac1 et Cdc42 observée dans les phéochromocytomes et la diminution de l'expression de leurs régulateurs ARHGEF1 et FARP1.

Mots clés : Phéochromocytomes, sécrétion, GTPases Rho, développement tumoral

Abstract

Neuroendocrine cells secrete hormones and neuropeptides through calcium-regulated exocytosis, controlled especially by Rho GTPases. Neuroendocrine tumours, such pheochromocytomas, are generally associated with a dysfunction of secretion. Although this aspect is well known by clinicians, it has never been explored at the molecular level. Moreover, the potential link between secretion and tumour development remains uninvestigated. Altogether, our results demonstrate for the first time the importance of secretion in tumor development of pheochromocytomas and an alteration of the Rho GTPase pathway, by demonstrating a link between the inhibition of Rac1 and Cdc42 activity observed in pheochromocytomas and the decrease of their activators ARHGEF1 and FARP1 expression.

Key words : Pheochromocytomas, secretion, Rho GTPases, tumoral development