

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives – CNRS UPR3212

THÈSE présentée par :

Laura STREIT

soutenue le : **1^{er} juillet 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Mécanismes moléculaires de la sécrétion hormonale
et traitement anti-sécrétoire du
phéochromocytome humain**

THÈSE dirigée par :

M. GASMAN Stéphane

Directeur de recherche Inserm, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. DUBESSY Christophe

Maître de conférences hors classe, Université de Rouen-Normandie

Mme GUERINEAU Nathalie

Directrice de recherche CNRS, Université de Montpellier

EXAMINATRICE ET PRESIDENTE :

Mme SIMONNEAUX Valérie

Directrice de recherche CNRS, Université de Strasbourg

INVITÉS :

M. ORY Stéphane

Chercheur CNRS, Université de Strasbourg

REMERCIEMENTS

J'ai réalisé la première partie de ma thèse au sein de l'entreprise de biotechnologies Firalis située à Huningue durant 1 an et 3 mois. J'ai ensuite rejoint mon équipe « Traffic membranaire intracellulaire dans les systèmes nerveux et neuroendocrines » dirigée par les Drs Stéphane Gasman et Nicolas Vitale, au sein de l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives à Strasbourg.

Je souhaiterais tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse, **Nathalie Guerineau**, **Christophe Dubessy**, et **Valérie Simonneaux** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie **Michel Barrot** de m'avoir accueilli dans son laboratoire.

J'adresse des remerciements particuliers à mon directeur de thèse **Stéphane Gasman**, qui m'a encadré depuis le stage de Master, et encouragé lors du difficile passage du concours de l'école doctorale. Merci pour tes conseils et tes nombreuses relectures de dossiers et d'articles (on voit le bout !!). Merci de m'avoir accordé ta confiance pour ce projet, même si les phéos étaient parfois capricieux en manip ! Enfin, merci de m'avoir donné cette opportunité de réaliser une partie de ma thèse en entreprise.

Un très grand merci à **Stéphane Ory** qui a été mon encadrant de manips. Merci d'avoir été disponible pour toutes mes questions ! J'ai également apprécié nos discussions moins scientifiques lors de nos « expéditions phéo » à Nancy !

Mes pensées vont ensuite à **Marion R**, qui m'a également encadré, et initié à la culture de phéo et à l'ampérométrie (parfois compliqué). Merci surtout pour tous nos moments passés ensemble et nos repas partagés le midi ! Merci à **Sophie**, d'avoir été mon binôme de manips lors du lancement du projet, les sécrétions n'ont plus de secret pour nous !! Je suis ravie que notre collaboration se poursuive pour ce projet phéo. Je te souhaite le meilleur dans quelques mois lorsque tu soutiendras aussi ta thèse.

Merci à **Audrey** pour tes qualités humaines et pour m'avoir aidé (très tôt le matin) pour mes nombreuses sécrétions ! Je te souhaite le meilleur pour la suite !
Merci au duo inséparable **Marion M** et **Margherita** pour tous nos moments passés ensemble, j'en garde d'excellents souvenirs.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres de la Team Gasman-Vitale avec lesquels j'ai eu du plaisir à travailler durant mes 4 ans de thèse. **Sylvette** et **Nicolas** merci pour tous nos échanges notamment lors de nos « expéditions abattoir » pour récupérer nos fameuses cellules chromaffines. **Alex**, merci pour ton optimisme perpétuel, c'est toujours agréable de travailler et de discuter dans la bonne humeur ! Je te souhaite le meilleur, surtout maintenant que la culture de cellules chromaffines n'a plus de secret pour toi ! **Claudine**, merci pour ta disponibilité et ton aide, tu es toujours prête à rendre service aux autres ! Enfin, **Michael**, **Sebahat**, **Petra**, **Qili**, **Anne-Marie**, merci pour les échanges que nous avons pu avoir durant ces années.

Merci à **Sylvain Hugel** d'avoir assuré les expériences d'électrophysiologie toujours avec bonne humeur et le sourire, ça a été un plaisir de collaborer avec toi !

Mes remerciements vont également aux personnels hospitaliers du CHRU de Nancy et de l'Hôpital Civil de Strasbourg, et plus particulièrement aux **Pr Laurent Brunaud**, **Dr Michel Vix**, **Pr Didier Mutter** qui ont assuré mon approvisionnement plus ou moins constant en phéochromocytomes.

Je tiens à remercier **Hüseyin Firat** pour m'avoir donné la chance de réaliser une partie de ma thèse au sein de son entreprise.

Merci à mes coloc de bureau, **Marion C** pour les nombreuses qualifications que tu as dû me faire passer et pour mon initiation en purif AKTA. Ton sens de l'humour, nos conversations, et surtout nos débats sur les lapins vont me manquer ! **Guillaume**, le chef prod pour ses conseils toujours avisés et ses qualités humaines.

Un grand merci à **Marine** pour son soutien autour de nos nombreuses tartes flambées et mojitos. **Melek**, pour nos échanges, l'initiation à l'arabe et notre séjour fantastique en Tunisie. Et **Yasemin**, pour sa gentillesse, son aide en manip et sa capacité extraordinaire à prendre des photos sous le bon angle.

Mes remerciements vont également à la Team spectrométrie-orbitrap : **Maïté** et **Maëva** pour tous leurs coups de folie et leurs nombreuses blagues hilarantes qui ont animé le labo !

Un grand merci à **Samira** pour sa bonne humeur contagieuse et nos discussions beauté & **Miloud** pour sa gentillesse et la découverte des pâtisseries marocaines !

Merci à **Pascale** pour ses conseils en transfection et culture d'hybridomes.

Enfin, je tiens à remercier l'ensemble du personnel de Firalis qui ont permis le déroulement de cette partie de mon projet.

Un immense merci à la Robertsau Team !! **Emeline** et **Mathieu**, merci pour votre soutien et de m'avoir permis de décompresser lors de nos apéros en provenance de la cave à terroirs, nos soirées raclettes, restaurants et j'en passe ! Merci pour tous ces échanges, rires et bons moments passés ensemble (Mathieu le canoë attend encore ta vengeance) !

À mes amis de longue date : **Aurélie**, **Marion H**, **Aline** merci pour votre soutien depuis toutes ces années.

Un merci tout particulier à **Nicolas**, tu t'es toujours intéressé à mon projet, et tu as fait preuve d'un soutien sans faille à toutes les étapes de cette thèse. Merci pour ton énergie et tes encouragements quotidiens, et de n'avoir jamais douté de ma réussite. Merci d'apporter tellement de bons moments et de positif à ma vie.

Pour finir, un merci infini à mes parents, vous m'avez donné l'opportunité de faire toutes ces années d'études. Merci d'essayer de comprendre de temps en temps les mystères du phéochromocytome !! Merci à mamie et papy, mes vacances à « Wittring plage » sont toujours une bulle d'oxygène et de positivité dans ma vie. Une pensée à mes deux autres grands parents qui auraient été fiers de ce que j'ai accompli.... À mes deux sœurs, **Sophie**, merci pour ton soutien, tes relectures pointilleuses et nos bons moments passés avec Schnouki à la maison. **Anaïs**, merci d'avoir été mon binôme, mon repère depuis notre naissance. Depuis toutes ces années nous avons partagé nos joies, nos peines et surtout nos réussites, merci d'être toujours présente.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC	Adénylate Cyclase
ACTH	<i>Adreno CorticoTropic Hormone</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	Adénosine MonoPhosphate Cyclique
APUD	<i>Amine content and amine Precursor Uptake and Decarboxylation</i>
Arf6	<i>ADP-Ribosylation Factor 6</i>
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
Arp2/3	<i>Actin Related Protein 2/3 complex</i>
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bax	<i>Bcl-2-Associated X</i>
BIM23014	Lanréotide
Cdc42	<i>Cell Division Control protein 42 homolog</i>
CEA	<i>CarcinoEmbryonic Antigen</i>
CGA	ChromoGranine A
CGB	ChromoGranine B
Cl ₅₀	Concentration Inhibitrice Médiane
DAG	DiAcylGlycérol
DD	Dopamine Décarboxylase
DβH	Dopamine-β-Hydroxylase
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
GHIH	<i>Growth Hormone-Inhibiting Hormone</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
IGF-II	<i>Insulin-like Growth Factor-II</i>
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEN2	<i>Multiple Endocrine Neoplasia type 2</i>

Munc	<i>Mammalian UNCoordinated protein</i>
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NPY	<i>NeuroPeptide Y</i>
N-WASP	<i>Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein</i>
NSE	<i>Neuron Specific Enolase</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide-Sensitive Fusion protein</i>
OCT	<i>Octréotide</i>
PA	<i>Acide Phosphatidique</i>
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
PASS	<i>Pheochromocytoma of the Adrenal gland Scaled Score</i>
PGL	<i>ParaGangLiome</i>
PET/CT	<i>Positron Emission Tomography/Computed Tomography</i>
PHD	<i>Prolyl-Hydroxylase</i>
PHEO	<i>Phéochromocytome</i>
PI 4-kinase	<i>Phosphatidylinositol 4-kinase</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>
PKA	<i>Protéine Kinase A</i>
PLD	<i>PhosphoLipase D</i>
PNMT	<i>Phényléthanolamine N-Méthyl-Transférase</i>
PPGL	<i>Phéochromocytome et ParaGangLiome</i>
PRL	<i>PRoLactine</i>
PRRT	<i>Peptide Receptor Radionuclide Therapy</i>
PSA	<i>Prostate-Specific Antigen</i>
PSAP	<i>Prostatic-Specific Acid Phosphatase</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RalA	<i>Ras-related protein Ral-A</i>
RE	<i>Réticulum Endoplasmique</i>
REST	<i>RE-1 Silencing Transcription factor</i>
Rho	<i>Ras homologous protein</i>

RhoA	<i>Ras Homolog family member A</i>
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SDHB	<i>Succinate DésHydrogénase sous-unité B</i>
SMS 201–995	<i>Octréotide</i>
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNAP-25	<i>SyNaptosomal-Associated Protein, 25 kDa</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
SOM230	<i>Pasiréotide</i>
SRIF	<i>Somatotropin Release-Inhibiting Factor</i>
SST	<i>Somatostatine</i>
SSTR	<i>Récepteur de la somatostatine</i>
TGN	<i>Trans-Golgi Network</i>
TH	<i>Tyrosine Hydroxylase</i>
TNE	<i>Tumeur NeuroEndocrine</i>
TNE-GEP	<i>Tumeur NeuroEndocrine Gastro-Entéro-Pancréatique</i>
t-SNARE	<i>target SNARE</i>
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
VAMP-2	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein 2</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>
VMA	<i>VanillylMandelic Acid</i>
VMAT	<i>Vesicular MonoAmine Transporter</i>
v-SNARE	<i>vesicular SNARE</i>
5-HIAA	<i>Acide 5-hydroxyindolacétique</i>

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	1
INTRODUCTION.....	5
1. Le système neuroendocrinien : physiologie et tumeurs.....	5
1.1. Généralités	5
1.2. Les cellules neuroendocrines	6
1.3. La régulation de fonctions vitales	7
1.4 Les tumeurs neuroendocrines et l'hypersécrétion	8
1.4.1. Généralités	8
1.4.2. La problématique de l'hypersécrétion	9
2. La glande médullosurrénale et le phéochromocytome	11
2.1. Anatomie et histologie de la glande surrénale	11
2.2. Les cellules chromaffines	12
2.3. Processus de sécrétion par les cellules chromaffines	12
2.3.1 Les granules de sécrétion à cœur dense	12
2.3.1.1. Le contenu granulaire	12
2.3.1.2. Biogenèse.....	13
2.3.1.3. Maturation.....	15
2.3.2. L'exocytose régulée.....	17
2.3.3. La régulation de l'exocytose	19
2.4. Effets physiologiques des molécules libérées par les cellules chromaffines	21
2.5. Le phéochromocytome	25
2.5.1. Généralités	25
2.5.2. Historique.....	26
2.5.3. Epidémiologie	27
2.5.4. Symptômes cliniques.....	27
2.5.5 Les phéochromocytomes malins	28
2.5.6. La génétique	29
2.5.6.1. Predisposition	29
2.5.6.2. Cluster 1 : la voie pseudohypoxique	32
2.5.6.3. Clusters 2 et 3 : les voies des récepteurs tyrosine kinases et Wnt	33
2.5.6.4. Les multiples conséquences des mutations.....	35
2.5.6.5. De la génétique au phénotype	35
2.5.7. Diagnostic biochimique et imagerie.....	36
2.5.8. Prise en charge clinique du phéochromocytome	37
2.5.8.1. Gestion préopératoire de la tumeur.....	37
2.5.8.2. Approche chirurgicale	38
2.5.8.3. Management postopératoire du patient.....	39
2.5.8.4. Les phéochromocytomes malins et inopérables : des cas complexes pour la prise charge.....	40
3. Les analogues somatostatinerigiques : un espoir de traitement anti-sécrétoire.....	41
3.1. La somatostatine	41
3.1.1. Découverte et historique.....	41
3.1.2. Biosynthèse	41
3.1.3. Les récepteurs somatostatinerigiques et leurs signalisations	43
3.1.3.1. Action anti-sécrétoire.....	43
3.1.3.2. Autres actions	44

3.1.4. Fonctions physiologiques de la somatostatine.....	45
3.2. Les analogues de la somatostatine : les nouvelles molécules employées en cancérologie	46
3.2.1. Du développement à aujourd'hui.....	46
3.2.2. Les récepteurs de la somatostatine et les tumeurs neuroendocrines.....	48
3.2.3. Les effets secondaires.....	51
3.2.4. Utilisation en médecine nucléaire.....	51
RÉSULTATS	53
1. Publication n°1 : Étude des mécanismes de l'exocytose régulée par le calcium dans le phéochromocytome humain	53
1.1. Objectifs et déroulement de l'étude.....	53
1.2. Résultats.....	53
2. Publication n°2 : Effet des analogues de la somatostatine sur la sécrétion de catécholamines par les cellules de phéochromocytomes humains	55
2.1. Objectifs et déroulement de l'étude.....	55
2.2. Résultats.....	56
DISCUSSION GÉNÉRALE ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES	57
1. Critique méthodologique	57
1.1. Les modèles utilisés	57
1.2. La sécrétion mesurée sur des cellules en culture primaire est-elle le reflet de la sécrétion tumorale ?.....	59
2. L'hypersécrétion tumorale : quels mécanismes possibles ?	61
3. Effet fonctionnel des analogues de la somatostatine	64
3.1. Octréotide et SOM230, un impact différent sur la sécrétion catécholaminergique	64
3.2. Mode d'action du SOM230.....	69
4. Le SOM230 : vers les prémices d'un traitement de l'hypersécrétion ?	72
4.1. Dose utilisée	72
4.2. Effet anti-sécrétoire du SOM230 en clinique.....	74
4.3. Effet pro-tumoral des catécholamines et molécules sécrétées par les phéochromocytomes ...	76
4.4. Le SOM230 une molécule aux multiples actions anti-tumorale	78
4.5. Quelles sont les limites de l'utilisation du SOM230 ?.....	80
4.5.1. Le récepteur nicotinique	80
4.5.2. Les effets secondaires du SOM230	81
4.6. Les drogues anti-sécrétoire pour le traitement du phéochromocytome.....	82
5. Vers une amélioration du diagnostic du phéochromocytome humain ?	85
5.1. Problématique	85
5.2. Découverte de nouveaux biomarqueurs	86
CONCLUSION.....	89

MATÉRIELS ET MÉTHODES	91
1. Réactifs	91
2. Échantillons de phéochromocytomes humains	91
3. Culture cellulaire	91
3.1. Culture primaire de cellules chromaffines bovines.....	91
3.2. Culture primaire de cellules chromaffines humaines issues de phéochromocytome	92
4. Techniques biochimiques	93
4.1. Détection des récepteurs à la somatostatine par Western-blot	93
4.2. Dosage des catécholamines par méthode fluorimétrique	94
5. Mesure de la sécrétion des catécholamines par ampérométrie à fibre de carbone	96
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97
ANNEXES	129

AVANT-PROPOS

Le système neuroendocrinien assure de nombreuses fonctions de commande de l'organisme en sécrétant des hormones ainsi que des neuropeptides dans la circulation sanguine. Dans les cellules neuroendocrines, ces molécules sont stockées dans des granules de sécrétion puis libérées par un processus d'exocytose régulé par le calcium. Ce mécanisme permet l'acheminement des granules vers la membrane plasmique et la libération du contenu granulaire dans l'espace extracellulaire. Ce type d'exocytose apparaît comme un processus crucial, qui doit être étroitement contrôlé car la dérégulation de la sécrétion neuroendocrine est associée à diverses pathologies dont les tumeurs neuroendocrines.

Malheureusement, toutes les cellules neuroendocrines de l'organisme peuvent se transformer en cellules tumorales et potentiellement engendrer des cancers. Bien que constituant un groupe très hétérogène, les tumeurs neuroendocrines possèdent une caractéristique commune intéressante qui est un dysfonctionnement de leur activité sécrétrice entraînant, dans la majorité des cas, une hypersécrétion des hormones et peptides qu'elles stockent. Cette sécrétion anarchique pose problème car elle peut engendrer des conséquences cliniques graves chez les patients. À ce jour, les mécanismes moléculaires qui induisent et maintiennent l'hypersécrétion de ces tumeurs ne sont pas connus et il n'existe aucune thérapie ciblée permettant de l'empêcher.

L'équipe des Drs Gasman et Vitale s'attache à décrypter les mécanismes moléculaires qui contrôlent les processus d'exocytose et d'endocytose au sein des systèmes nerveux et neuroendocrines, et à en révéler les altérations potentielles dans des pathologies importantes. Dans ce contexte, l'équipe a développé, il y a quelques années, un projet de recherche qui s'intéresse à l'hypersécrétion des cellules neuroendocrines tumorales. Forte de son expertise dans les mécanismes de la sécrétion neuroendocrine et de sa connaissance de la cellule chromaffine, l'équipe a choisi d'utiliser comme modèle expérimental le phéochromocytome, une tumeur neuroendocrine de la glande médullosurrénale.

J'ai toujours été attirée par ces deux grands domaines de la biologie que sont la cancérologie et la neurobiologie avec un intérêt particulier pour l'aspect cellulaire. Ainsi, ce projet sur les tumeurs neuroendocrines répondait à toutes mes attentes et m'a tout de suite beaucoup plu. J'ai démarré mon stage de Master 2 de Neurosciences en me familiarisant avec le modèle des cellules chromaffines et en commençant à défricher le projet sur l'action potentielle d'analogues somatostatinerigiques sur la sécrétion des catécholamines. Au cours de mon Master, Stéphane Gasman démarrait un projet en collaboration avec deux entreprises, Caprion à Montréal au Canada et Firalis à Huningue en France. Ce projet collaboratif a commencé par une analyse en spectrométrie de masse du profil protéique de plasmas d'une cohorte de 40 patients atteints de phéochromocytome, en les comparant au profil protéique de plasmas d'une cohorte de volontaires sains, ils ont pu mettre en évidence deux combinaisons de biomarqueurs potentiels permettant de distinguer les patients des sujets contrôles avec une sensibilité et une spécificité supérieures au test actuellement utilisé. À la fin de mon Master, j'hésitais longuement à me lancer dans un doctorat. Cependant, me destinant à une carrière dans l'industrie, le projet collaboratif avec les deux entreprises sur la mise au point de nouveaux outils de diagnostic m'attirait fortement. C'est ainsi que j'ai tenté l'aventure d'une thèse à l'interface entre la recherche académique et la recherche industrielle.

J'ai réalisé la première partie de ma thèse au sein de l'entreprise Firalis (1 an et 3 mois) sur le projet de développement de nouveaux outils permettant, à terme, la mise au point d'un test diagnostique plus fiable du phéochromocytome. Cette immersion dans le monde de l'entreprise a été très enrichissante et m'a beaucoup appris sur le fonctionnement de la recherche privée. D'un point de vue technique, j'ai pu y acquérir de nouvelles compétences comme la production de protéines recombinantes et la fabrication d'anticorps monoclonaux nécessaires au développement de tests ELISA. Le projet est toujours en cours et, essentiellement pour des raisons de confidentialité, cette partie ne sera pas approfondie dans le manuscrit mais simplement abordée dans la discussion générale.

Après ces 15 mois en entreprise, j'ai poursuivi ma thèse à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives. Mes résultats prometteurs de Master 2 montrant une action inhibitrice d'un analogue de la somatostatine sur la sécrétion des catécholamines dans les cellules chromaffines bovines devaient être poursuivis, notamment en testant cet analogue sur des cellules tumorales humaines de phéochromocytomes. C'est à partir de ce moment que j'ai passé de longues heures au poste d'ampérométrie à fibre de carbone. J'ai utilisé cette technique pour mesurer la sécrétion des catécholamines à partir de cellules chromaffines tumorales humaines cultivées directement à partir de phéochromocytomes fraîchement opérés. Mon objectif ici était double : caractériser le profil sécrétoire des cellules chromaffines tumorales afin d'en aborder les mécanismes sous-jacents, et tenter d'inhiber cette sécrétion tumorale anarchique par l'action des analogues somatostatinerigiques. Entamé depuis plusieurs années déjà au laboratoire, le premier axe de recherche visait à caractériser la sécrétion catécholaminergique des phéochromocytomes. Ma participation a permis d'analyser plus de tumeurs et d'obtenir assez d'analyses pour dresser les premières hypothèses. Nous avons ainsi montré que l'hypersécrétion est bien la conséquence d'une dérégulation du processus d'exocytose et non pas simplement un effet de masse dû à la prolifération tumorale. Ce constat fût appuyé par un crible protéomique, auquel je n'ai pas participé, qui a montré que de nombreuses protéines de l'exocytose voient leur expression modifiée dans le phéochromocytome en comparaison au tissu non tumoral. Le second axe fut la continuité de mon travail de Master 2, et m'a permis de montrer que le pasiréotide a une action inhibitrice efficace sur la sécrétion des phéochromocytomes humains, ouvrant ainsi des perspectives très intéressantes en clinique. Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai participé à trois axes de recherche ayant pour but d'améliorer la compréhension, le diagnostic et le traitement de l'hypersécrétion du phéochromocytome.

La première partie de ce manuscrit consiste en une introduction générale dans laquelle je présente le système neuroendocrinien ainsi que les tumeurs neuroendocrines qui en dérivent, tout en insistant sur la problématique de l'hypersécrétion. Je me focalise ensuite sur la glande surrénale et les cellules chromaffines, en m'attardant sur le processus d'exocytose ainsi que le rôle physiologique des molécules libérées. J'enchaîne sur une description détaillée du

phéochromocytome, allant de sa découverte jusqu'aux connaissances actuelles en termes de clinique, génétique et diagnostic. Je termine en introduisant la somatostatine et le développement de ses analogues en pointant leurs intérêts et leurs utilisations cliniques. La deuxième partie de mon manuscrit présente mes résultats, intégrés avec d'autres, sous la forme d'un article scientifique soumis et d'un article en préparation. La troisième partie est constituée d'une discussion générale qui inclut quelques résultats complémentaires. Je clos ce manuscrit avec une conclusion générale de mes travaux de thèse. Enfin, je décris l'ensemble du matériel et des méthodes que j'ai utilisés lors de ma thèse. En complément, vous trouverez la liste détaillée des interventions scientifiques que j'ai effectuées au cours de mon doctorat, ainsi que la revue sur la sécrétion des tumeurs neuroendocrines et les GTPases de type Rho, que j'ai écrite afin de compenser l'absence de mes précieux phéochromocytomes lors du premier confinement de la pandémie de la COVID-19.

Je vous souhaite une agréable lecture.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Le système neuroendocrinien : physiologie et tumeurs

1.1. Généralités

Le système neuroendocrinien est formé par l'ensemble des glandes et cellules neuroendocrines de l'organisme qui permettent le maintien de l'équilibre fonctionnel indispensable à la vie. En effet, les cellules qui le constituent ont une capacité à produire des hormones et des neuropeptides qui sont déversés dans la circulation sanguine. Une fois libérées, ces molécules vont agir sur leurs récepteurs cibles, permettant le contrôle des fonctions de l'organisme.

En 1870, Heidenhain décrit pour la première fois une population de cellules neuroendocrines dans l'intestin grêle, puis en 1938, Feyrter pose l'hypothèse d'un système neuroendocrinien diffus (de Herder *et al.*, 2016). En effet, les cellules neuroendocrines sont ubiquitaires dans l'organisme, une partie est dispersée à l'intérieur d'un organe ou d'un tissu, formant ce qu'on appelle le système endocrinien diffus, où elles sont disposées en groupe à proximité des capillaires. Des cellules neuroendocrines sont ainsi dispersées dans le tractus gastro-entéro-pancréatique et pulmonaire. Elles sont également présentes dans une moindre mesure dans les voies urogénitales et la peau. Tandis qu'une autre partie des cellules forme des organes endocriniens tels que l'hypothalamus, l'hypophyse ou la glande médullosurrénale. Le pancréas endocrine n'a pas de classification clairement définie et peut appartenir à l'un des groupes (**Figure 1**) (Montuenga *et al.*, 2003).

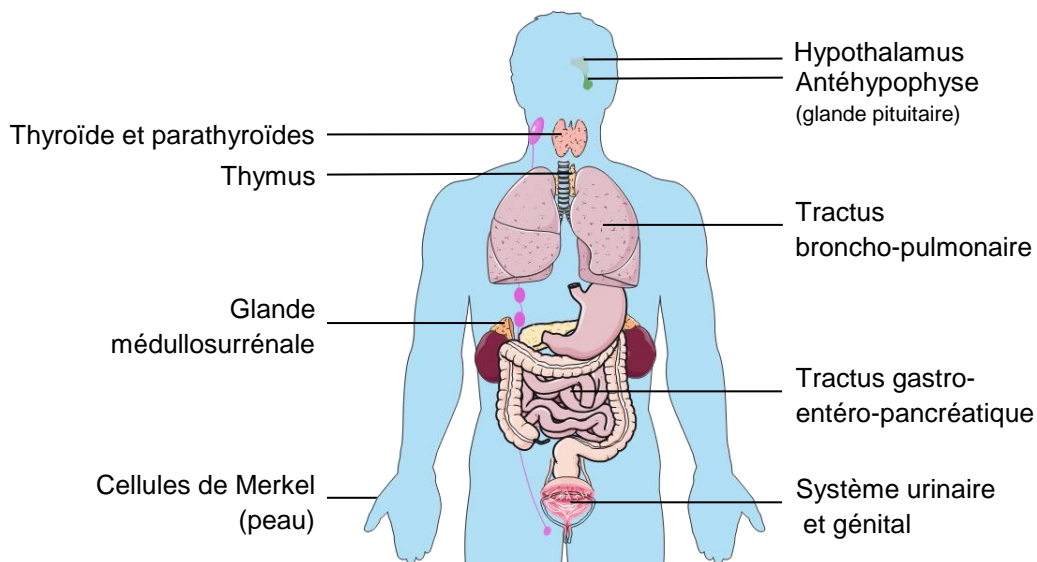


Figure 1 : Représentation du système neuroendocrinien et localisation des cellules neuroendocrines dans le corps humain. Une partie des cellules neuroendocrines est dispersée dans l'organisme formant le système neuroendocrinien diffus, tandis qu'une partie forme des organes à part entière.

1.2. Les cellules neuroendocrines

Les cellules neuroendocrines ont diverses origines embryologiques. Ainsi, la crête neurale donne naissance aux cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, aux cellules principales des paraganglions extra-surrénaux et aux cellules C thyroïdiennes (Adams *and* Bronner-Fraser, 2009), tandis que les cellules neuroendocrines intestinales, pancréatiques et pulmonaires dérivent de l'endoderme (Andrew *et al.*, 1998).

Bien que d'origines diverses et dispersées dans tout l'organisme, les cellules neuroendocrines partagent des caractéristiques communes qui sont de stocker et de sécréter des amines biogènes et des peptides de faible poids moléculaire qui peuvent ou non être des hormones (**Tableau 1**). Ces cellules sont regroupées sous le terme de « *amine content and amine precursor uptake and decarboxylation* » (APUD) (Pearse *and* Takor, 1976). Le phénotype neuroendocrinien inclut également la présence de marqueurs de surface tels que la protéine « *neural cell adhesion molecule* » (NCAM), des marqueurs vésiculaires comme les chromogranines, sécrétogranines. Sont également retrouvées des protéines cytoplasmiques telles que la « *neuron specific enolase* » (NSE), des protéines de liaison au calcium et au cytosquelette (Bishop *et al.*, 1988; Montuenga *et al.*, 2003). Les cellules neuroendocrines stockent des hormones et neuropeptides dans de larges vésicules

à cœur dense encore appelées granules de sécrétion, d'un diamètre variant de 100 à 400 nm, leur composition riche en granines, glycoprotéines et peptides les rendent denses en microscopie électronique (Vardjan *et al.*, 2013).

Organes	Hormones et neuropeptides sécrétés
Hypothalamus	CRH, GHRH, GnRH, TRH
Antéhypophyse (glande pituitaire)	ACTH, FSH, LH, TSH, GH, PRL, MSH
Thyroïde / parathyroïde	Calcitonine, PTH
Thymus	Thymuline, thymosine, thymopoïétine
Tractus broncho-pulmonaire	CGRP, bombésine, sérotonine, calcitonine
Glande médullosurrénale	Catécholamines
Tractus gastro-entéro-pancréatique	Gastrine, insuline, glucagon, somatostatine, VIP, PP, sérotonine, tachykinine, prostaglandines, histamine
Système génital et urinaire	Sérotonine, catécholamines, calcitonine
Peau	Substance P, CGRP

Tableau 1 : Principales hormones et neuropeptides sécrétés par les cellules neuroendocrines de l'organisme. ACTH : adrenocorticotrop hormone, CGRP : calcitonin gene-related peptide, CRH : corticotropin-releasing hormone, FSH : follicle-stimulating hormone, GH : growth hormone, GnRH : gonadotropin-releasing hormone, GHRH : growth hormone-releasing hormone, LH : luteinizing hormone, MSH : melanocyte-stimulating hormone, PP : pancreatic polypeptide, PRL : prolactin, PTH : parathyroid hormone, TRH : thyrotropin-releasing hormone, TSH : thyroid-stimulating hormone, VIP : vasoactive intestinal peptide.

1.3. La régulation de fonctions vitales

Le système neuroendocrinien assure divers rôles au sein de l'organisme, il va notamment participer au maintien et au contrôle de fonctions indispensables telles que la croissance, la digestion ou encore le métabolisme des glucides. À titre d'exemples, les cellules neuroendocrines présentes dans l'hypophyse libèrent de l'hormone de stimulation de la thyroïde (TSH) qui stimule la sécrétion d'hormones thyroïdiennes par la thyroïde, tandis que la sécrétion de catécholamines et de glucocorticoïdes par la glande surrénale en réponse au stress est sous contrôle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) (Malcolm, 2016). Les cellules entérochromaffines présentes dans les glandes gastriques libèrent de la gastrine et de l'histamine qui vont stimuler la production d'acide gastrique impliqué dans le processus de digestion (Schubert, 2015). Enfin, au niveau pulmonaire, les cellules vont sécréter des neuropeptides et des neurotransmetteurs afin de moduler la réponse immunitaire en cas de troubles pulmonaires inflammatoires (**Tableau 1**) (Garg *et al.*, 2019).

1.4 Les tumeurs neuroendocrines et l'hypersécrétion

1.4.1. Généralités

L'ensemble des cellules neuroendocrines de l'organisme peuvent se transformer en cellules tumorales et donner naissance à une tumeur neuroendocrine (TNE). Ce sont des néoplasmes se formant à partir de ces cellules sécrétrices d'hormones dispersées dans tout l'organisme. Diverses localisations des TNE sont donc possibles : l'hypophyse, la thyroïde et les parathyroïdes, le thymus, les tractus pulmonaire et gastro-entéro-pancréatique, la glande médullosurrénale, la peau et le système uro-génital. L'incidence des TNE n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies avec 1,1 cas/10 000 personnes en 1973 à 7 cas/10 000 personnes en 2012 soit une augmentation de plus de 6 fois. Les TNE les plus fréquentes sont retrouvées dans les poumons et le tractus gastro-entéro-pancréatique (Dasari *et al.*, 2017). L'incidence ainsi que le pronostic sont dépendants des origines ethniques (Shen *et al.*, 2019).

L'apparition des TNE est influencée par différents facteurs tels que l'histoire familiale. Des mutations dans plusieurs gènes jouent un rôle prépondérant dans l'apparition et le développement de ces tumeurs. D'autres facteurs comme le tabagisme et la consommation d'alcool sont connus pour augmenter les risques de cancers et sont également associés à l'apparition de certaines TNE. Par exemple, la présence de TNE pancréatiques est associée positivement à la consommation d'alcool et de tabac, tandis que pour l'intestin grêle seul le tabagisme reste associé (Leoncini *et al.*, 2016). L'évolution de ces tumeurs est également très variable, par exemple le phéochromocytome qui est une tumeur originaire de la glande médullosurrénale est métastatique dans 10 à 20% des cas, tandis que le carcinome du poumon à petites cellules est hautement agressive, avec plus de 60% des patients qui développent des métastases (Bernhardt *and* Jalal, 2016; Buffet *et al.*, 2020).

1.4.2. La problématique de l'hypersécrétion

Ainsi, les TNE constituent un groupe très hétérogène du point de vue de leur origine embryologique, localisation et de leur évolution. Néanmoins, les TNE possèdent une caractéristique commune intéressante. En effet, la majorité d'entre elles présentent un dysfonctionnement de leur activité sécrétrice entraînant une hypersécrétion non contrôlée des hormones et peptides qu'elles stockent (Gratzl *et al.*, 2004) (**Tableau 2**). Cette hypersécrétion anarchique est à l'origine des différents symptômes. Par exemple, un carcinome gastro-intestinal dérivant de cellules entérochromaffines est lié à une hypersécrétion de sérotonine et de gastrine entraînant bouffées de chaleurs, diarrhées et douleurs abdominales (Rubin de Celis Ferrari *et al.*, 2018). Une libération excessive de catécholamines est en revanche caractéristique des phéochromocytomes et de certains paragangliomes provoquant une hypertension persistante ou paroxystique (Tsirlin *et al.*, 2014). Enfin, l'acromégalie, un trouble hormonal lié à une hypersécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse se caractérise par une croissance disproportionnée du squelette, des tissus et des organes (Dineen *et al.*, 2017). Cette hypersécrétion hormonale anarchique des TNE pose donc problème, car elle entraîne fréquemment des conséquences cliniques graves.

De plus, l'activité sécrétrice des TNE pourrait favoriser le développement et l'agressivité tumorale. Par exemple, le carcinome pulmonaire à petites cellules, une tumeur très agressive, sécrète divers neuropeptides et facteurs de croissance qui, par leur action autocrine et/ou paracrine, accélèrent la croissance tumorale (Cuttitta *et al.*, 1985; Song *et al.*, 2003). De plus, des tumeurs non fonctionnelles, sans activité sécrétoire peuvent devenir hautement sécrétrices avec un impact négatif sur le pronostic du patient. En devenant sécrétrices ces tumeurs développent un phénotype agressif avec une capacité métastatique. Brown et collaborateurs ont rapporté la transformation d'un adénome pituitaire silencieux en un carcinome pituitaire sécrétant de la TSH et de la prolactine (PRL) avec l'apparition de métastases cérébrales (Brown *et al.*, 2006). Les adénomes pituitaires non sécrétants peuvent également se transformer en maladie de Cushing synonyme de libération d'ACTH plusieurs années après la détection de la tumeur primaire (Holthouse *et al.*, 2001; Daems *et al.*, 2009; Annamalai *et al.*, 2012; Melcescu *et al.*, 2013). Enfin, des

TNE pancréatiques non fonctionnels peuvent se transformer en insulinomes malins producteurs d'insuline plusieurs années après le diagnostic initial (Juhlin *et al.*, 2019). L'acquisition de ce phénotype sécrétoire a été associée à un comportement tumoral plus agressif et la détection de métastases.

Tumeurs neuroendocrines	Hormones et peptides principaux sécrétés
Adénome ou carcinome pituitaire	ACTH, GH, PRL, FSH, LH, TSH
Carcinome médullaire de la thyroïde, adénome ou carcinome parathyroïdien	Calcitonine, CEA, PTH
TNE du thymus ou tumeur carcinoïde thymique (tumeur carcinoïde atypique, carcinome à petites cellules, carcinome neuroendocrinien à grandes cellules)	ACTH, GHRH
TNE pulmonaire ou tumeur carcinoïde des poumons (tumeur carcinoïde pulmonaire typique ou atypique, carcinome ou cancer du poumon à petites cellules, carcinome neuroendocrinien à grandes cellules)	ACTH, ADH
Phéochromocytome/paragangliome	Catécholamines
TNE gastro-entéro-pancréatique (insulinome, glucagome, gastrinome, somatostatine, VIPome, PPome, carcinome neuroendocrinien à petites ou grandes cellules)	Insuline, glucagon, gastrine, sérotonine, somatostatine, VIP, PP
Carcinome neuroendocrinien de la vessie (tumeur carcinoïde, carcinome à petites cellules, carcinome neuroendocrinien à grandes cellules)	/
TNE du col utérin ou carcinome neuroendocrinien du col de l'utérus (tumeur carcinoïde typique ou atypique, carcinome à petites cellules, carcinome neuroendocrinien à grandes cellules)	/
Cancer neuroendocrinien de la prostate (carcinome neuroendocrinien à petites ou grandes cellules, carcinome neuroendocrinien mixte, tumeur carcinoïde, adénocarcinome avec différenciation neuroendocrinienne à cellules de Paneth)	CEA, PSA
Carcinome neuroendocrinien de la peau ou carcinome à cellules de Merkel	/

Tableau 2 : Catégories et sous catégories des différentes tumeurs neuroendocrines ainsi que les principaux peptides et hormones sécrétés. En fonction de leur localisation les tumeurs neuroendocrines sécrètent une variété de composés. ACTH : adrenocorticotrop hormone, ADH : antidiuretic hormone, CEA : carcinoembryonic antigen, FSH : follicle-stimulating hormone, GH : growth hormone, GHRH : growth hormone-releasing hormone, LH : luteinizing hormone, PP : pancreatic polypeptide, PRL : prolactine, PSA : prostate-specific antigen, PTH : parathyroid hormone, TSH : thyroid-stimulating hormone, VIP : vasoactive intestinal peptide.

2. La glande m dulosurr nale et le phéochromocytome

2.1. Anatomie et histologie de la glande surrénale

Le corps humain est constitué de deux glandes surrénales, non symétriques, situ es au-dessus de chaque rein dans l'espace périrénal. Ces glandes ont une forme concave, et chacune est compos e de deux unités fonctionnelles : la partie externe appel e cortex ou corticosurrénale et la partie interne nomm e médulla ou m dulosurr nale (**Figure 2**). Ces dernières sont envelopp es par un tissu fibreux dense, la capsule. La médulla et le cortex ont des origines embryologiques et des fonctions distinctes au sein de l'organisme.

La corticosurrénale dérive du mésoderme et est constitu e de 3 couches au rôle distinct. De l'extérieur vers l'intérieur de la structure : la zone glomérulée secrète des minéralocorticoïdes comme l'aldostérone, la zone fascicul e libère des glucocorticoïdes, tels que le cortisol et la corticostérone, enfin la zone r ticul e assure la production des androgènes. La m dulosurr nale est originaire de l'ectoderme ; elle appartient au système nerveux sympathique et libère des catécholamines. La glande surrénale est constitu e   80% de la partie corticale et 20% de la partie médullaire (Mitty, 1988; Kemppainen *and* Behrend, 1997).

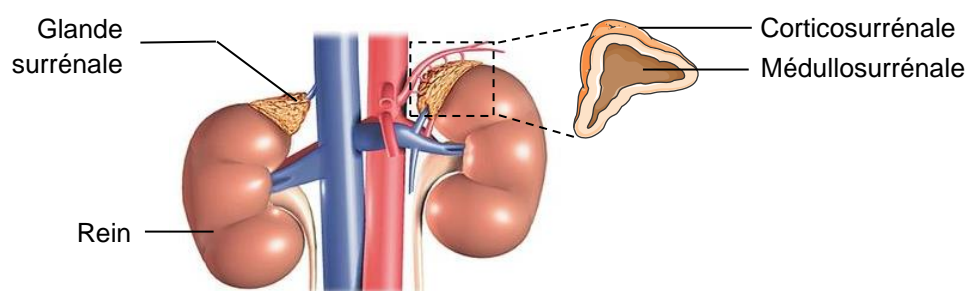


Figure 2 : Schéma de la glande surrénale avec ses deux unités fonctionnelles. La corticosurrénale est en position externe et la m dulosurr nale en position interne.

2.2. Les cellules chromaffines

Au sein de la glande médullosurrénale, deux populations de cellules chromaffines sont présentes, les cellules adrénériques libèrent de l'adrénaline et représentent 70 à 80% des cellules, et les cellules noradrénériques sécrètent de la noradrénaline et constituent 20 à 30% de la population. Ces deux populations cellulaires se différencient par la présence de la phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT), l'enzyme assurant la conversion de la noradrénaline en adrénaline, qui est uniquement présente dans les cellules adrénériques (Pérez-Alvarez *et al.*, 2010).

2.3. Processus de sécrétion par les cellules chromaffines

2.3.1 Les granules de sécrétion à cœur dense

2.3.1.1. Le contenu granulaire

Les granules de sécrétion occupent environ 13% du volume cytoplasmique d'une cellule chromaffine, et chacune d'elle peut contenir environ 10 000 à 30 000 granules (Vitale *et al.*, 1995; Plattner *et al.*, 1997). La composition de ces organelles est complexe et se caractérise par une forte concentration en protéines. En effet, en plus des catécholamines, le contenu intragranulaire comprend des hormones peptidiques, des protéines de la famille des granines telles que les chromogranines A (CGA) et B (CGB), et les sécrétogranines II, III, V, VI mais aussi des glycoprotéines, des enzymes comme des pro-hormones convertases et d'autres molécules non protéiques (l'ATP, le calcium,...) (Crivellato *et al.*, 2008; Takeuchi *and* Hosaka, 2008; Estévez-Herrera *et al.*, 2016) (**Tableau 3**). Représentant plus de 80% des protéines solubles des granules, les granines sont largement majoritaires, la CGA à elle seule représentant 40% (Crivellato *et al.*, 2008).

Catégories	Constituants
Granines	Chromogranines A, B, sécrétogranines II, III, V, VI
Glycoprotéines	Glycoprotéines I à V (I : D β H, IV : H ⁺ -ATPase)
Enzymes de clivage des pro-hormones	Cathepsine L, aminopeptidase B, PC1, 2, 3, carboxypeptidase E, protéinase aspartique, activateur tissulaire du plasminogène
Inhibiteurs de protéases endogènes	Endopines 1, 2
Peptides	Peptides opioïdes, neuropeptide Y, bombésine, TGF- β , neurotensine, sécrétoneurine, peptides natriurétiques, adrénomédulline, CGRP, vasostatines, catestatine, cateslytine, chromacine, sécrétolytine, ubiquitine (peptides mineurs : arginine-vasopressine, substance P, VIP, guanyline, galanine)
Monoamines	Catécholamines, sérotonine
Autres constituants mineurs	Coenzyme A glutathion disulfure, précurseurs amyloïdes d'Alzheimer, nucléotides (ATP, GTP, UTP, ADP, AMP, GDP, UDP), acide ascorbique, ions (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻), mucopolysaccharides

Tableau 3 : Présentation des constituants des granules de sécrétion à cœur dense des cellules chromaffines. CGRP : calcitonin gene-related peptide, D β H : dopamine β -hydroxylase, PC : pro-hormone convertase, TGF- β : transforming growth factor- β , VIP : vasoactive intestinal peptide. Adapté de (Crivellato *et al.*, 2008).

La biogenèse et la maturation de ces granules de sécrétion requièrent différentes étapes avant la libération du contenu intragranulaire dans l'espace extracellulaire.

2.3.1.2. Biogenèse

Les neuropeptides granulaires sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme de précurseurs. Ces derniers sont ensuite transportés vers l'appareil de Golgi puis empaquetés avec leurs enzymes de conversion dans les granules de sécrétion encore immatures au niveau du *trans-Golgi network* (TGN) (Park *et al.*, 2009).

L'initiation de la biogenèse des granules se fait par un processus de bourgeonnement dépendant de la clathrine à partir du TGN pour former des granules immatures. Les granules subissent une fusion homotypique suivie d'un remodelage de la membrane, et de la perte du manteau de clathrine (**Figure 3**). Ce bourgeonnement nécessite l'intervention de divers acteurs protéiques tels que la CGA ou encore les lipides (Tooze *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2009; Carmon *et al.*, 2020). Dans un modèle cellulaire de neurosécrétion (cellules PC12), l'inhibition de la

CGA entraîne une diminution du nombre de granules, tandis que son expression dans des cellules non neuroendocrines (fibroblastes) induit la formation de granules denses capables de libérer leur contenu (Kim *et al.*, 2001; Loh *et al.*, 2004; Montero-Hadjadje *et al.*, 2009). De la même façon, l'expression de la CGA dans des cellules endocrines dépourvues d'un processus de sécrétion régulée et déficiente pour la CGA restaure la formation de granules sécrétoires et le processus de sécrétion régulé (Loh *et al.*, 2004). *In vivo*, l'utilisation de souris transgéniques déficientes pour la CGA a montré une diminution du nombre de granules formés et une altération de leur morphologie (Kim *et al.*, 2005). Le potentiel granulogénique de la CGA semble médié par sa partie N-terminale puisque cette région est suffisante pour induire la granulogénèse dans des cellules sympatho-surréaliennes (Courel *et al.*, 2006). L'analyse morphologique de cellules chromaffines de souris dont le gène *Chga* a été inactivé n'a en revanche montré aucune différence pour le nombre et la taille des granules de sécrétion entre les souris sauvages et *Chga*^{-/-}. L'analyse des autres granines (CGB et sécrétogranines II à VI) a montré une augmentation de leur expression de 2 à 3 fois, suggérant un rôle compensatoire des autres granines (Hendy *et al.*, 2006). Un rôle semblable à celui de la CGA dans la biogénèse des granules a été mis en évidence pour la CGB (Huh *et al.*, 2003; Beuret *et al.*, 2004). Dans le TGN où les granules de sécrétion se forment, l'environnement est acide et le milieu contient une forte concentration de cations bivalents comme le Ca²⁺. Ces conditions engendrent l'agrégation et la condensation des granines entre elles et à d'autres composants tels que les catécholamines, l'ATP et d'autres protéines (Crivellato *et al.*, 2008).

Enfin, la formation des granules par bourgeonnement du TGN va nécessiter des modifications de courbures membranaires et implique ainsi les lipides. Par exemple, l'accumulation d'acide phosphatidique (PA) et de diacylglycérol (DAG) à la membrane du TGN pourrait faciliter la courbure de la membrane conduisant au bourgeonnement (Tanguy *et al.*, 2016). De façon intéressante le PA interagit avec la CGA et pourrait ainsi participer à ce remodelage membranaire. En effet, il a été montré récemment que l'inhibition de la phospholipase D (PLD), l'enzyme responsable de la synthèse du PA altère la biogénèse des granules (Carmon *et al.*, 2020).

2.3.1.3. Maturation

Les granules immatures vont ensuite suivre un processus de maturation qui inclut des modifications morphologiques et biochimiques. Les granules de sécrétion vont ainsi perdre leur manteau de clathrine qui est présent lors du bourgeonnement et voir leur taille augmenter (Tooze, 1991).

La lumière des granules immatures va s'acidifier progressivement, entraînant une condensation supplémentaire des précurseurs. Cette acidification se fait grâce à une augmentation de la densité de pompes à protons (V-ATPase) dépendantes de l'ATP et une diminution de la perméabilité aux protons des membranes. Les protons vont donc être amenés dans la lumière du granule ce qui conduit à une acidification du pH intragranulaire qui passe de 6,3 à 5-5,5 (Park *et al.*, 2009; Kögel *and* Gerdes, 2010). Dans les cellules PC12, il a été montré que l'acidification dure environ 90 minutes (Urbé *et al.*, 1997). Ce gradient de protons va permettre l'activation des pro-hormones convertases pour la conversion des précurseurs d'hormones et de neuropeptides en molécules bioactives (Johnson, 1988; Kögel *and* Gerdes, 2010).

Tout en acquérant leur maturité, les granules se déplacent le long des microtubules vers la partie corticale riche en actine où le granule va rester jusqu'à son recrutement pour migrer vers la membrane plasmique (Rudolf *et al.*, 2001).

Lors de sa maturation, le granule va acquérir son contenu en catécholamines. La L-tyrosine est transformée en L-dopa par l'action de la tyrosine hydroxylase (TH) dans le cytoplasme de la cellule. La décarboxylation de la L-dopa en dopamine est ensuite catalysée par la dopamine décarboxylase (DD). Puis, le transporteur *vesicular monoamine transporter* (VMAT) va prendre en charge la dopamine et la transporter dans l'espace intragranulaire, où elle est alors hydroxylée en noradrénaline par la dopamine β -hydroxylase (D β H). La voie de biosynthèse s'achève à cette étape pour les cellules noradrénergiques. Pour les cellules adrénérgiques, la noradrénaline est exportée dans le cytoplasme de la cellule pour y être méthylée en adrénaline par la PNMT, puis l'adrénaline obtenue est transportée dans le granule (**Figure 3**).

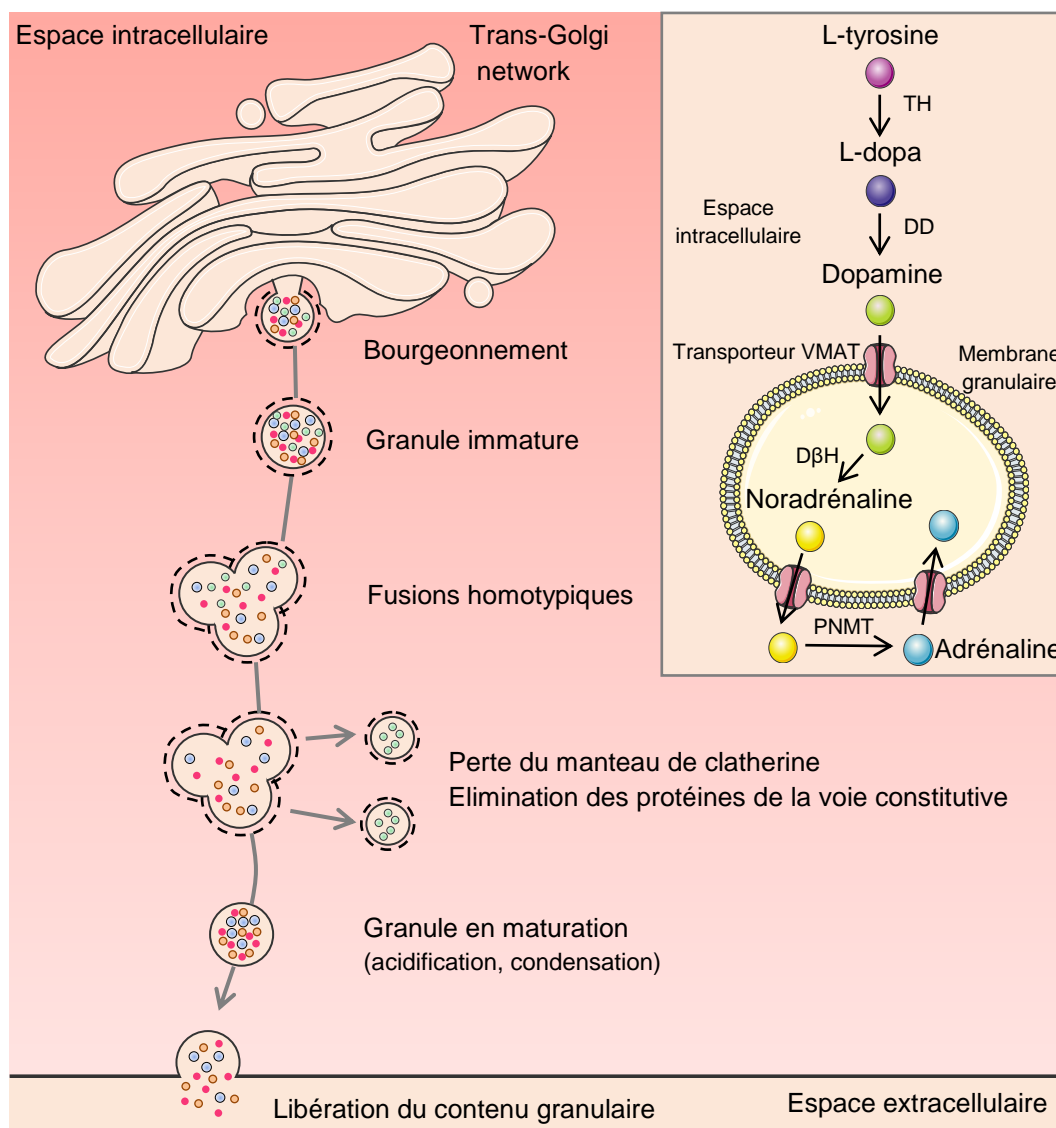


Figure 3 : Les différentes étapes de la formation et de la maturation des granules de sécrétion dans les cellules chromaffines. Les granules se forment au niveau de trans-Golgi network par bourgeoisement, s'en suit différentes étapes de maturation dont l'acquisition du contenu en catécholamines. Les granules sont ensuite recrutés à la membrane plasmique où ils libèrent leur contenu à la suite d'une stimulation. DβH : dopamine-β-hydroxylase, DD : dopamine décarboxylase, PNMT : phényléthanolamine N-méthyl-transférase, TH : tyrosine hydroxylase, VMAT : vesicular monoamine transporter.

2.3.2. L'exocytose régulée

Dans les cellules neuroendocrines, deux modes d'exocytose cohabitent : l'exocytose constitutive et l'exocytose régulée. L'exocytose constitutive est nécessaire à tous types cellulaires car elle permet l'apport des protéines constituant la membrane plasmique ou la matrice extracellulaire. Ces protéines sont exportées dans des petites vésicules claires qui fusionnent directement avec la membrane plasmique. Ce phénomène d'apport est constant et se fait sans stimulation. En revanche, l'exocytose régulée est contrôlée par une élévation de la concentration calcique cytoplasmique à la suite d'une stimulation spécifique de la cellule. Avant de fusionner avec la membrane plasmique le granule va subir différentes étapes pour devenir compétent pour la fusion. Les granules matures vont subir en premier lieu une étape d'accostage afin d'être positionné correctement au niveau de la membrane plasmique, s'en suit une étape d'arrimage où le granule s'appose sur la membrane plasmique. Enfin l'étape d'amorçage rend les granules compétents pour l'étape ultime de fusion entre la membrane granulaire et la membrane plasmique permettant la libération du contenu intragranulaire dans l'espace extracellulaire (**Figure 4A**).

Les différentes étapes de l'exocytose aboutissant à la fusion vont impliquer le complexe multiprotéique SNARE (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor*). Dans les cellules neuroendocrines sont présentes : la protéine vésiculaire (v-SNARE) synaptobrévine-2 également appelée *vesicle-associated membrane protein 2* (VAMP-2), ainsi que les protéines membranaires *target-SNARE* (t-SNARE) que sont la syntaxine-1 et la *synaptosomal-associated protein, 25kDa* (SNAP-25) (Pinheiro *et al.*, 2016). Une autre nomenclature a été proposée, v-SNARE peut également être nommé Q-SNARE et les t-SNARE peuvent être appelées R-SNARE, Q et R désignant respectivement une glutamine et une arginine conservées au cours de l'évolution et indispensables à la formation et à la stabilité du complexe (Fasshauer *et al.*, 1998). Le complexe SNARE comprend 4 hélices α . Les protéines VAMP-2 et syntaxine-1 contribuent chacune à la formation d'une hélice α , tandis que SNAP-25 participe avec 2 hélices α (**Figure 4B**) (Südhof *and* Rothman, 2009).

Les protéines SNARE s'assemblent d'abord en un complexe trans-SNARE où les quatre hélices α se réunissent. Progressivement un système en « fermeture éclair » se referme de la partie N-terminale à la partie C-terminale du complexe SNARE entraînant un intermédiaire partiellement assemblé. Cet état est maintenu grâce à l'intervention de deux protéines accessoires, la complexine et la synaptotagmine qui empêchent la fusion des deux membranes à de faibles concentrations de calcium au repos (Dhara *et al.*, 2018).

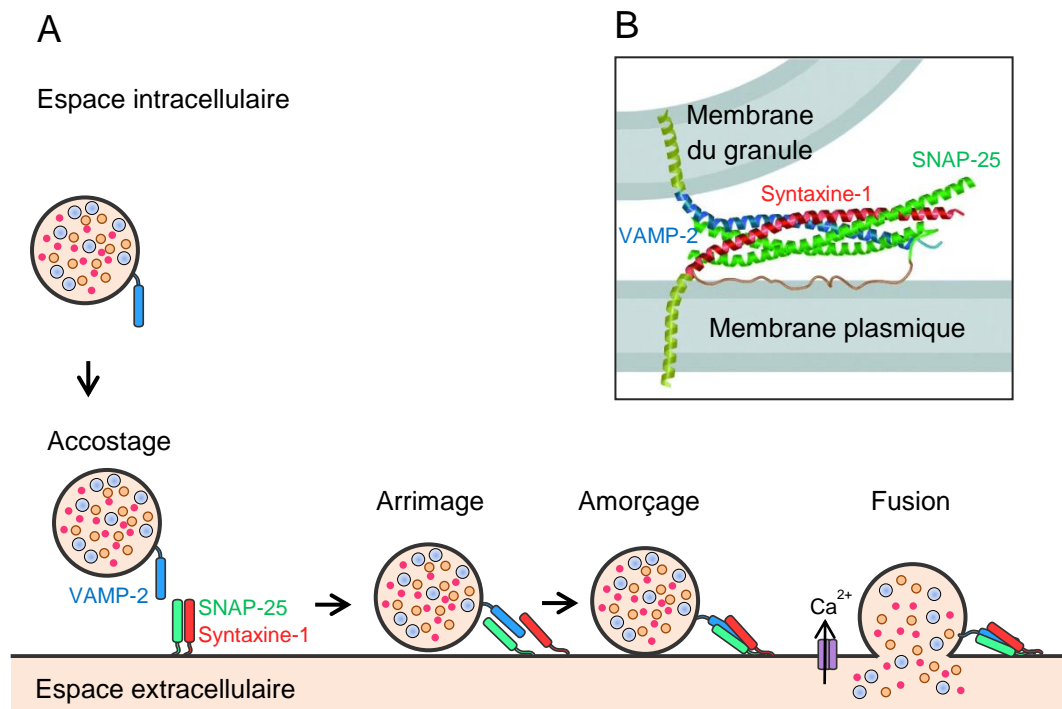


Figure 4 : Les différentes étapes du processus d'exocytose dans les cellules chromaffines. (A) Une fois recruté à la membrane plasmique, le granule va subir différentes étapes : accostage, arrimage et amorçage lui permettant de devenir compétent pour la fusion. L'entrée de calcium dans la cellule permet ensuite de déclencher l'exocytose et la fusion entre les membranes plasmique et granulaire. (B) Organisation structurale du complexe SNARE. SNAP-25 : synaptosomal-associated protein, 25kDa, VAMP-2 : vesicle-associated membrane protein 2. Adapté de (Sutton *et al.*, 1998).

La synaptotagmine, un senseur du calcium présent sur la membrane des granules, possède 2 domaines C2A et C2B qui vont lier 5 ions calcium. Lors de la stimulation des cellules, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium va entraîner un changement conformationnel de la synaptotagmine, déplaçant ainsi la complexine et libérant le complexe SNARE déjà partiellement assemblé. Ce dernier va subir un mécanisme en « fermeture éclair » qui va rapprocher les

membranes et permettre la fusion entre les bicouches lipidiques vésiculaire et plasmique permettant la libération du contenu intragranulaire (Pinheiro *et al.*, 2016).

La disponibilité des protéines SNARE et leur engagement dans le complexe est également étroitement régulé par les protéines Munc (Toonen *and* Verhage, 2007). Par exemple, la protéine Munc18-1 interagit avec la partie N-terminale de la syntaxine-1 assurant ainsi son maintien dans une conformation fermée. Cette configuration empêche l'interaction de la syntaxine-1 avec ses partenaires VAMP-2 et SNAP-25 et la formation finale du complexe SNARE. En se liant au complexe syntaxine-1-Munc18-1, Munc13-1 va ensuite engendrer un changement de conformation permettant à la syntaxine-1 d'adopter une conformation ouverte favorable à l'assemblage du complexe SNARE (Gladychева *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2011).

Une fois les catécholamines et autres constituants des granules de sécrétion libérés, le complexe SNARE va être désassemblé pour être recyclé et utilisé pour un autre cycle de fusion. Ce processus est dépendant de l'ATP et implique la protéine *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein* (NSF) et son cofacteur *soluble NSF attachment protein* (SNAP). L'association de SNAP avec le complexe SNARE permet la liaison de la protéine NSF au complexe SNAP–SNARE. Puis, la stimulation de l'activité ATPase du NSF conduit au désassemblage du complexe et la libération des acteurs pour d'autres cycles de fusion (Morgan *and* Burgoyne, 2004).

2.3.3. La régulation de l'exocytose

Les étapes successives de l'exocytose sont également régulées par différents autres acteurs protéiques ou lipidiques. Il a été montré notamment que l'organisation et le remodelage à la fois des lipides et du cytosquelette d'actine constituent des processus clés dans la régulation de l'exocytose, et que plusieurs GTPases monomériques sont impliquées.

Après leur synthèse au niveau du TGN, les granules de sécrétion sont acheminés vers la périphérie cellulaire le long des microtubules, puis ils sont ancrés dans un réseau cortical de filaments d'actine qui forme une barrière physique à l'exocytose (Trifaró *et al.*, 2008). Cette dernière est contrôlée par des GTPases Rho, une sous-famille de la superfamille des Ras. Par exemple, l'activation de la protéine

RhoA dans les cellules chromaffines contribue à la stabilisation du réseau cortical d'actine empêchant le recrutement des granules à la membrane plasmique (Gasman *et al.*, 1998). Le mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé mais RhoA activerait une phosphatidylinositol 4-kinase (PI 4-kinase) ce qui pourrait modifier le niveau de synthèse de certains lipides comme le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) connu pour réguler les interactions entre la membrane et le cytosquelette (Gasman *et al.*, 1998). La stimulation des cellules chromaffines par un sécrétagogue entraîne une réorganisation complexe du cytosquelette d'actine. Dans un premier temps, la barrière corticale d'actine est destructurée, un processus qui nécessite très certainement l'inactivation de RhoA (Bader *et al.*, 2004), puis les granules sont acheminés au niveau de la membrane plasmique grâce à l'action de Rab27A, une GTPase granulaire qui permet l'interaction des granules avec des moteurs moléculaires comme la myosine-V via son effecteur MyRip (Desnos *et al.*, 2003). En parallèle, la GTPase Cdc42 (un autre membre de la famille Rho) est recrutée à la membrane plasmique où elle active la synthèse de nouveaux filaments d'actine, spécifiquement au niveau des sites d'exocytose, en activant la cascade moléculaire incluant N-WASP et Arp2/3 (Gasman *et al.*, 2004; Malacombe *et al.*, 2006). La protéine annexine-A2 régule l'organisation des filaments d'actine en faisceaux reliant le granule à la membrane plasmique (Gabel *et al.*, 2015). L'actine semble donc être un acteur important de l'accostage et/ou de l'arrimage mais pourrait également participer à des phases plus tardives en exerçant des forces nécessaires à l'expansion du pore de fusion ou à l'expulsion de la matrice intragranulaire.

Le déclenchement de l'exocytose entraîne également une réorganisation lipidique indispensable au bon déroulement de la sécrétion (Gasman *and* Vitale, 2017). Par exemple, il a été montré que l'annexine-A2 participe à la formation des sites d'exocytose en contrôlant la mise en place de microdomaines lipidique riches en gangliosides GM1 et certains phosphoinositides comme le PIP₂ (Chasserot-Golaz *et al.*, 2005; Umbrecht-Jenck *et al.*, 2010). Un autre lipide impliqué de façon importante dans le contrôle de l'exocytose est le PA. En effet, les travaux de l'équipe proposent que la synthèse de PA induite par l'activation de phospholipase D1 soit indispensable à l'exocytose (Vitale *et al.*, 2001; Zeniou-Meyer *et al.*, 2007). Plus récemment il a été montré que les formes mono-insaturées du PA régulent l'arrimage

des granules tandis que les formes poly-insaturées réguleraient plutôt l'étape de fusion (Tanguy *et al.*, 2020). De façon intéressante, l'activité de la PLD déclenchée au cours de l'exocytose est sous le contrôle de plusieurs GTPases monomériques comme Arf6, Rac1 et RalA (Vitale *et al.*, 2005; Béglé *et al.*, 2009; Momboisse *et al.*, 2009).

Pour plus de détails sur l'implication des GTPases Rho au cours de la sécrétion neuroendocrine dans les cellules saines et tumorales, vous pouvez vous référer à la revue que j'ai écrite pendant ma thèse (Annexe; Streit *et al.*, 2020).

2.4. Effets physiologiques des molécules libérées par les cellules chromaffines

Les cellules chromaffines sécrètent des catécholamines telles que l'adrénaline et la noradrénaline dont la libération est régulée par le système nerveux sympathique grâce à une innervation par le nerf splanchnique. Ce dernier libère de l'acétylcholine qui active les récepteurs nicotiques et muscariniques présents sur les cellules chromaffines (Pérez-Alvarez *and* Albillos, 2007). L'entrée d'ions sodium à travers le récepteur canal nicotique entraîne alors une dépolarisation de la membrane de la cellule, et par conséquent une activation des canaux calciques dépendants du voltage. Il s'en suit une entrée d'ions calcium qui constitue l'élément déclencheur de l'exocytose et de la libération des catécholamines et neuropeptides dans la circulation sanguine (Aunis *and* Langley, 1999) (**Figure 5**).

Dans des conditions physiologiques, les cellules chromaffines libèrent uniquement des catécholamines à un taux basal qui permet de réguler les fonctions homéostatiques telles que l'activité cardiaque, intestinale et le métabolisme. Cette libération se fait par un mécanisme de « *kiss and run* » qui implique la libération de petites molécules solubles comme les catécholamines et retient les molécules moins mobiles telles que les neuropeptides et les chromogranines. Lors de stimulations soutenues et répétitives en réponse au stress, le nerf splanchnique va libérer en plus de l'acétylcholine, d'autres neuropeptides tels que le *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide* (PACAP) qui vont contribuer à la libération des catécholamines (Guérineau, 2020). L'activation sympathique médiée par le stress entraîne une augmentation de la sécrétion des catécholamines, ainsi qu'une libération des

neuropeptides, des enképhalines, et des chromogranines par un mécanisme de « *full fusion* » (Fulop *et al.*, 2005; Elhamdani *et al.*, 2006).

En cas de stress, l'activation du système nerveux sympathique va stimuler la glande médullosurrénale et donc la libération de catécholamines, afin de mobiliser l'organisme. Les catécholamines vont activer les récepteurs adrénergiques α et β couplés aux protéines G présents sur les cellules cibles, entraînant une augmentation de la fréquence cardiaque essentiellement via les récepteurs de type β_1 . Le métabolisme est également modifié afin de fournir du glucose au cœur, au cerveau et aux muscles squelettiques. Enfin, la vasoconstriction des vaisseaux périphériques et la dilatation des vaisseaux irriguant les muscles squelettiques permettent l'apport sanguin aux muscles à mobiliser (Andreis *and* Singer, 2016) (**Tableau 4**).

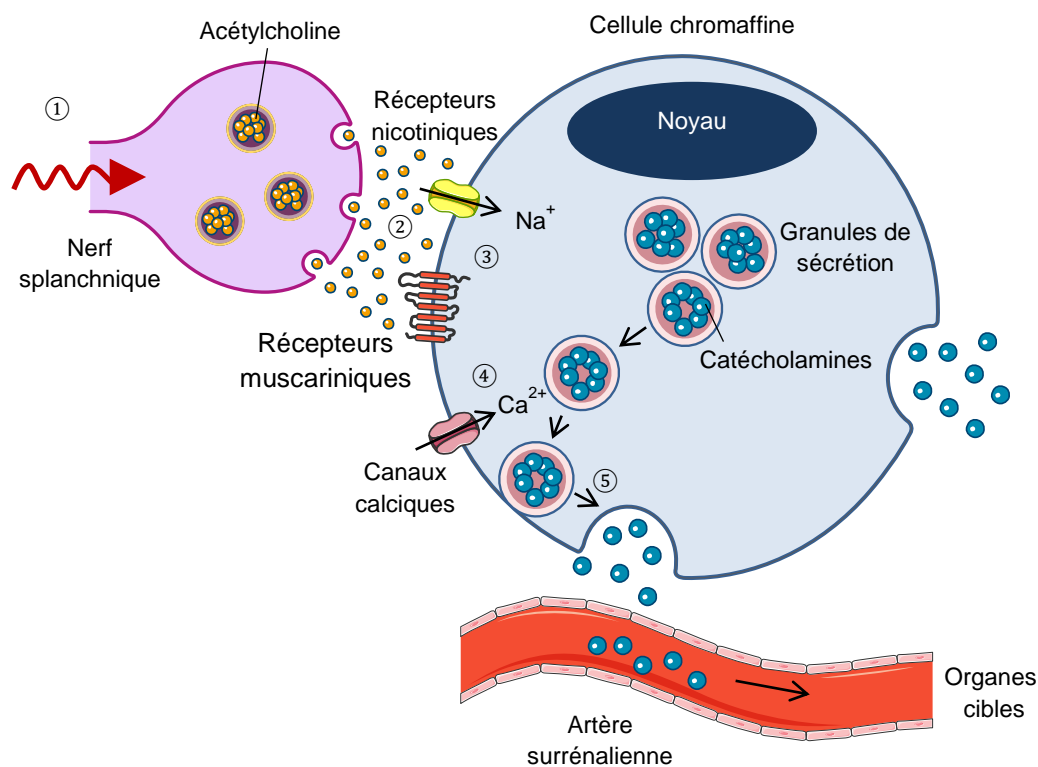


Figure 5 : Sécrétion des catécholamines par les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale. Différentes étapes sont requises pour la libération des catécholamines : ① stimulation nerveuse transmise par le nerf splanchnique, ② libération d'acétylcholine et activation des récepteurs muscariniques et nicotiniques, ③ entrée d'ions sodium par le récepteur nicotinique dans la cellule entraînant une dépolarisation de la cellule, ④ activation des canaux calciques sensibles au voltage et entrée d'ions calcium dans la cellule, ⑤ fusion de la membrane du granule avec la membrane plasmique entraînant la libération des catécholamines dans l'artère surrénalienne.

Organe cible	Effet sur l'organisme	Récepteurs adrénergiques
Yeux	dilatation de la pupille, mydriase	$\alpha 1$
Bronches	bronchodilatation	$\beta 2$
	\searrow sécrétion des glandes bronchiques	$\alpha 1$
Cœur	\nearrow fréquence cardiaque \nearrow amplitude des contractions	$\beta 1, (\beta 2, \beta 3, \alpha)$
Vaisseaux périphériques, ex : peau, reins	vasoconstriction	α
Vaisseaux des muscles squelettiques et cardiaques	vasodilatation	$\beta 2$
Muscles squelettiques	contraction	$\alpha 1$
Foie	\nearrow glycogénolyse et libération de glucose dans le sang	β
Pancréas	\searrow sécrétion d'insuline	$\alpha 2$
	\nearrow sécrétion de glucagon	β
Tissu adipeux	\nearrow lipolyse et libération d'acides gras dans le sang	$\beta 3$
Intestins	relaxation des muscles lisses intestinaux	$\beta, (\alpha)$
Vessie	relaxation du muscle détrusor	β
	fermeture du sphincter urétral interne de la vessie, absence de miction	$\alpha 1$
Autres glandes	\searrow sécrétions et fluides	

Tableau 4 : Principaux effets de la libération des catécholamines sur l'organisme. Les catécholamines sont sécrétées par la glande médullosurrénale à la suite d'une stimulation du système sympathique. Par leurs actions sur les récepteurs adrénergiques les catécholamines préparent à la mobilisation de l'organisme. Adapté de (Tank *and* Lee Wong, 2015).

Les chromogranines qui sont libérées conjointement avec les catécholamines vont également agir sur l'organisme à la suite de leur clivage en divers peptides par les pro-hormones convertases. La CGA donne ainsi naissance à des peptides tels que les vasostatines qui ont des effets vasorégulateurs, tandis que la pancréastine inhibe la sécrétion d'insuline et régule le métabolisme lipidique et glucidique (Crivellato *et al.*, 2008; Corti *et al.*, 2018). De la même façon la CGB donne naissance à la sécrétolytine, qui a une activité anti-bactérienne, tandis que d'autres peptides libérés n'ont pas d'activité biologique connue (Helle, 2004; Bartolomucci *et al.*, 2011). D'autres composés tels que le neuropeptide Y (NPY), va réguler la sécrétion des catécholamines alors que les enképhalines vont avoir un effet analgésique sur l'organisme (Fulop *et al.*, 2005; Crivellato *et al.*, 2008) (**Tableau 5**).

Protéines et peptides dérivés	Effet sur l'organisme
Chromogranine A	↘ angiogénèse, ↘ contractilité et relaxation du myocarde, ↘ adhésion cellulaire, ↗ barrière endothéliale, ↗ cicatrisation des plaies, ↘ croissance tumorale, ↗ biogénèse des granules
<u>Peptides de la CGA</u>	
Vasostatine I	↗ vasodilatation, ↘ angiogénèse, ↘ contractilité du myocarde, ↗ cardioprotection, ↘ libération PTH, ↗ adhésion cellulaire, ↗ barrière endothéliale, ↘ fuite vasculaire, ↘ croissance tumorale, ↘ douleur gastro-intestinale, ↘ perméabilité des cellules épithéliales intestinales, anti-microbien et anti-fongique, neurotoxique
Vasostatine II	↘ remodelage cardiaque et fibrose, ↗ cardioprotection ischémique
Facteur inhibiteur vasoconstricteur (VIF)	↗ vasodilatation
CGA 1-373	↗ angiogénèse
Pancréastine	↘ sécrétion d'insuline, régule le métabolisme lipidique et glucidique
Catestatine	↘ contractilité et la relaxation du myocarde, ↗ cardioprotection, ↗ angiogénèse, ↘ sécrétion des catécholamines, ↗ vasodilatation, ↗ chimiotaxie des monocytes, ↗ libération d'histamine des mastocytes, anti-microbien et anti-paludique
Serpine	↗ contractilité et la relaxation du myocarde, ↗ cardioprotection, ↘ stress oxydatif, ↗ protéase nexin-1
Chromacine	↗ activité anti-bactérienne contre les Gram +
Chromogranine B	↗ sécrétion des catécholamines, ↗ biogénèse des granules
<u>Peptides de la CGB</u>	
GAWK	/
PE-11	/
Secretolytine	↗ activité anti-bactérienne contre les Gram +
Chromogranine C ou Sécrétogranine II	↗ libération de dopamine et de neurotransmetteurs, chimiotaxie, migration
<u>Peptides de la CGC</u>	
EM66	régulation des cellules stéroïdogènes de la glande surrénale
Sécrétoneurine	angiogénèse et modulation de la réponse inflammatoire, ↗ chimiotaxie des monocytes, eosinophiles, fibroblastes,...
<u>Peptides opioïdes</u>	
Enképhalines	inhibiteur des bactéries à Gram +, ↗ réaction immunitaire, analgésie
Endorphines	analgésie
Dynorphines	analgésie

Autres peptides	
Neuropeptide Y	↗ sécrétion des catécholamines
Bombésine	médiation et modulation de la réponse au stress, ↗ actions trophiques, anti-ulcérogène et anti-inflammatoire en cas de dommage tissulaire, régulateur paracrine de la croissance, la structure et la fonction du cortex surrénalien
Neurotensine	hypotension, hypothermie, analgésie, ↘ activité locomotrice, ↘ sécrétion d'aldostérone, ↗ sécrétion de minéralocorticoïdes et de glucocorticoïdes
Peptides natriurétiques	↘ sécrétion des catécholamines, ↘ production d'aldostérone
Adrénomédulline	hypotension, ↘ libération et synthèse des catécholamines, ↗ flux sanguin, action mitogène sur la zone glomérulée du cortex surrénalien, ↗ vasodilatation
Peptide lié au gène de la calcitonine	↗ vasodilatation, ↗ libération d'aldostérone et de corticostérone

Tableau 5 : Effets sur l'organisme des protéines et peptides contenus dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines. Une diversité de composés sont libérés lors de l'exocytose et agissent sur différents paramètres et processus de l'organisme. D'après (Helle, 2004; Crivellato *et al.*, 2008; Bartolomucci *et al.*, 2011; Corti *et al.*, 2018).

2.5. Le phéochromocytome

2.5.1. Généralités

Le phéochromocytome (PHEO) est une TNE se développant à partir des cellules chromaffines de la glande médullosurrénale, et qui se caractérise par une hypersécrétion de catécholamines. Le paragangliome (PGL) se distingue du PHEO par sa localisation extra-surrénalienne au niveau des ganglions paravertébraux sympathiques du thorax, de l'abdomen et du bassin. En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé a classé le PHEO comme une tumeur surrénalienne et le PGL comme une tumeur extra-surrénalienne (**Figure 6**). Ces deux tumeurs sont distinguées uniquement sur la base anatomique (Neumann *et al.*, 2019). Des PGL se développent également à partir des ganglions parasympathiques et sont localisés au niveau de la base du crâne et du cou et ne produisent pas de catécholamines. Dans la littérature, PHEO et PGL sont souvent regroupés sous l'acronyme PPGL. Environ 80 à 85% des tumeurs de ce groupe sont des PHEO alors que seulement 15 à 20% sont des PGL (Lenders *et al.*, 2014).

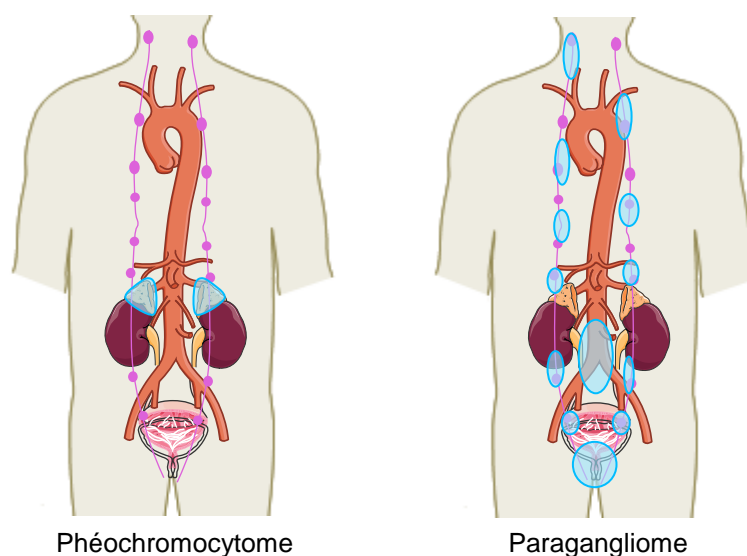


Figure 6 : Localisation du phéochromocytome et du paragangliome dans le corps humain. Le phéochromocytome se développe à partir de la glande médullosurrénale (gauche), tandis que le paragangliome provient du tissu extra-surrénalien au niveau de la base du crâne, du cou, du thorax, de l'abdomen et du pelvis (droite). La chaîne de ganglions est représentée en rose et les sites d'apparition des tumeurs sont cerclés en bleu.

2.5.2. Historique

Le 1^{er} cas de PHEO a été diagnostiqué par Felix Fränkel à l'Université de Fribourg en 1886. La patiente présentait une tumeur bilatérale provoquant des signes cliniques tels que des attaques de panique, de la tachycardie et des sudations. Max Schottelius a ensuite mis en évidence la présence de chromates qui donnaient une couleur grise rougeâtre à la tumeur lorsqu'elle était plongée dans une solution de Mueller. Le terme phéochromocytome a été créé en 1912 par Ludwig Pick et provient du grec « *phaios* » : brun et « *chrôma* » : couleur, pour désigner une coloration brunâtre du tissu médullosurrénalien après une réaction avec des sels de chrome (Farrugia *and* Charalampopoulos, 2019; Neumann *et al.*, 2019). En 1926, Cesar Roux (Suisse) et Charles H. Mayo (USA) sont les premiers à réaliser avec succès une exérèse de PHEO humain (Kudva *et al.*, 2003).

2.5.3. Epidémiologie

Le nombre de patients atteints de PPGL a augmenté au cours des dernières années avec une incidence qui est passée de 0,37 cas/100 000 personnes/an en 1995 à 0,57 et en 2015 (Berends *et al.*, 2018). Néanmoins ce nombre reste probablement sous-estimé puisque 0,05% des autopsies révèlent des PHEO (Lo *et al.*, 2000; McNeil *et al.*, 2000). L'incidence de cette tumeur augmente avec l'âge des sujets avec un pic d'incidence entre 40 et 60 ans, et touche autant les femmes que les hommes (Berends *et al.*, 2018). La prévalence des PPGL chez les patients adultes souffrants d'hypertension est de 0,2 à 0,6%, et de 1,7% chez les enfants. À noter que près de 5% des PPGL sont découverts de façon fortuite (Lenders *et al.*, 2014; Tsirlin *et al.*, 2014).

2.5.4. Symptômes cliniques

Le PHEO est caractérisé par une hypersécrétion de catécholamines (noradrénaline, adrénaline) qui peut entraîner une hypertension artérielle importante, paroxystique ou continue. La triade classique de Menard décrit les symptômes principaux que sont les céphalées, les palpitations et les sudations. Peuvent également être présents une sensation de faiblesse, de la fatigue, des nausées et une pâleur (Lenders *et al.*, 2005; Tsirlin *et al.*, 2014) (**Tableau 6**). Néanmoins certains PHEO peuvent être asymptomatiques dans environ 10% des cas (Fall *et al.*, 2013). La tumeur est alors découverte de façon fortuite par imagerie réalisée pour une autre suspicion de maladie ; on parle alors d'incidentalome surrénalien (Fassnacht *et al.*, 2016).

L'intensité de la sécrétion tumorale est responsable de l'intensité des signes cliniques mais surtout de l'importance des modifications hémodynamiques associées. En conséquence, les patients présentent un risque sévère d'accident vasculaire, ce qui rend d'autant plus délicate la chirurgie. De plus, le PHEO peut être à l'origine de différentes cardiomyopathies (Zhang *et al.*, 2017; Y-Hassan *and* Falhammar, 2020). L'exérèse de la tumeur permet d'améliorer les problèmes cardiaques des patients dans 96% des cas, tandis que l'absence de chirurgie engendre un taux de mortalité de 33%. Le PHEO conduit à des événements indésirables graves dans 44% des cas (Zhang *et al.*, 2017). Après opération, une

réurrence de la pathologie est observée dans 6,5 à 16,5% des cas (Press *et al.*, 2014).

Symptômes	Fréquence (%)
Hypertension artérielle	80-90%
- Permanente	50-60%
- Paroxystique	30%
Céphalées	60-90%
Sueurs	55-75%
Palpitations	50-70%
Hypotension orthostatique	10-50%
Pâleur	40-45%
Hyperglycémie	40%
Asthénie	25-40%
Amaigrissement	20-40%
Nausées	20-40%

Tableau 6 : Symptômes des patients atteints de phéochromocytome. Adapté de (Cornu *et al.*, 2019).

2.5.5 Les phéochromocytomes malins

Les PHEO malins sont retrouvés chez 10 à 20% des patients, néanmoins cette proportion varie en fonction de l'hérédité de la pathologie (Plouin *et al.*, 2016; Buffet *et al.*, 2020). Différents critères ont été suggérés pour différencier les tumeurs malignes et bénignes tels que : l'invasion locale des tissus ou des vaisseaux sanguins, une taille de tumeur supérieure à 5 cm et la ploïdie de l'ADN. Un score clinique de diagnostic « *Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score* » (PASS) basé sur une douzaine de critères a été créé pour évaluer la malignité de la tumeur. Il prend en compte l'invasion, la croissance diffuse, la nécrose ou encore la formation de cellules tumorales. Cependant aucun de ces critères ne permet à l'heure actuelle de déterminer de façon fiable la malignité de la tumeur. À ce jour, seule la présence de métastases permet d'attester de la malignité de la tumeur. Les métastases surviennent le plus souvent dans les ganglions lymphatiques, les os, le foie et les poumons (Strong *et al.*, 2008; Ajallé *et al.*, 2009). Le foie, le pancréas et les reins peuvent être infiltrés en raison de la proximité de la tumeur. Deux cas de la littérature rapportent des patients avec des métastases au niveau de la peau ou des seins (Srinivasan *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2010). De plus, les patients atteints de PHEO métastatiques présentent une forte morbidité, et un taux de mortalité de 40%

à 5 ans (Jimenez *et al.*, 2013). Environ 50% des patients atteints de PPGL malins sont porteurs de mutations héréditaires de la lignée germinale dans le gène de la sous-unité B de la succinate déshydrogénase (SDHB) (Jimenez *et al.*, 2013). Ces données suggèrent que la génétique joue un rôle primordial dans la détection des PHEO malins, mais pourrait aussi à terme servir à l'identification de nouveaux moyens thérapeutiques.

2.5.6. La génétique

2.5.6.1. Prédilection

La connaissance de la génétique des PPGL s'est considérablement améliorée ces dernières années, notamment avec l'expansion des techniques de séquençage. Le dogme selon lequel 10% des PPGL étaient d'origine génétique a été largement remis en cause par la découverte de nouveaux gènes (Elder *et al.*, 2005). À ce jour, plus d'une vingtaine de gènes de susceptibilité ont été découverts, dont les premiers mis en évidence sont NF1 (neurofibromin 1), RET (rearranged during transfection) et VHL (von Hippel-Lindau). Ce sont ensuite ajoutés les gènes de la SDH (succinate dehydrogenase) avec l'implication des sous-unités A, B, C et D et le gène SDHAF2 (succinate dehydrogenase assembly factor 2), ainsi que d'autres gènes (**Tableau 7**). Des mutations germinales pour des gènes sont retrouvées dans environ 40% des PPGL qui sont donc marqués par un fort déterminisme génétique (Gupta *et al.*, 2017; Buffet *et al.*, 2020).

Gène	Syndrome associé	Age	Localisation principale	PHEO bilatéraux (%)	Malignité (%)	Phénotype sécrétoire	Tumeurs associées
DLST	-	20-30	PGL thoracique, abdominal, pelvien	-	-	NA	-
DNMT3A	-	20-30	PGL cervical, thoracique	-	-	NA	-
EGLN1 (PHD2)	-	-	PGL abdominal	-	-	NA	-
EPAS1 (HIF2α)	/	20-30	PHEO, PGL thoracique, abdominal, pelvien	Possible	0,29	NA	Somatostatines, lésions oculaires, polycythémie
FH	/	30-40	PGL abdominal	Possible	3/8 cas rapportés	NA	Léiomyomes cutanés et utérins, carcinomes rénaux papillaires de type 2
GOT2	-	-	-	-	-	-	-
H3F3A	-	20-30	PGL abdominal, PHEO	-	-	-	-
KIF1β	-	-	PHEO	-	-	-	-
MAX	/	35-40	PHEO	67%	7-25%	NA, AD	Oncocytomes rénaux
MDH2	-	30-40	PGL abdominal, PHEO	40%	40%	NA, NS	-
MERTK	-	-	PGL abdominal	-	-	-	Carcinomes médullaires de la thyroïde
MET	-	-	PHEO	-	-	-	-
NF1	NF1	40-50	PHEO	0,16	~ 12%	AD	Taches café-au-lait, neurofibromes, taches de rousseur cutanées, gliomes optiques, hamartomes de l'iris, pseudarthrose
RET	MEN2A et B	30-40	PHEO	50-80%	<5%	AD	MEN2A : carcinomes médullaires de la thyroïde, hyperparathyroïdie / MEN2B : carcinomes médullaires de la thyroïde, ganglioneuromes
SDHA	PGL5	35-40	PGL cervical, abdominal	-	0-14%	NA, NA+DA, NS	Carcinomes rénaux, tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales, adénomes de l'hypophyse
SDHAF2	PGL2	30-40	PGL cervical	-	-	-	-

SDHB	Succinate dehydrogenase B	PGL4	30-40	PGL cervical, abdominal	Rare	31-71%	NA, NA+DA, NS	Carcinomes rénaux, tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales, adénomes de l'hypophyse, chondriomes pulmonaires
SDHC	Succinate dehydrogenase C	PGL3	35-40	PGL cervical	-	0-28%	NA, NA+DA, NS	Carcinomes rénaux, tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales, adénomes de l'hypophyse
SDHD	Succinate dehydrogenase D	PGL1	30-40	PGL cervical	Rare	<5%	NA, NA+DA, NS	Carcinomes rénaux, tumeurs neuroendocrines gastro-intestinales, adénomes de l'hypophyse, chondriomes pulmonaires
SLC25A11	Solute carrier family 25 member 11	-	50-60	PGL abdominal	Non	0,7	NA, NS	-
TMEM127	Transmembrane protein 127	/	35-40	PHEO	33%	<5%	AD	Carcinomes rénaux
VHL	Von Hippel-Lindau	VHL	20-30	PHEO, PGL abdominal	50%	<5%	NA	Hémangioblastomes, carcinomes rénaux, tumeurs neuroendocrines pancréatiques, tumeurs du sac endolymphatique

Tableau 7 : Phénotypes sécrétoire et clinique développés par les patients atteints de PPGL génétiques. Des mutations génétiques sont associées à des syndromes tels que NF1, VHL, MEN2A et B, PGL 1-5, entraînent le développement de multiples tumeurs. Bien que la majorité des PHEO soient bénins, des mutations dans le gène SDHB sont connues pour favoriser le développement de métastases, tandis que des mutations dans le gène RET sont souvent synonymes de PHEO bilatéraux. Le profil sécrétoire est dépendant de l'impact de la mutation sur la phényléthanolamine N-méthyl-transférase (PNMT). AD : adrénaline, DA : dopamine, MEN2 : multiple endocrine neoplasia type 2, NA : noradrénaline, NS : non sécrétant, PHEO : phéochromocytome, PGL : paragangliome, - : information indisponible ou peu robuste. Adapté de (Gupta *et al.*, 2017; Buffet *et al.*, 2020).

Le nombre de gènes mutés dans ces tumeurs rend compte d'une grande complexité quant à la compréhension des mécanismes de la tumorigenèse. Néanmoins ces gènes ont comme caractéristique commune d'activer les mêmes voies de signalisation. Trois groupes de gènes ont ainsi été définis en clusters. Le 1^{er} cluster comprend les gènes SDH, SDHAF2, VHL, FH, DLST, GOT2, SLC25A11, MDH2 impliqués dans la réponse pseudohypoxique, tandis que les gènes RET, NF1, TMEM127, MAX, MET, MERTK, HRAS appartiennent au 2nd cluster qui engage les voies de signalisation MAPK et mTOR. Un 3^{ème} cluster mis en évidence plus récemment fait intervenir la voie de signalisation Wnt avec les gènes MAML3 (mastermind like transcriptional coactivator 3) et CSDE1 (cold shock domain containing E1) (Nölting *et al.*, 2019; Buffet *et al.*, 2020). Les mutations somatiques et germinales les plus courantes sont retrouvées pour les gènes NF1 et VHL respectivement (Dahia, 2014; Evenepoel *et al.*, 2017). Néanmoins ce classement peut varier en fonction de la population ethnique considérée (Jiang *et al.*, 2020).

2.5.6.2. Cluster 1 : la voie pseudohypoxique

En conditions normoxiques, lorsque l'O₂ est en concentration normale, les facteurs induits par l'hypoxie (HIF- α) sont hydroxylés par des prolyl-hydroxylases (PHD), puis reconnus par la protéine VHL conduisant à leur dégradation par le protéasome. Lors de la croissance tumorale, l'augmentation de la taille de la tumeur va demander une concentration en oxygène de plus en plus forte jusqu'à dépasser l'approvisionnement local, une réponse hypoxique se met alors en place (Dahia, 2014). Dans les PPGL une voie pseudohypoxique a été décrite indépendamment du taux d'oxygène dans la cellule (Gruber *and* Simon, 2006) (**Figure 7**). Cette voie est activée par des mutations génétiques qui vont aboutir à une inhibition de l'hydroxylation des HIF- α et de leur dégradation. Les HIF- α se stabilisent alors et sont transportés dans le noyau pour former un hétérodimère avec HIF-1 β . Ce complexe agit ensuite sur la transcription de différents gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse, de la prolifération, du métabolisme énergétique, de la survie et de la migration (Favier, 2010; Dahia, 2014) (**Figure 7**). Des modifications épigénétiques pour les gènes SDH et FH ont montré que leur hyperméthylation conduit à une diminution de l'expression de différents gènes (Letouzé *et al.*, 2013).

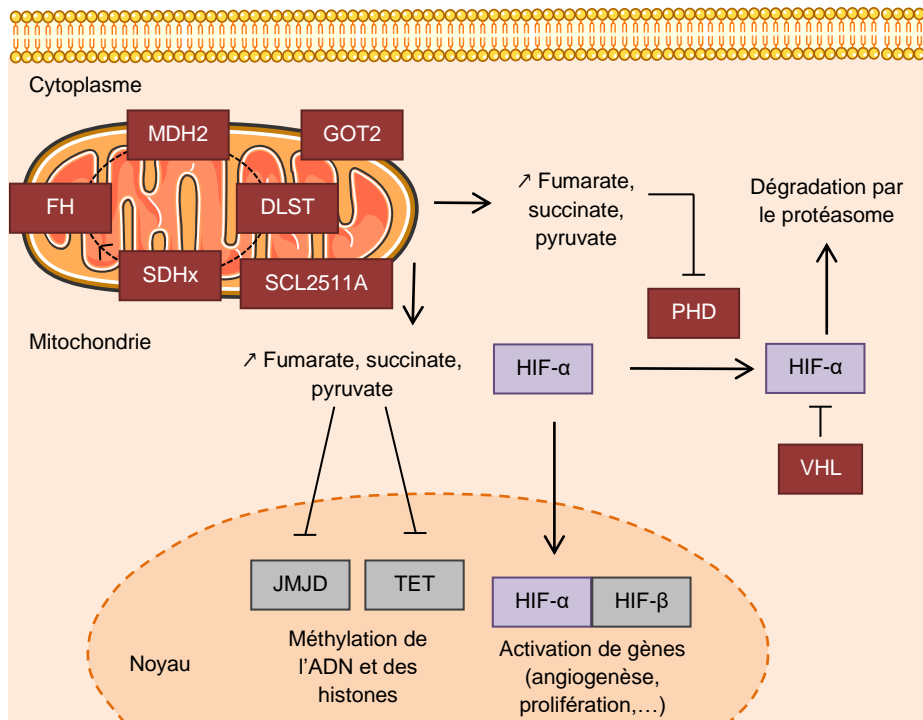


Figure 7 : Voie pseudohypoxique dans les PPGL. Des mutations dans les gènes de susceptibilité appartenant au cluster 1 entraînent une accumulation du facteur HIF- α . Les gènes SDHx, DLST, FH ou MDH2 sont impliqués dans le cycle de Krebs, leurs mutations conduisent à une accumulation de métabolites tels que le succinate, le fumarate, le pyruvate. Les gènes PHD et VHL sont quant à eux responsables de l'hydroxylation et de la reconnaissance de HIF- α pour sa dégradation par le protéasome. Les mutations dans les gènes décrits vont empêcher la dégradation de HIF- α , qui se transloque alors dans le noyau pour interagir avec HIF-1 β et activer la transcription de gènes impliqués dans la tumorigenèse. L'accumulation des métabolites du cycle de Krebs va également inhiber l'activité des enzymes ten-eleven translocation (TET) et des Jumonji-related histone demethylases (JMJD) impliquées dans la déméthylation de l'ADN et des histones respectivement, conduisant leur hyperméthylation et la régulation de gènes cibles. Les oncogènes impliqués dans la tumorigenèse sont en violet et les gènes suppresseurs de tumeurs en rouge. HIF : hypoxia-inducible factor, PHD : prolyl-hydroxylases.

2.5.6.3. Clusters 2 et 3 : les voies des récepteurs tyrosine kinases et Wnt

Le second cluster implique une activation anormale des voies de signalisation PI3K/mTOR et des récepteurs kinases régulant la croissance, la prolifération, l'apoptose, le remodelage de la chromatine et certaines signalisations métaboliques. Ce 2^{ème} cluster inclut des mutations dans des gènes tels que RET, NF1, H-RAS, K-RAS, TMEM127, MAX, CSDE1 (Jochmanova and Pacak, 2018) (**Figure 8**). Les mutations dans le gène RET engendrent une activation de la protéine qui va alors activer RAS, tandis que la protéine NF1 mutée perd sa fonction d'activer une enzyme (ras GTPase) qui inhibe la protéine RAS. Un arrêt de la régulation négative de la

signalisation mTOR est en revanche provoqué par des mutations dans le gène TMEM127. L'ensemble de ces mutations conduisent à une activation anormale des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et Akt/mTOR. Enfin, la mutation dans la protéine MAX, un co-facteur de MYC engendre une altération de la signalisation MAX-MYC, et favorise le développement tumoral (**Figure 8**) (Pillai *et al.*, 2016).

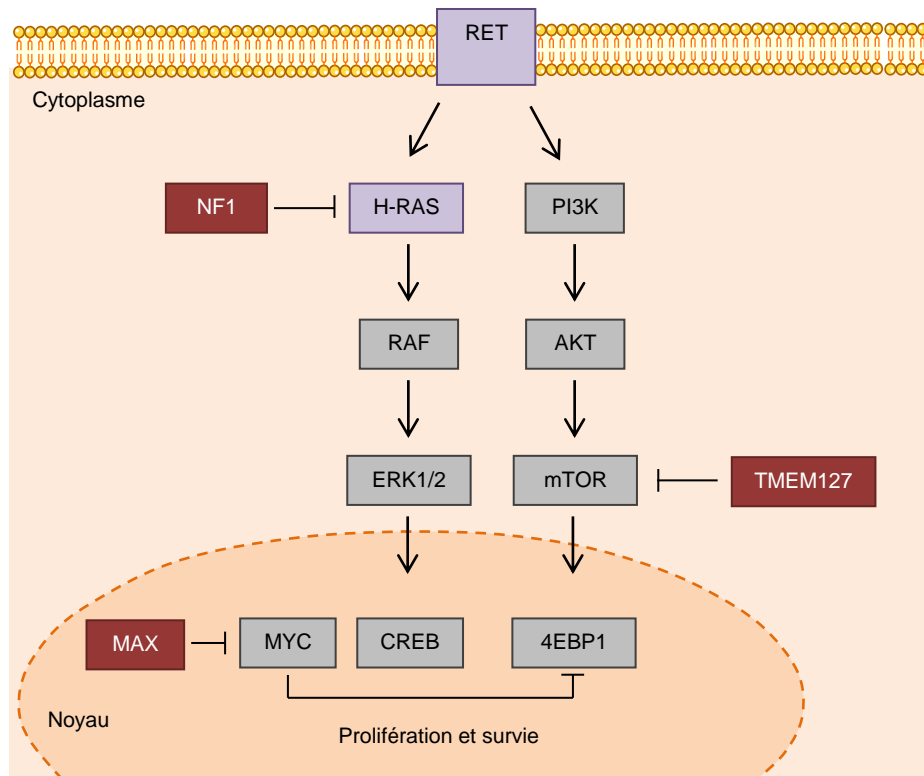


Figure 8 : Voie des récepteurs tyrosine kinase dans les PPGL. Des mutations dans les gènes de susceptibilité appartenant au cluster 2 sont associées à une activation anormale des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et Akt/mTOR. Les mutations dans le gène RET conduisent à l'activation de la protéine, tandis que les mutations dans les gènes NF1, TMEM127 et MAX engendrent une perte de l'effet inhibiteur de ces protéines. Les oncogènes impliqués dans la tumorigenèse sont en violet et les gènes suppresseurs de tumeurs en rouge.

Enfin, le 3^{ème} cluster encore peu exploré à ce jour engage la voie de signalisation Wnt et les gènes CSDE1 et MAML3. Ce dernier se transloque et fusionne avec d'autres gènes tels qu'UBTF (upstream binding transcription factor, RNA polymérase I) et TCF4 (transcription factor 4) conduisant à la formation de protéines aberrantes. Les PHEO positifs à la fusion MAML3 sont corrélés avec un mauvais pronostic et des taux plus élevés de métastases. Les patients présentent un phénotype hypométhylant et une signalisation Wnt accrue (Fishbein *et al.*, 2017). Cette voie régule divers processus tels que la prolifération, l'adhésion, la motilité, la polarité et la différenciation (Prunier *et al.*, 2004).

2.5.6.4. Les multiples conséquences des mutations

Les altérations génétiques citées précédemment peuvent également être à l'origine d'autres néoplasmes (**Tableau 7**). Les mutations des gènes SDH peuvent ainsi provoquer des TNE gastro-intestinales, des carcinomes rénaux ainsi que des adénomes de l'hypophyse (Gill, 2018). Ces altérations génétiques peuvent aussi être à l'origine de syndromes associés aux PPGL, par exemple la néoplasie endocrinienne de type 2 (MEN2) (mutation du gène RET) se caractérise par l'association possible, chez un même patient, d'un cancer médullaire de la thyroïde, d'une hyperparathyroïdie et d'un PHEO. Tandis que l'association d'hémangioblastomes (tumeurs du système nerveux central), de carcinomes rénaux, de TNE pancréatiques, et de PPGL sont caractéristiques de la maladie de von Hippel-Lindau. Enfin des patients atteints de neurofibromatose de type 1 présentent des neurofibromes, des lésions cutanées, des atteintes des nerfs optiques ou de la rétine et des PHEO (Pawlu *et al.*, 2005; Dahia, 2014).

Ces différents gènes et voies de signalisation altérés dans les PPGL et leurs implications dans d'autres pathologies rendent compte de la complexité quant à la compréhension des mécanismes à l'origine de ces tumeurs. D'autant plus qu'il existe une hétérogénéité génétique intra- et inter-tumorale pour les PPGL (Crona *et al.*, 2015; Flynn *et al.*, 2015).

2.5.6.5. De la génétique au phénotype

Cette hétérogénéité génétique des PPGL va donner lieu à différents phénotypes en termes de localisation, de progression tumorale et de profil sécrétoire. Les patients porteurs d'altérations de gènes du cluster 1 (SDH, VHL, FH, DLST, SCL25A11, MDH2) présentent une localisation tumorale plutôt extra-surrénalienne. Par exemple, les mutations SDH et FH engendrent majoritairement des tumeurs cervicales et abdominales, alors que des tumeurs associées à une mutation VHL peuvent être abdominales ou surrénaliennes. En revanche, les mutations de gènes du cluster 2 (NF1, RET, TMEM127, MAX, MET) donnent lieu à des tumeurs surrénaliennes exclusivement (**Tableau 7**). Le devenir tumoral est également influencé par le profil génétique ; des mutations des gènes RET, MAX et VHL favorisent le développement de PPGL multiples, tandis que des altérations des

gènes SDHB, EPAS1, SLC25A11 et MDH2 prédisposent à une évolution métastatique chez les sujets (Lenders *et al.*, 2014; Buffet *et al.*, 2020). Le profil biochimique de la tumeur est aussi corrélé au génotype. Par exemple, des mutations de gènes du cluster 2 tels que RET, NF1 et TMEM127 entraînent une sécrétion tumorale adrénérgique. Ce phénotype est lié à l'expression de la PNMT responsable de la conversion de la noradrénaline en adrénaline (**Figure 4**) (Eisenhofer *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2017). Les PPGL avec un phénotype adrénérgique sont localisés dans la glande surrénale et sont très rarement extra-surrénaliens. En revanche, les PPGL liés à des mutations de gènes du cluster 1 (VHL, SDH, FH, EPAS1) ont une sécrétion noradrénérgique et n'expriment pas la PNMT (**Tableau 7**). Un silençage épigénétique du gène PNMT a été montré chez des patients porteurs de mutations VHL et SDH. L'hyperméthylation de la région promotrice de ce gène entraîne une réduction des taux de PNMT. Le même mécanisme a été montré pour les gènes FH et MDH2 (Gupta *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2020).

2.5.7. Diagnostic biochimique et imagerie

À l'heure actuelle le diagnostic du PHEO demeure complexe car les symptômes des patients comme l'hypertension artérielle, les céphalées, les palpitations et les sudations ne sont pas spécifiques et n'orientent que peu le diagnostic vers cette pathologie. Le dépistage repose uniquement sur la mise en évidence de l'excès de catécholamines produit par la tumeur.

D'après les directives du « *Endocrine Society Clinical Practice Guideline* », les tests biochimiques initiaux pour les PPGL comprennent les mesures plasmatiques et urinaires des métabolites des catécholamines (métanéphrine et normétanéphrine) (Lenders *et al.*, 2014). La CGA, une protéine co-sécrétée avec les catécholamines est également recherchée dans le sang. Une élévation de la CGA est retrouvée chez 90% des patients atteints de PPGL (Stridsberg *and* Husebye, 1997; Grossrubatscher *et al.*, 2006). De nombreuses études s'accordent sur l'utilisation de la CGA en complément du dosage des métabolites des catécholamines (Algeciras-Schimnich *et al.*, 2008; Bílek *et al.*, 2019).

Après l'obtention d'une preuve biochimique de la sécrétion tumorale, l'imagerie est utilisée afin de localiser la tumeur et d'éventuelles métastases. La tomodensitométrie est recommandée en raison de son excellente résolution spatiale pour le thorax, l'abdomen et le bassin. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est préconisée pour la détection des PGL de la base du crâne et du cou, ainsi que pour les femmes enceintes et les enfants. L'imagerie fonctionnelle est utilisée dans les cas de tumeurs malignes (Lenders *et al.*, 2002). Dans les cas familiaux de PHEO, l'histoire familiale constitue un élément de diagnostic important, puisque des tests génétiques peuvent également être réalisés.

Malgré ces différents moyens, le diagnostic du PHEO reste difficile compliquant la prise en charge des patients. Des facteurs environnementaux, alimentaires et médicamenteux peuvent modifier les taux de catécholamines et de CGA. De même la sensibilité et la spécificité des tests utilisés sont variables (cette partie sera abordée plus en détails dans la discussion).

2.5.8. Prise en charge clinique du phéochromocytome

Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant de cibler directement la tumeur. Une prise en charge symptomatique et chirurgicale est donc mise en place.

2.5.8.1. Gestion préopératoire de la tumeur

La détection d'un PHEO va entraîner dans la majorité des cas une exérèse totale de la glande surrénale. Cette opération nécessite une prise en charge en amont du patient, notamment par l'introduction de traitements pharmacologiques en préopératoire qui permettent de diminuer le taux de mortalité de 45% à moins de 2% (Adler *et al.*, 2008).

La gestion pharmacologique a pour but de réduire la pression artérielle induite par l'anesthésie et par la manipulation de la tumeur, et de prévenir l'hypotension pouvant survenir juste après l'ablation de la tumeur. En pré et peropératoire, des antagonistes adrénergiques α et/ou β bloquants peuvent être administrés au patient, le traitement est débuté 7 à 14 jours avant l'opération afin de normaliser les paramètres physiologiques tels que la pression sanguine. En première intention les antagonistes adrénergiques α sont utilisés. Les bloquants β peuvent également être employés mais couplés à une autre molécule et uniquement après un traitement

approprié avec des antihypertenseurs α . Des bloqueurs de canaux calciques et des inhibiteurs de la TH sont aussi administrés dans certains cas (Adler *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2020). Le patient suit également un régime riche en sodium et un apport hydrique afin d'inverser la contraction du volume sanguin induite par les catécholamines en préopératoire, et afin de prévenir une hypotension sévère après l'ablation de la tumeur (Lenders *et al.*, 2014).

Néanmoins ces traitements préopératoires ne sont pas sans conséquences pour le patient. Par exemple, le phenoxybanzamine un des antagonistes α les plus utilisés entraîne de l'hypotension orthostatique, une congestion nasale et un réflexe de tachycardie. L'aténolol un bloquant des récepteurs adrénergiques β provoque de la fatigue et des vertiges (Jain *et al.*, 2020).

2.5.8.2. Approche chirurgicale

La surrénalectomie est le principal traitement du PHEO, elle consiste à réaliser une exérèse chirurgicale de toute la glande surrénale (**Figure 9**). La technique recommandée par le guide de pratique clinique de la société endocrinienne est la laparoscopie (Lenders *et al.*, 2014). Elle est utilisée dans plus de 90% des cas car elle améliore la morbidité postopératoire et permet de réduire la durée et le coût de l'hospitalisation pour des tumeurs de 6 à 10 cm de diamètre. Cette méthode permet de retirer la tumeur de façon peu invasive pour le patient (Tsirlin *et al.*, 2014). La surrénalectomie peut être réalisée par robotique ce qui permet d'améliorer le devenir postopératoire pour des cas compliqués et l'ergonomie pour le chirurgien (Nomine-Criqui *et al.*, 2017). En revanche, pour des PHEO de grandes tailles, métastatiques, ou dans des cas plus complexes une résection ouverte est réalisée.

La chirurgie comporte des risques potentiels, une hypertension peut ainsi provenir de sources spécifiques à l'opération telles que l'intubation du patient, mais également de la libération de catécholamines lors de la manipulation de la tumeur (Flávio Rocha *et al.*, 2004; Tazuin-Fin *et al.*, 2020). Une chirurgie longue pour retirer la tumeur signifie généralement que le processus de résection est difficile, ou peut-être accompagné d'une perte de sang massive, d'une lésion d'organe ou d'une fluctuation de la pression artérielle élevée, ce qui entraîne une morbidité supplémentaire pour le patient (Bai *et al.*, 2018).

Des complications peropératoires sont présentes chez 3% des patients ayant reçu un traitement pharmacologique approprié en préopératoire, contre 69% sans traitement (Goldstein *et al.*, 1999). De même, l'emploi d'une anesthésie générale pour une chirurgie n'est pas sans risque, puisqu'elle peut provoquer des complications cardiovasculaires, respiratoires ou rénales (Harris *and* Chung, 2013). Pour les patients dont le PHEO n'a pas été diagnostiqué, l'induction d'une anesthésie pour une autre indication peut provoquer des crises hypertensives ainsi que des décharges massives de catécholamines (Myklejord, 2004; Sonntagbauer *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019).

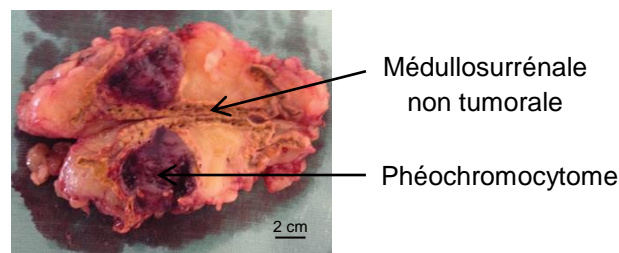


Figure 9 : Photographie représentant un phéochromocytome humain. Opération réalisée par le Pr Laurent Brunaud, CHRU Nancy-Brabois.

2.5.8.3. Management postopératoire du patient

À la suite de l'opération une surveillance de 12 à 48h est requise afin de parer à l'apparition de complications. Une hypotension peut ainsi être due à la résection de la tumeur entraînant une chute brutale des catécholamines ou encore à une activité résiduelle des bloquants. En revanche, une hypertension persistante peut être provoquée par une résection incomplète, une tumeur métastatique ou une tumeur inconnue. La réduction soudaine des catécholamines circulantes après la résection de la tumeur peut entraîner une hyperinsulinémie et une hypoglycémie consécutive en postopératoire. D'autres désagréments peuvent être observés notamment au niveau rénal, pulmonaire et cardiaque (Mamilla *et al.*, 2019). Enfin, tout au long de sa vie le patient doit réaliser des dosages biochimiques ainsi que des examens d'imagerie afin de détecter une tumeur persistance ou récurrente (Naranjo *et al.*, 2017).

2.5.8.4. Les phéochromocytomes malins et inopérables : des cas complexes pour la prise charge

Le PHEO malin est un véritable problème pour les chirurgiens puisqu'aucun critère ne permet de prédire la malignité de la tumeur. Néanmoins des mutations dans le gène de la SDHB sont retrouvées chez environ 40% des patients porteurs de PHEO malins et sont associées à une faible survie (Amar *et al.*, 2007). Les métastases sont retrouvées majoritairement dans les ganglions lymphatiques, les os, le foie et les poumons (Ajallé *et al.*, 2009). Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour les PHEO métastatiques. Une résection de la tumeur primaire permet de diminuer l'excès de catécholamines et les symptômes associés, d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients. Néanmoins les récurrences sont courantes et toutes les métastases ne peuvent pas être retirées. La chimiothérapie et radiothérapie peuvent ensuite être employées, néanmoins seule une fraction de patients répond à ces traitements et souvent de façon partielle et limitée dans le temps, avec de nombreux effets secondaires (Jimenez *et al.*, 2013). D'autres traitements comme des inhibiteurs de tyrosine kinase ou l'immunothérapie sont à l'étude ces dernières années (Roman-Gonzalez *and* Jimenez, 2017).

Une difficulté de prise en charge est également rencontrée pour des patients non opérables. La chirurgie par laparoscopie est ainsi contre-indiquée en cas de risque de rupture de la capsule tumorale, d'invasion des structures adjacentes rendant la tumeur non résécable ou d'incapacité à réaliser la procédure en toute sécurité avec des techniques mini-invasives. De même, les maladies cardiopulmonaires, l'obésité massive ou encore la coagulopathie persistante constituent une barrière à la chirurgie (Gumbs *and* Gagner, 2006; Germain *et al.*, 2011).

De nombreux problèmes, risques et/ou contre-indications se posent donc sur les différents niveaux de prise en charge et de gestion clinique du PHEO. Des traitements symptomatiques sont également utilisés mais aucune molécule ne cible directement l'origine des symptômes qui est liée à la sécrétion des catécholamines.

3. Les analogues somatostatinergriques : un espoir de traitement anti-sécrétoire

3.1. La somatostatine

Aujourd'hui il n'existe aucun traitement anti-sécrétoire permettant de stopper ou de freiner directement l'hypersécrétion des PHEO, et donc d'empêcher les manifestations cliniques qui en découlent. Cependant, une classe de molécules très prometteuse est aujourd'hui utilisée en cancérologie et pourrait constituer une piste sérieuse pour un traitement anti-sécrétoire. Il s'agit des analogues de la somatostatine.

3.1.1. Découverte et historique

La somatostatine (SST) est une hormone peptidique cyclique. La première preuve de son existence a été apportée par Krulich et collaborateurs en 1968. Ils ont montré que des extraits d'hypothalamus de rats inhibaient la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse. Néanmoins, l'étude n'est pas allée plus loin et a émis l'hypothèse d'un artefact (Kruclich *et al.*, 1968). La SST a été isolée et caractérisée par l'équipe du Dr Guillemin en 1972 et l'étude a été publiée en 1973 (Brazeau *et al.*, 1973). Enfin, sa localisation dans les neurones hypothalamiques de rats a été démontrée par Pelletier et son équipe en 1977 (Désy *and* Pelletier, 1977; Pelletier *et al.*, 1977). La SST est également appelée « *somatotropin release-inhibiting factor* » (SRIF) ou « *growth hormone-inhibiting hormone* » (GHIH) car découverte initialement comme inhibiteur de la libération de l'hormone de croissance. Depuis, son rôle inhibiteur général sur la sécrétion hormonale a été largement caractérisé et s'est étendu à d'autres hormones, notamment dans les systèmes nerveux et digestif.

3.1.2. Biosynthèse

La SST est synthétisée sous forme d'un large précurseur de pré-pro-somatostatine qui est rapidement clivé en pro-somatostatine de 92 acides aminés. Cette dernière va ensuite donner naissance à deux formes actives de la SST grâce à des enzymes convertases (**Figures 10, 11**). Un clivage de la pro-somatostatine au niveau d'un site Arg-Lys va donner une forme courte de somatostatine de 14 acides aminés majoritaire dans le système gastro-entéro-pancréatique tandis qu'un clivage

au niveau d'un site Arg donne un peptide plus long de 28 acides aminés qui est retrouvé plus abondamment dans le cerveau (Patel, 1999; Patel *et al.*, 2001) (**Figures 10, 11**). La SST est sécrétée par un grand nombre d'organes périphériques comme le pancréas, le tractus gastro-intestinal, les reins, la prostate mais aussi dans le système nerveux central par l'hypothalamus, l'hippocampe ou encore le striatum (Günther *et al.*, 2018).

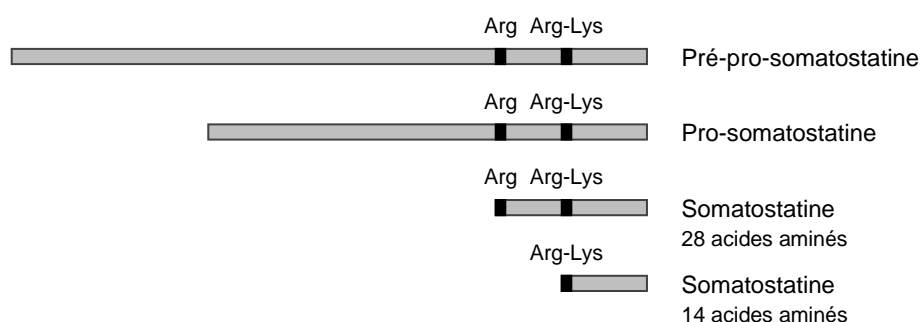


Figure 10 : Représentation schématique de la synthèse de la somatostatine. Les différents clivages vont aboutir à l'obtention de deux formes actives de la somatostatine, l'une de 28 acides aminés et l'autre de 14 acides aminés. Les autres résidus libérés ne sont pas présentés et n'exercent aucune action biologique.

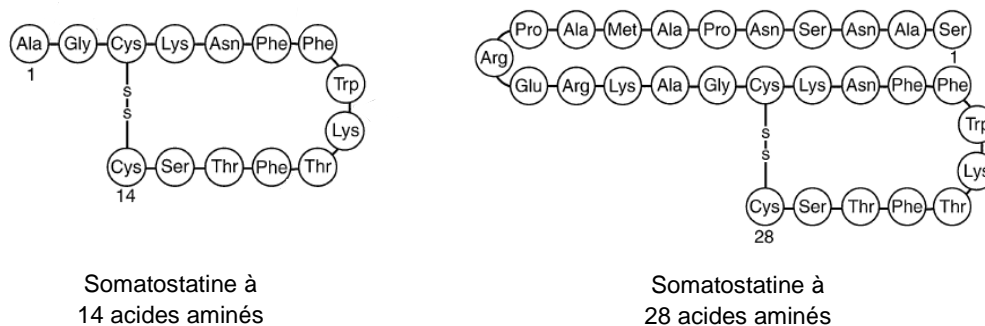


Figure 11 : Structure primaire de la somatostatine de 14 et 28 acides aminés. Adapté de (Susini and Buscail, 2006).

3.1.3. Les récepteurs somatostatinerigiques et leurs signalisations

Il existe 5 types de récepteurs à la SST (SSTR1-5). Tous les SSTR sont codés par des gènes différents, et le gène du SSTR2 peut coder pour 2 isoformes différentes, SSTR2A et SSTR2B. La séquence des différents sous types de récepteurs varie de 356 à 418 acides aminés, avec une identité de séquence de 39 à 57%. Des sites de glycosylations et de phosphorylations sont également présents sur tous les SSTR (Patel *et al.*, 1995). Les SSTR sont des récepteurs couplés aux protéines G à 7 domaines transmembranaires et sont constitués d'une partie extracellulaire qui permet la fixation du ligand, ainsi que d'une partie intracellulaire en lien avec la protéine G qui permet la transduction du signal. Une fois activés, ces récepteurs vont moduler diverses cascades de signalisation telles que l'adénylate cyclase (AC), les phospholipases ou encore l'activité de canaux ioniques (Susini *and* Buscail, 2006; Eigler *and* Ben-Shlomo, 2014).

3.1.3.1. Action anti-sécrétoire

Tous les SSTR sont associés à une protéine G_i qui inhibe l'AC, par conséquent l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) intracellulaire est réduite (**Figure 12**). Ce mécanisme diminue l'activation de la protéine kinase A (PKA). Tandis qu'en parallèle, l'activité des phosphatases telles que la calcineurine est augmentée (Modlin *et al.*, 2010a). Les récepteurs modulent également l'activité de canaux ioniques. Les canaux calciques dépendants du voltage sont inhibés ce qui provoque une diminution du calcium entrant dans la cellule. En revanche différents canaux K^+ sont activés conduisant à une hyperpolarisation de la membrane (Weckbecker *et al.*, 2003) (**Figure 12**). Tous les SSTR exceptés le numéro 3 sont couplés à ces canaux, néanmoins les SSTR2 et SSTR4 sont les plus efficaces pour augmenter les courants K^+ (Yang *et al.*, 2005). L'ensemble des mécanismes aboutissent à une diminution du calcium intracellulaire et donc une inhibition de la sécrétion.

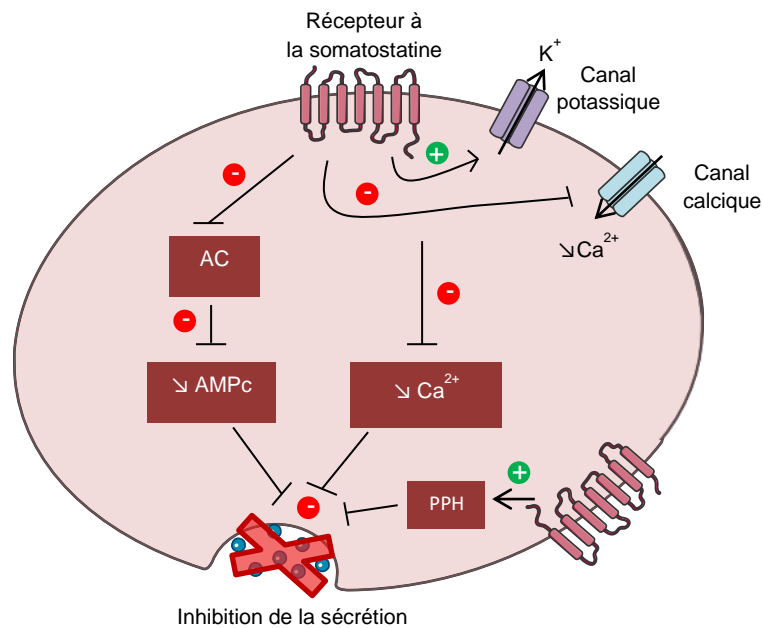


Figure 12 : Effet anti-sécrétoire de la somatostatine. La somatostatine inhibe l'adénylate cyclase (AC) entraînant une diminution de l'AMPc intracellulaire. En parallèle l'activation de canaux potassiques et l'inhibition des canaux calciques engendrent une diminution des flux calciques. Ces cascades de signalisation et l'activation de protéines phosphatases (PPH) inhibent la sécrétion.

3.1.3.2. Autres actions

Chacun des récepteurs possède une pharmacologie et une action propre en plus de leur rôle sur la sécrétion. L'activation des protéines phosphatases (PPH) va avoir un effet anti-prolifératif en bloquant la progression du cycle cellulaire en phase G1/S lorsque les récepteurs impliqués sont les SSTR1, SSTR2, SSTR4 et SSTR5 ou G2/M pour le SSTR3 (Cheung *and* Boyages, 1995; Srikant, 1995). L'activation des SSTR va également impacter la voie MAPK/ERK qui va inhiber la croissance cellulaire, néanmoins sa régulation dépend du SSTR considéré, par exemple le SSTR4 active la voie ERK 1/2 (Smalley *et al.*, 1999) tandis que le SSTR3 l'inhibe (Florio *et al.*, 2003). L'induction de l'apoptose semble en revanche être dépendante du SSTR3 grâce à un processus qui implique p53, Bax et l'activation de caspases (Sharma *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000). Enfin l'activation du SSTR1 va inhiber la protéine G monomérique RhoA diminuant ainsi l'assemblage de fibres de stress d'actine impliqué dans la migration cellulaire (Buchan *et al.*, 2002). Les SSTR peuvent également moduler l'activité de phospholipases, des oxyde nitrique synthases,.... (Susini *and* Buscail, 2006) (**Figure 13**).

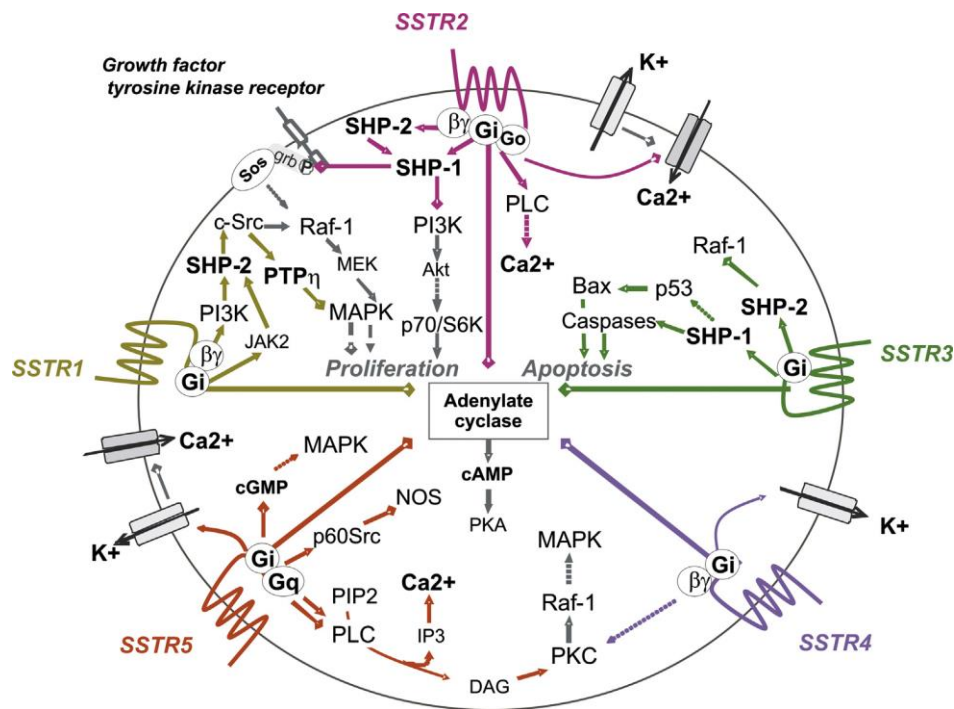


Figure 13 : Représentation des principales cascades de signalisation des cinq SSTR. Tous les SSTR sont couplés à une protéine Gi et inhibent l'adénylate cyclase baissant le taux d'AMPc. Flèche fermée émoussée : effet stimulant, flèche ouverte : effet inhibiteur, lignes interrompues : effet indirect. Akt : AKT8 virus oncogene cellular homolog, Bax : Bcl-2-associated X, cAMP/cGMP : cyclic adenosine/guanosine monophosphate, Grb : growth factor receptor bound protein, JNK : c-Jun NH(2)-terminal kinase, DAG : diacylglycerol, MAPK : mitogen-activated protein kinase, IP3 : inositol trisphosphate, NOS : nitric oxide synthase, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, PLC : phospholipase C, PTP : protein tyrosine phosphatase, Raf : rapidly accelerated fibrosarcoma, SHP : SH2-containing phosphatase, Sos : son of sevenless, Src : rous sarcoma oncogene cellular homolog, SSTR : récepteur à la somatostatine, STAT5 : signal transducer and activator of transcription 5, VEGF : vascular endothelial growth factor. D'après (Theodoropoulou *and* Stalla, 2013).

3.1.4. Fonctions physiologiques de la somatostatine

La SST exerce une multitude d'actions physiologiques, dont la plus connue est l'inhibition de la libération de l'hormone de croissance (Brazeau *et al.*, 1973; Vale *et al.*, 1975). Cette propriété anti-sécrétoire s'est progressivement étendue, puisqu'il est maintenant connu que la SST inhibe les sécrétions d'insuline et de glucagon des cellules pancréatiques. Elle régule également le processus de digestion en supprimant le relargage de la gastrine, de l'histamine et de l'acide chlorhydrique par l'estomac. La libération d'interféron γ par les lymphocytes T est également diminuée par la SST, modulant ainsi la réponse immunitaire. D'autres fonctions sont influencées par la SST telles que la contractilité de la vésicule biliaire ou l'absorption intestinale, mais aussi des fonctions comportementales et cognitives (Barnett, 2003; Low, 2004).

3.2. Les analogues de la somatostatine : les nouvelles molécules employées en cancérologie

3.2.1. Du développement à aujourd'hui

La SST possède une demi-vie courte variant de 1 à 3 min (Modlin *et al.*, 2010a). Après activation du récepteur elle est rapidement internalisée puis dégradée par des endopeptidases endosomales, ou des peptidases présentes dans la circulation sanguine (Dupont *et al.*, 1978; Werle *and* Bernkop-Schnürch, 2006; Roosterman *et al.*, 2008). Cette propriété freine l'usage de la somatostatine en clinique. Afin de palier à cette limitation, les entreprises pharmaceutiques ont développé des analogues de la somatostatine plus stables, avec une demi-vie plus longue, afin de les utiliser en cancérologie.

Dans les années 80, il a été mis en évidence que l'organisation en feuillet β par 4 acides aminés (Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹ et Thr¹⁰) était nécessaire pour l'activité biologique de la SST (**Tableau 8**). Le Trp⁸ et la Lys⁹ sont indispensables tandis que la Phe⁷ et la Thr¹⁰ peuvent être substituées (Modlin *et al.*, 2010a). Cette avancée va permettre une accélération dans le développement de nouvelles molécules et la synthèse de l'octréotide (SMS 201–995). Cette molécule est prometteuse puisqu'elle a montré un potentiel supérieur à la somatostatine pour inhiber les sécrétions hormonales et elle possède une durée de vie plus longue (Bauer *et al.*, 1982). Sa structure a été modifiée par l'introduction de deux acides aminés non naturels en N-terminal et C-terminal ainsi qu'une substitution du L-Trp en D-Trp. Ces modifications rendent le peptide résistant à la dégradation, permettant une action de plusieurs heures dans l'organisme. En 1983, l'octréotide (OCT) est introduit sur le marché et est actuellement utilisé pour le traitement d'une TNE hypophysaire somatotrope hypersécrétant de la GH à l'origine d'acromégalie, ainsi que pour des tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques (TNE-GEP) (Novartis Pharmaceuticals, 2012 ; Lamberts *and* Hofland, 2019). Dans certains cas l'octréotide peut également être utilisé dans le traitement d'adénomes thyroïdiens (VIDAL). Il est actuellement commercialisé sous le nom de Sandostatine® par Novartis. Le lanréotide (BIM23014), un autre analogue de la SST avec les mêmes applications thérapeutiques que l'OCT, est commercialisé sous l'appellation Somatuline®. Ces

deux drogues présentent toutes les deux une affinité préférentielle pour le SSTR2 (Modlin *et al.*, 2010b; Rai *et al.*, 2015) (**Tableau 8**).

Au début des années 2000, une nouvelle génération d'analogues somatostatinerigiques voit le jour avec la mise au point du pasiréotide (SOM230), un cyclohexapeptide commercialisé par Novartis sous l'appellation Signifor®. Sa structure comprend les éléments de la SST mais avec des acides aminés artificiels tels que la phénylglycine ou l'O-benzyl-tyrosine. Actuellement le SOM230 est utilisé dans le traitement de la maladie de Cushing, un trouble endocrinien caractérisé par un hypercortisolisme. Cette pathologie est causée par une TNE hypophysaire corticotrope, qui hypersécrète de l'ACTH, induisant ensuite une libération excessive de cortisol par la glande surrénale. Le SOM230 est aussi utilisé pour contrôler l'hypersecretion de patients atteints d'acromégalie (Novartis Pharmaceuticals, 2014 ; Cuevas-Ramos *and* Fleseriu, 2016; Pivonello *et al.*, 2020). Cette molécule possède une demi-vie de plusieurs heures, avec une forte affinité pour le SSTR5. Le SOM230 possède également une affinité 30, 5 et 40 fois plus élevée pour les SSTR1, SSTR3 et SSTR5 respectivement en comparaison à l'OCT (Schmid, 2008) (**Tableau 8**). Un 4^{ème} analogue de la SST est disponible sur le marché, le vapréotide qui est indiqué dans le traitement des varices œsophagiennes saignantes secondaires à une hypertension portale (Rai *et al.*, 2015).

Nom	Nom commercial	Molécule	Affinité préférentielle	CI ₅₀ (nmol/L)				
				SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
SST-14	Somatostatine		SSTR2,5,3,1,4	0,93	0,15	0,56	1,5	0,29
Octréotide (SMS 201-995)	Sandostatine®		SSTR2,5,3,1,4	280	0,38	7,1	>1000	6,3
Lanréotide (BIM23014)	Somatuline®		SSTR2,3,5,1,4	180	0,54	14	230	17
Pasiréotide (SOM230)	Signifor®		SSTR5,2,3,1,4	9,3	1	1,5	>1000	0,16

Tableau 8 : Présentation de la somatostatine et de ses analogues utilisés dans le traitement des tumeurs neuroendocrines. La structure des molécules est présentée avec les quatre acides aminés importants pour l'activité biologique en gras : Phe⁷, Trp⁸, Lys⁹ et Thr¹⁰. Les acides aminés Trp⁸ et Lys⁹ sont indispensables pour l'activité biologique, tandis que les acides aminés Phe⁷ et Thr¹⁰ peuvent subir une substitution. Les valeurs des concentrations inhibitrices médianes (CI₅₀) sont extraites de (Susini *and* Buscail, 2006) et les structures de (Chan *et al.*, 2013) . SSTR : récepteur de la somatostatine, Lys : lysine, Phe : phénylalanine, Thr : thréonine, Trp : tryptophane.

3.2.2. Les récepteurs de la somatostatine et les tumeurs neuroendocrines

Diverses études ont montré l'expression des SSTR sur des cultures primaires de TNE, rendant possible l'utilisation des analogues de la SST en cancérologie. La méthode quantitative la plus couramment utilisée pour mettre en évidence l'expression de l'ARNm des SSTR est la RT-PCR. Ainsi, dans les TNE pancréatiques, gastro-entéro-pancréatiques et gastro-intestinales humaines l'expression des SSTR1 et SSTR2 est retrouvée dans 85 à 100% des échantillons tandis que les SSTR3 et SSTR5 sont présents dans 42 à 79% des tumeurs (Papotti *et al.*, 2002; Saveanu *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2014). Pour l'insulinome, un sous type de TNE pancréatique, l'expression majoritaire est retrouvée pour les SSTR2 et SSTR5 dans 70% des cas (Bertherat *et al.*, 2003). Les expériences d'immunohistochimie, d'hybridation *in situ* et d'autoradiographie ont permis de confirmer que le SSTR2 est retrouvé le plus fréquemment, tandis que les

expressions sont plus variables et dépendent du sous type de TNE considérée pour les SSTR1, SSTR3 et SSTR5. Mise en évidence dans moins de 25% des échantillons, l'expression du SSTR4 semble peu répandue (Papotti *et al.*, 2002; Bertherat *et al.*, 2003) (**Tableau 9**).

Pour les TNE pulmonaires, l'expression est également retrouvée en majorité pour les SSTR1 et SSTR2 dans 88% des tumeurs (Kanakis *et al.*, 2015). D'autres méthodes confirment cette tendance lorsque tous les récepteurs sont recherchés (Reubi *and* Waser, 2003; Righi *et al.*, 2010; Tsuta *et al.*, 2012; Kanakis *et al.*, 2015). L'expression des SSTR3 et SSTR5 est variable en fonction de la tumeur étudiée, tandis que le SSTR4 est rarement exprimé (**Tableau 9**).

Dans les PHEO et PGL, la recherche de l'ARNm des SSTR par RT-PCR montre que le SSTR2 est présent chez 100% des patients (Pasquali *et al.*, 2008; Saveanu *et al.*, 2011). L'étude de Pasquali *et al.*, en 2008 montre également une expression du SSTR5 dans 100% des cas, tandis qu'il n'est retrouvé que dans 54% des échantillons par Saveanu *et al.* en 2011. Ces derniers montrent en revanche une expression du SSTR1 dans plus de 90% des échantillons. Tandis que des expériences d'immunocytochimie montrent une expression majoritaire du SSTR3 (Mundschenk *et al.*, 2003; Unger *et al.*, 2008; Leijon *et al.*, 2019) (**Tableau 9**).

Enfin, pour les adénomes de pituitaires, l'ARNm des SSTR2 et SSTR5 est majoritaire pour les tumeurs de type somatotropes ou corticotropes (Taboada *et al.*, 2007; de Bruin *et al.*, 2009; Neto *et al.*, 2009; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016). Tandis que pour les prolactinomes, un autre sous type de TNE pituitaire, l'ARNm des SSTR1 et SSTR2 est retrouvé le plus couramment et en quantité plus importante que les autres SSTR (Miller *et al.*, 1995; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016) (**Tableau 9**).

Malgré une variabilité de l'expression des SSTR en fonction des études et des méthodes utilisées, toutes les TNE expriment une diversité de SSTR. Cette observation a permis le développement et l'utilisation de nouveaux analogues de la somatostatine, dont l'octréotide et le SOM230.

Tumeurs	Expressions des SSTR	ARNm/Protéine	Méthodes
TNE pancréatiques	SSTR1 = SSTR2 > SSTR3 > SSTR5	ARNm	RT-PCR
	SSTR1 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR5 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR2 > SSTR5 > SSTR3	Protéine	IHC
	SSTR2A	Protéine	IHC
	SSTR2 > SSTR5	Protéine	IHC
- Insulinomes	SSTR2 = SSTR5 > SSTR1 > SSTR3 = SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR3 = SSTR5 > SSTR2A > SSTR1	Protéine	IHC
	SSTR2 = SSTR5 > SSTR1 = SSTR3 > SSTR4	Protéine	AR
	SSTR2 > SSTR1 > SSTR3 > SSTR5 > SSTR4	Protéine	AR
- Glucagomes	SSTR1 = SSTR2 > SSTR3 > SSTR4 = SSTR5	Protéine	AR
- VIPomes	SSTR2 > SSTR1 = SSTR3 = SSTR5	Protéine	AR
TNE gastro-entéro-pancréatiques	SSTR2 > SSTR1 > SSTR3	ARNm	HIS
	SSTR1 = SSTR2 > SSTR5 > SSTR3	ARNm	RT-PCR
- TNE carcinoïdes	SSTR2A > SSTR5 > SSTR3 > SSTR1	Protéine	IHC
- Gastrinomes	SSTR2A > SSTR3 > SSTR5 > SSTR1	Protéine	IHC
TNE gastro-intestinales	SSTR2 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR3 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR1 > SSTR2	ARNm	HIS
	SSTR2 = SSTR5 > SSTR3	Protéine	IHC
TNE de l'estomac	SSTR2 > SSTR5	Protéine	IHC
TNE du petit intestin	SSTR2 = SSTR5	Protéine	IHC
TNE iléales	SSTR2 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR3 > SSTR4	Protéine	AR
TNE de l'appendice	SSTR2 > SSTR5	Protéine	IHC
TNE du rectum	SSTR2 > SSTR5	Protéine	IHC
TNE carcinoïdes pulmonaires	SSTR1 = SSTR2A > SSTR5 > SSTR3 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR1 > SSTR2 > SSTR5 > SSTR3 > SSTR4	Protéine	AR
- carcinoïdes typiques	SSTR2A > SSTR1 > SSTR5 > SSTR3 > SSTR4	Protéine	IHC
	SSTR2A > SSTR1 > SSTR2B > SSTR3 > SSTR4 > SSTR5	Protéine	IHC
	SSTR3 > SSTR2A	Protéine	IHC
- carcinoïdes typiques avec métastases	SSTR2A > SSTR3	Protéine	IHC
- carcinoïdes atypiques	SSTR1 = SSTR2A = SSTR2B > SSTR3 > SSTR4 = SSTR5	Protéine	IHC
	SSTR2A > SSTR3	Protéine	IHC
- carcinomes neuroendocriniens à petites cellules	SSTR2A > SSTR1 > SSTR2B > SSTR3 > SSTR4 = SSTR5	Protéine	IHC
	SSTR2A > SSTR3	Protéine	IHC
- carcinomes neuroendocriniens à larges cellules	SSTR1 = SSTR2A > SSTR3 > SSTR2B > SSTR5 > SSTR4	Protéine	IHC
	SSTR2A = SSTR3	Protéine	IHC
Pheochromocytomes	SSTR2 = SSTR5 > SSTR1 = SSTR3 = SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR2 > SSTR1 > SSTR3 > SSTR5	ARNm	RT-PCR
	SSTR3 > SSTR2A > SSTR5 > SSTR4 > SSTR1	Protéine	IHC
	SSTR3 > SSTR2 > SSTR5 > SSTR1 > SSTR4	Protéine	IHC
	SSTR3 > SSTR1 = SSTR2A = SSTR5 > SSTR4	Protéine	IHC
- pheochromocytomes bénins	SSTR3 > SSTR5 > SSTR4 > SSTR1 = SSTR2A	Protéine	IHC
- pheochromocytomes malins	SSTR3 > SSTR2 > SSTR1 > SSTR4 = SSTR5	Protéine	IHC
Paragangliomes	SSTR2 > SSTR1 > SSTR3 = SSTR5	ARNm	RT-PCR
	SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR4	Protéine	IHC
- paragangliomes malins	SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR4	Protéine	IHC

TNE pituitaires - Somatotropinomes	SSTR5 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR5 > SSTR3 > SSTR2 > SSTR1 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR5 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR5 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR2 = SSTR5 > SSTR1 > SSTR3 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR5 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1	ARNm	RT-PCR
- Corticotropinomes	SSTR5 > SSTR2 > SSTR1 > SSTR3 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR2 > SSTR5 > SSTR1 > SSTR3 = SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR5 > SSTR1 > SSTR2 > SSTR4 > SSTR3	ARNm	RT-PCR
	SSTR5 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1	ARNm	RT-PCR
- Prolactinomes	SSTR5 > SSTR4 = SSTR1 = SSTR2 = SSTR3	Protéine	IHC
	SSTR1 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR5 > SSTR4	ARNm	RT-PCR
	SSTR1 > SSTR2 > SSTR5 > SSTR3 = SSTR4	ARNm	RT-PCR

Tableau 9 : Expression des différents sous types de récepteurs à la somatostatine dans les tumeurs neuroendocrines par différentes méthodes. AR : autoradiographie, ARNm : acide ribonucléique messager, HIS : hybridation in situ, IHC : immunocytochimie, RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction, SSTR : récepteur à la somatostatine, TNE : tumeur neuroendocrine. D'après (Miller *et al.*, 1995; Batista *et al.*, 2006; Taboada *et al.*, 2007; Casarini *et al.*, 2009; de Bruin *et al.*, 2009; Neto *et al.*, 2009; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016; Vitale *et al.*, 2018; Leijon *et al.*, 2019).

3.2.3. Les effets secondaires

Les analogues de la SST comme toutes molécules pharmaceutiques peuvent engendrer des effets indésirables chez les patients. Ces derniers rapportent majoritairement des problèmes digestifs tels que des diarrhées, nausées, crampes abdominales et malabsorption des graisses les jours suivants le début du traitement (Chen *et al.*, 2014; Lamberts and Hofland, 2019). Des effets sur le métabolisme sont également répertoriés. Une méta-analyse sur des patients acromégaliques a montré un impact mineur de l'OCT et du lanréotide sur le métabolisme glucidique (Mazziotti *et al.*, 2009). Tandis que, le SOM230 modifie l'homéostasie glucidique des patients traités (Silverstein, 2016; Vergès, 2017). Cette partie sera abordée plus en détails dans la discussion.

3.2.4. Utilisation en médecine nucléaire

L'expression de différents SSTR par les TNE a entraîné le développement d'analogues de la SST radiomarqués pour le diagnostic et le traitement des TNE en médecine nucléaire. Le médicament radiopharmaceutique le plus utilisé pour la scintigraphie basée sur les SSTR est l'indium (111In)-pentétréotide (Octréoscan®), cependant le protocole est lourd pour le patient, avec des rayonnements élevés pour une faible résolution. L'utilisation d'analogues de la SST couplés au Gallium-18 en

tomographie par émission de positons a permis par la suite d'améliorer la résolution et de diminuer les doses injectées. Trois radiopharmaceutiques ont été développés avec des affinités variées pour les SSTR : le ^{68}Ga -DOTATATE approuvé par la *U.S. Food and Drug Administration* en 2016, le ^{68}Ga -DOTATOC approuvé par l'Union européenne et le ^{68}Ga -DOTANOC. Ils sont utilisés pour le diagnostic et l'évaluation des traitements de plusieurs TNE dont les TNE-GEP (Brabander *et al.*, 2015; Graham *et al.*, 2017; Sanli *et al.*, 2018; Ivanidze *et al.*, 2019).

En thérapeutique, les analogues de la SST sont marqués avec des radionucléides comme le Lutétium-177 ou le Yttrium-90 afin d'irradier les tumeurs exprimant les SSTR. Le ^{90}Y -DOTATOC (^{90}Y -octréotide) et le ^{177}Lu -DOTATATE (^{177}Lu -octreotate) sont utilisés en *peptide receptor radionuclide therapy* (PRRT) et permettent le ciblage de TNE inopérables ou métastatiques. Leur utilisation permet de contrôler la pathologie dans 68 à 94% des cas, de diminuer le volume tumoral et les marqueurs biochimiques (Bodei *et al.*, 2016; Stueven *et al.*, 2019). Une étude clinique de phase III a démontré que l'administration du ^{177}Lu -DOTATATE améliore la survie et le taux de réponse de patients atteints de TNE intestinales métastatiques en comparaison à l'OCT à longue durée d'action (Strosberg *et al.*, 2017). D'autres approches sont à l'étude ces dernières années, notamment avec l'utilisation d'antagonistes somatostatinerigiques radiomarqués (Dalm *et al.*, 2016).

RÉSULTATS

RÉSULTATS

1. Publication n°1 : Étude des mécanismes de l'exocytose régulée par le calcium dans le phéochromocytome humain

1.1. Objectifs et déroulement de l'étude

La sécrétion excessive de catécholamines chez les patients atteints de phéochromocytome est à l'origine de sérieux problèmes cliniques tels que de l'hypertension, l'augmentation du risque d'accidents cardiovasculaires et le développement potentiel de cardiomyopathies (Tsirlin *et al.*, 2014). À ce jour les mécanismes moléculaires qui induisent et maintiennent l'hypersécrétion ne sont pas connus.

Découvrir les origines de l'hypersécrétion tumorale apparaît comme crucial et permettrait à terme d'améliorer les connaissances sur ces tumeurs mais également d'ouvrir des pistes de recherches pour développer de nouvelles thérapies. Notre étude a pour objectif de caractériser la sécrétion catécholaminergique des phéochromocytomes afin de déterminer quel(s) paramètre(s) de l'exocytose peuvent être dérégulés dans cette tumeur. Pour cela j'ai mis en culture des échantillons de phéochromocytomes humains et de médullosurrénales non tumorales afin de comparer leur capacité sécrétoire par ampérométrie à fibre de carbone. Ces expériences m'ont permis de voir que l'emballement de la sécrétion de ces tumeurs provient d'une dérégulation à l'échelle unicellulaire, et que différents paramètres de l'exocytose sont impactés. Grâce à une analyse par spectrométrie de masse réalisée par l'entreprise Caprion, nous avons mis en évidence que ces tumeurs présentent des changements d'expression de protéines spécifiquement impliquées dans l'exocytose.

1.2. Résultats

Les résultats obtenus sont exposés dans le manuscrit intitulé « **Systematic investigation of calcium-regulated exocytosis in human pheochromocytoma** » que je signe en co-premier auteur et qui est encore en préparation.

Dans cette étude j'ai contribué à l'analyse de la sécrétion de plusieurs phéochromocytomes par ampérométrie à fibre de carbone.

Amperometric and proteomic investigation of calcium-regulated exocytosis in human pheochromocytoma

Sébastien Houy^{1*}, Laura Streit^{1*}, Marion Rame¹, Charles Decraene¹, Sophie Moog¹, Laurent Brunaud², Joël Lanoix³, Rabie Chelbi^{1,6}, Florence Bihain², Stéphanie Lacomme⁴, Sandra Lomazzi⁴, Michel Vix⁵, Didier Mutter⁵, Eustache Paramithiotis³, Nicolas Vitale¹, Stéphane Ory^{1#} and Stéphane Gasman^{1#§}

¹*Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, FRANCE.*

²*Département de Chirurgie Viscérale, Métabolique et Cancérologique (CVMC), Unité médico-chirurgicale de chirurgie métabolique, endocrinienne et thyroïdienne (UMET), Unité médico-chirurgicale de chirurgie de l'obésité (UMCO), Université de Lorraine, CHRU NANCY, Hôpital Brabois adultes, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, FRANCE.*

³*Caprion Proteome, Inc., 201 avenue Président-Kennedy, suite 3900, Montréal, Québec, CANADA H2X 3Y7.*

⁴*Centre de Ressources Biologiques Lorrain, CHRU Nancy, Hôpitaux de Brabois, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, FRANCE.*

⁵*NHC Strasbourg, Service de Chirurgie Digestive et Endocrinienne des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital Civil, F-67000 Strasbourg, FRANCE.*

⁶*Inovation, F-75005 Paris, FRANCE.*

* S. Houy and L. Streit contributed equally to this paper

S. Ory and S. Gasman contributed equally to this paper

§ Corresponding author: Stéphane Gasman, address as above.

e-mail: gasman@inci-cnrs.unistra.fr

Short title: Secretory activity of human pheochromocytoma cells

Key words: calcium-regulated exocytosis, neuroendocrine tumor, pheochromocytoma, carbon fiber amperometry

ABSTRACT

Neuroendocrine tumors constitute a heterogeneous group of tumors arising from hormone-secreting cells and are generally associated with a dysfunction of secretion. Pheochromocytoma (Pheo) is a neuroendocrine tumor that develops from chromaffin cells of the adrenal medulla, and is responsible of an excess of catecholamine secretion leading to severe clinical symptoms such as hypertension, elevated stroke risk and various cardiovascular complications. Surprisingly, while the hypersecretory activity of Pheo is well known to pathologists and clinicians, it has never been carefully explored at the cellular and molecular levels from individual tumor cells. In the present study, we have combined catecholamine secretion measurement by carbon fiber amperometry on human tumor chromaffin cells directly cultured from freshly resected Pheo, with the analysis by mass spectrometry of the exocytotic proteins differentially expressed between the tumor and the matched adjacent non-tumor tissue. Catecholamine secretion recordings from individual Pheo chromaffin cells obtained from most patients reveal a higher number of exocytic events per cell associated with faster kinetic parameters. Accordingly, we unravel significant tumor-associated modifications in the expression of key proteins involved in different steps of the calcium-regulated exocytic pathway. Altogether, our findings indicate that the tumor-associated hypersecretion of catecholamine is likely to be a consequence of a dysfunction of the calcium-regulated exocytosis at the level of individual Pheo chromaffin cell.

INTRODUCTION

Through the secretion of hormones and neuropeptides, the neuroendocrine system controls many vital functions such as metabolism, blood pressure, reproduction, growth and development, stress and eating behavior, to cite only a few. Neoplasms can derive from all kind of hormone secreting cells giving rise to a neuroendocrine tumor (NET). NETs constitute a highly heterogeneous group of neoplasm, but share a common feature in that they are often associated with a deregulation of hormone secretion, mainly hypersecretion, which can induce symptoms and major clinical complications (Zandee, *et al.* 2017). Therefore, the secretory pathways and their dysfunction appear as an important issue to be considered in NETs. Surprisingly, while the hypersecretory activity of NETs is well known to pathologists and clinicians, to our knowledge it has never been carefully explored at the cellular and molecular levels.

In neuroendocrine cells, hormones and neuropeptides are stored in large dense core vesicles (secretory granules) and are secreted through calcium-regulated exocytosis, a process that has been intensively studied since many decades (Anantharam and Kreutzberger 2019). It involves several tightly regulated trafficking steps including the recruitment of secretory granules to the cell periphery, their docking to exocytic sites of the plasma membrane, their priming and finally the fusion between the secretory granule membrane and the plasma membrane leading to the release of the intra-granular content (Burgoyne and Morgan 2003; Lang and Jahn 2008). Chromaffin cells of the adrenal medulla, which store and then secrete catecholamines into the blood stream, have been widely used by us and others as an experimental model to uncover the molecular mechanisms controlling calcium-regulated exocytosis (Bader, *et al.* 2002; Gasman and Vitale 2017; Malacombe, *et al.* 2006).

The NET deriving from chromaffin cells of the adrenal medulla is called pheochromocytoma (Pheo) (Lenders, *et al.* 2020). Most of the Pheos are responsible for catecholamine hypersecretion leading to clinical symptoms such as permanent or paroxysmal hypertension or to cardiovascular complications including myocarditis, Takotsubo syndrome and various forms of cardiomyopathies (Lenders, *et al.* 2020; Pappachan, *et al.* 2018; Pourian, *et al.* 2015; Y-Hassan and Falhammar 2020; Zhang, *et al.* 2017). The reason for this excess of secretion is not known. One likely possibility could be an increase of the secretory capacity at the single cell level. We therefore attempted to investigate the cellular mechanisms responsible for

specific secretion dysfunction in Pheo by applying on primary culture of human Pheo cells, carbon fiber amperometry, a technique that enables precise measurement of individual exocytotic event dynamics in real time and in single cell (Fathali and Cans 2018; Mosharov and Sulzer 2005). Combined with the detection in human Pheo tissue of exocytotic protein expression changes by mass spectrometry, it allowed us to reveal upregulated exocytosis at the single cell level and to identify specific steps of the exocytotic process that are dysregulated in the tumor as well as potential actors of the molecular machinery triggering hypersecretion in Pheo.

MATERIAL AND METHODS

Subjects and samples

The medical files of patients with pheochromocytoma, followed-up between 2013 and 2020 in 2 French centers were retrospectively reviewed. Informed consents for genetics test and this study were obtained from all patients. We collected the complete characterization made at the time of initial diagnosis, including a clinical examination looking for hormonal- or tumoral-related symptoms, biological analysis and genetic testing proposed to identify germline mutations in the major susceptibility genes as recommended by the Endocrine Society clinical practice guideline published in 2014 (Lenders, *et al.* 2014). Pathological evaluation was reviewed, including tumor size, Ki-67 result and the PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score) system as previously described (Thompson 2002). Biological analysis comprised the measurement of metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) levels (in urine and/or plasma). When available, chromogranin A (CGA) measurements were also registered. Levels of free MN, NMN and CGA in plasma, as well as urinary levels of MN and NMN are presented as ratios normalized by upper limits of normal (ULN). Plasma and urinary MN or NMN levels reaching two-fold the upper limit of the normal range and/or CGA exceeding the upper limit of the normal range was defined as the threshold of abnormal hormonal secretion. The ULN of free metanephrine (MN) and normetanephrine (NM) were 4.05 and 9.8 nmol/L in plasma and 1625 and 2620 nmol/24 h in urine, respectively. The upper reference limit for CGA was 100 mg/L. We have categorized the catecholamine-producing phenotype of Pheo as previously described (Eisenhofer, *et al.* 2005): adrenergic (AD) phenotype, in case the MN content exceeds 10% of the combined MN and NM contents or, noradrenergic (NAD) phenotype in case the MN content remained below 10% of the combined MN and NM contents.

Primary culture of human pheochromocytomas

Human chromaffin cells were cultured from freshly resected tumor adrenal gland following surgery (Moog, *et al.* 2018). In the operating room and immediately after the resection, the adrenal gland was cut longitudinally in two parts. Roughly 1 cm³ piece of tumoral tissue was dissected and immediately plunged into ice cold transport medium (Ca²⁺- and Mg²⁺-free Hank's Balanced Salt Solution (CMF HBSS, Sigma) supplemented with 0.2% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma) or MACS Medium Tissue

Storage solution (Miltenyi Biotec). Up to 3 hours after resection, the tumor sample was minced into 1 mm³ pieces in a dish containing CMF HBSS. Chunks were collected, centrifuged at 250 g for 5 min at room temperature and the pellet resuspended in 15 mL of complete medium (RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco), 15% FBS, 1% penicillin/streptomycin). Red blood cells, fat and debris were separated from minced tissue by sedimentation for 15 minutes at room temperature. The supernatant was removed and 15 mL of complete medium were added to pellet before centrifugation at 250 g for 5 min. Tumor pieces were resuspended in HBSS (in 10 times the tissue volume), containing 1.5 mg/mL of collagenase B (Roche) and 1 mg/mL of the protease dispase II (Gibco) and gently rocked for 45 min at 37°C. 5 min before the end of protease digestion, 0.1 mg/mL DNase I (Roche) was added to remove potential DNA clumps. Samples were left for a few minutes to sediment at room temperature and supernatant recovered (fraction 1). The pellet was resuspended in 5 mL of CMF HBSS and triturated for a couple of minute to dislodge tumor cells from chunks. The remaining pieces were left few minutes to sediment and the supernatant recovered (fraction 2). Both fractions were centrifuged at 800 g for 5 min at room temperature. Cell pellets were resuspended in 2 mL of CMF HBSS. Four mL of Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche) was added before being gently rocked for 10 min at room temperature. The fractions were centrifuged at 500 g for 5 min and resuspended into complete medium. Cell viability and density were estimated under a microscope and 300 µL of cell suspension were seeded into type I collagen (Corning)-coated 35 mm dishes (MatTek) cover with glass coverslips. Cells were left to adhere overnight at 37°C in an incubator with water-saturated and 5% CO₂ atmosphere. Two mL of complete RPMI was added the following day and cells were used within two days.

Carbon fiber amperometry

Chromaffin cells were washed with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.2 mM MgSO₄, 11 mM glucose, 0.01 mM EDTA and 15 mM HEPES, pH 7.5) and processed for catecholamine release measurements by amperometry as previously described (Houy, *et al.* 2015; Tanguy, *et al.* 2020). A carbon fiber electrode of 5 µm diameter (ALA Scientific Instruments) was held at a potential of +650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached close to the cell. Secretion of catecholamines was induced by a 10 s pressure ejection of a 100 µM nicotine (Sigma Aldrich) solution from a micropipette positioned 10 µm from the cell and recorded over 60 s. The

amperometric recordings were performed with an AMU130 amplifier (Radiometer Analytical), calibrated at 5 kHz, and digitally low-pass filtered at 1 kHz. Analysis of the amperometric recordings was performed as previously described with a macro (laboratory of Dr. R. Borges; <http://webpages.ull.es/users/rborges/>) written for Igor software (WaveMetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters (Segura, *et al.* 2000). The spike parameters analysis was restricted to spikes with amplitudes higher than 5 pA, which were considered as exocytic events. All spikes identified by the program were visually inspected. Overlapping spikes and spikes with aberrant shapes were discarded for parameters analysis. Quantal size (spike charge, Q) of each individual spike was measured by calculating the spike area above the baseline. Spike area is defined as the time integral of each transient current, I_{max} as the height of each peak, and half-width the width of each spike at half its height (**Figure 1**).

Tissue fractionation

Frozen tumor and matched non-tumor adjacent tissues were cut into small pieces (~10 mm³), and 3 mL of homogenization buffer (0.25M sucrose/10 mM Tris pH 7.4/100 units/mL of DNase 1/ 5 mM MgCl₂, Complete protease inhibitor EDTA-free cocktail) was added per tissue sample, homogenized twice for 10 seconds and one time for 20 seconds using a polytron set at speed 4.0. Homogenates were filtered through a 180 μm nylon and brought to 3 mL with the homogenization buffer, if necessary. Light membrane were obtained by isopycnic centrifugation using discontinuous sucrose gradients in which samples brought to 1.4M sucrose were layered by 1.2M and 0.8M sucrose. After centrifugation at 155,000 g for 2 hours at 4°C, the light membrane fraction located at the 0.8M to 1.2M sucrose interface was collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The light membrane fraction is enriched with plasma membrane, Golgi, endosomes and secretory pathway associated membranes. The cytosol fractions were obtained by centrifuging 200 μL of crude homogenates at 150 000 g for 1 hour at 4°C. The supernatant was collected, snap-frozen and stored at -80°C.

The amounts of protein were determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay according to the manufacturer's instructions (Pierce).

Mass spectrometry analysis

30 µg of samples (homogenates, cytosol and light membranes) were incubated in a denaturing buffer at final concentration of 7M urea/175 mM NH₄HCO₃/8.75% v/v acetonitrile and incubated for 30 minutes at room temperature. Samples were then diluted to 1M urea with water and digested with trypsin (Promega) overnight at 37°C at a ratio of 1 µg of trypsin per 10 µg of protein for homogenate and cytosol samples while for light membranes, the ratio was set at 1 µg of trypsin per 25 µg of proteins. Samples were reduced with 10 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (final concentration), incubated for 30 minutes at room temperature and then acidified to 0.5N HCl. Finally the samples were desalted using C18 96-well plates (3M Empore). The C18 eluates from homogenate samples were evaporated and stored at 4°C prior to MS analysis. The C18 eluates from light membrane and cytosol samples were collected in injection plates for strong cation exchange (SCX), dried by vacuum evaporation and stored at -20°C.

To fractionate peptides by SCX chromatography, samples were solubilized with reconstitution buffer (0.2% v/v formic acid, 10% v/v acetonitrile for light membrane samples; 20mM K₂HPO₄, 25% v/v acetonitrile for cytosol samples) and loaded on an SCX column. Three fractions were collected following elution using a salt gradient. At the end of each SCX fractionation batch, the collected fractions were stored at -80°C. Once the SCX fractionation was completed, the fractions were freeze-dried and then desalted. The eluates were divided equally into two 96-well plates; one plate for LC-MS/MS analysis and the other plate as a back-up. All plates were vacuum evaporated and stored at -20°C until analysis by LC-MS/MS. Samples were resuspended in 92.5/7.5 water/ACN+0.2 % formic acid and analyzed by LC-MS/MS on a nanoAcquity UPLC (Waters) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo). Survey (LC-MS) and tandem mass spectrometry scans (MS/MS) were acquired in the same run. The resolution for the MS and MS/MS scans were 70,000 and 17,500, respectively. Peptide separation was achieved using a Waters nanoAcquity Symmetry UPLC Trap column (180 µm x 20 mm, 5 µm particle size) and a Waters nanoAcquity UPLC BEH300 analytical column (150 µm x 100 mm, 1.7 µm particle size). The mobile phases were (A) 0.2% formic acid in water and (B) 0.2% formic acid in acetonitrile. For each sample approximately 3.6 µg was loaded onto the trap column for 3 min at a flow rate of 10 µL/min. Peptides were separated using a linear gradient (92.5% A to 84% A) for 26 minutes, followed by (84% A to 75% A) for 14 minutes and a wash at 60% B for 2min. The flow rate was 1.8 µL/min. Protein identification was accomplished using data acquired by LC-MS/MS. The

MS/MS spectra were matched to the corresponding peptide sequences found in the UniProt human protein database using Mascot (Matrix Science, version 2.2.06.) software.

Statistical analysis

For the differential expression analysis by mass spectrometry, the intensity values for all detected components were log (base e) transformed with values < 0 replaced by 0. Intensity data was normalized to account for small differences in protein concentration between samples. A subset of the samples was used to create a reference sample against which all samples were then normalized. The normalization factors were chosen so that the median of log ratios between each sample and the reference sample over all the peptides was adjusted to zero. Intensities below Limit of Detection (LOD=100000) after normalization, were then linearly mapped to the range of (LOD/2, LOD) to avoid spurious large fold changes. Intensities above LOD were not changed. A two-way ANOVA model was used for the peptide level analysis and is defined as follows: $I_{ijk}=M+C_i+S_j+\varepsilon_{ijk}$ where I is the peptide intensity, M is the overall average intensity, C the 'clinical group' factor (matched non tumor and tumor), S the 'patient' factor that takes into consideration the 'pairing' nature of the data, and ε random error. FDR (false detection rate) and q-value are calculated, based on the p-values obtained from the ANOVA model, using Storey's method to make multiple testing adjustments. Tukey's HSD method is used to perform post hoc contrast among different groups.

One protein may have several identified and quantified peptides. The following ANOVA model, which is an extension of the two-way ANOVA used above in the peptide level analysis, takes this into consideration by introducing a 'peptide factor' in the model: $I_{ijkl}=M+C_i+S_j+P_k+\varepsilon_{ijkl}$ where I is the protein intensity, M an overall constant, C the 'clinical group', S the 'patient' factor, and P the peptide factor. The number of the levels for P is protein-dependent, equal to the number of identified and quantified peptides for the protein.

For MRM analysis, differential intensity (DI) ratios were calculated in pair wise comparisons for each transition as the median of the ratio of the normalized intensities of each group. Paired Student's t-test was applied for the expression analysis. Protein-level statistics were also computed by linearly combining the transitions of a given protein into a single variable and then applying a t-test. All differential expression analysis and data visualization were done using R.

RESULTS

Technical workflow and overall patient characteristics

This study includes two types of analyses (see technical workflow in **Figure 1**) performed on histologically confirmed Pheo samples from 27 distinct patients. On one side, we have analyzed the secretory activity of single tumor chromaffin cells. To do so, freshly resected Pheo originating from 22 patients were placed in primary culture in order to perform real-time single cell catecholamine secretion measurement using carbon fiber amperometry. On the other side, we have used quantitative mass spectrometry analysis to measure the relative differential expression of proteins involved in the exocytic pathway from 5 other Pheo tissues, which were compared to the matched patient non-tumor adrenal tissue. To conduct this proteomic analysis, two subcellular fractions enriched either in cytosolic or in membranes proteins were isolated from the pairs of matched non-tumor and tumor frozen tissues.

Table 1 summarized the biological and clinical characteristics of the 22 patients included for the amperometric analysis. At diagnosis, a slight predominance of male was found (59%) with a mean age of 50.5 ± 10 years (**Table 1**). Sixteen patients (73%) were diagnosed with hormonal-related symptoms. As presented in **Table 1**, abnormal hormonal secretion was reported in 22 patients (100%), including adrenergic or noradrenergic phenotype in 13 (59%) and 9 (41%) cases, respectively. Patients with an adrenergic or noradrenergic phenotype had respectively a mean level of urinary MN and NMN of 16 ± 17 and 11 ± 7 fold above the ULN. CGA was 3.4 ± 2.6 fold above the ULN for all groups of phenotype. Seven patients (46%) out of 16 tested were diagnosed with a genetic predisposition (4 *NFI*, 1 *RET*, 1 *SDHB* and 1 *SDHD*). The mean tumor size was 4.5 cm (range 1.7-8 cm). Other pathological characteristics are detailed in **Table 1**.

Biological and clinical characteristics of the 5 patients included for the proteomic analysis are detailed in **Table 2**. With a mean age of 58 ± 8 years, all of the patients had hormonal-related symptoms at diagnosis, four of which were classified as adrenergic phenotype and one as noradrenergic phenotype. The mean tumor size was 5.3 cm (range 3-8 cm). None of the patients had germline mutation (out of 3 patients tested). More details on characteristics of each patient can be found in **Supplementary Table**.

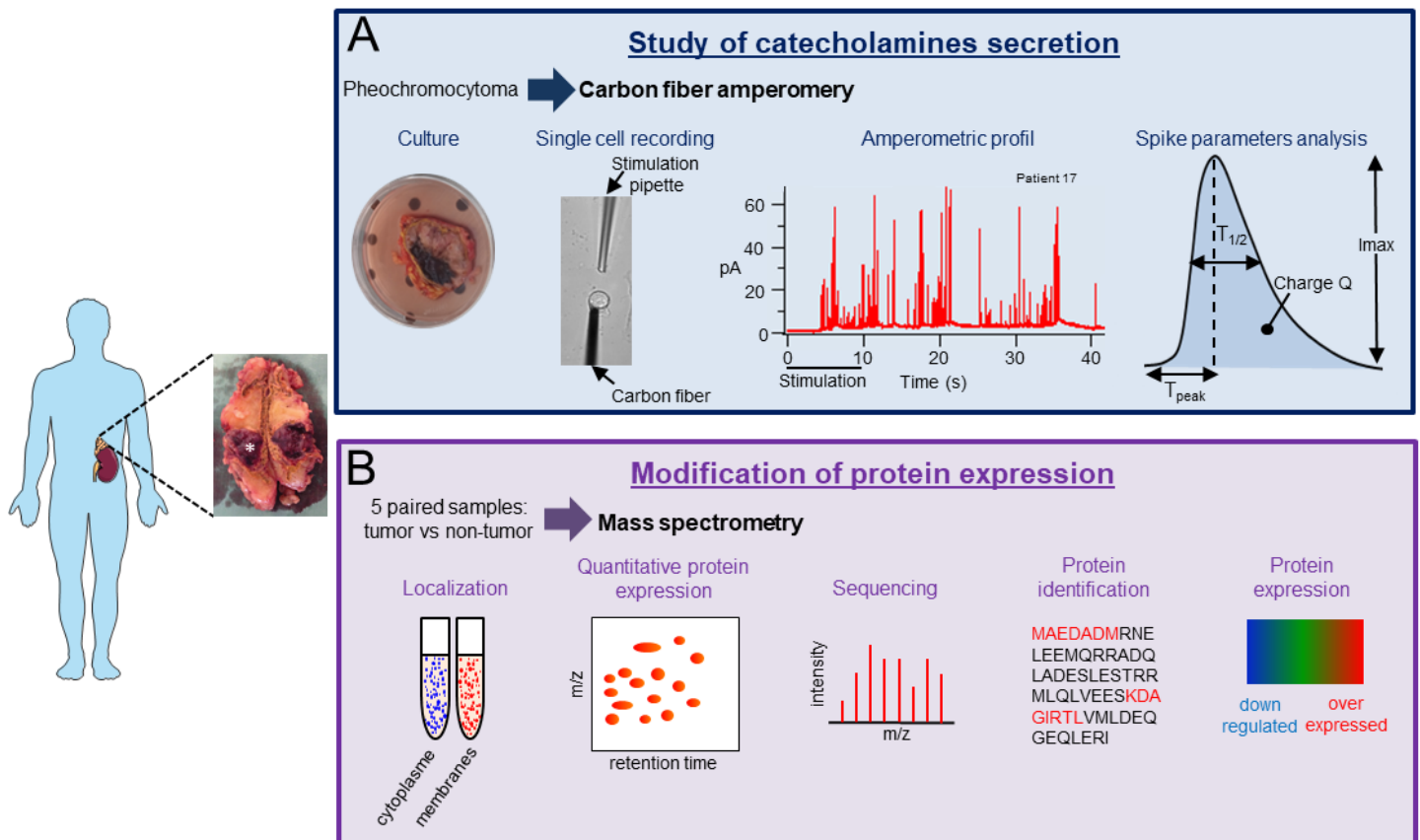


Figure 1: Technical workflow of catecholamine secretion measurement and comparative proteomic analysis of human Pheo. A resected adrenal gland, cut in half, from a patient with Pheo is shown (asterisk). (A) Description of the different steps of the catecholamine secretion measurement by carbon fiber amperometry from the primary cell culture of the tumor to the amperometric spike analysis. A representative amperometric trace of a Pheo cell is illustrated. The dark bar indicates when a 100 μ M nicotine solution was applied. The parameters of individual spike that were analyzed are indicated. (B) Complete protein profiling workflow of differential mass spectrometry analysis between Pheo tissue and matched non-tumor tissue.

Table 1: Biological and clinical characteristics of the 22 patients from which Pheo were used for amperometric analysis.

Characteristics, <i>n</i> available	
Age at diagnosis (mean ± SD, years), <i>n</i> =22	50.5 ± 10
Males (%), <i>n</i> =22	13 (59 %)
Symptoms at diagnosis: <i>n</i> =22	
- Tumoral-related symptoms (%)	4 (18%)
- Hormonal-related symptoms (%)	16 (73%)
Hormonal hypersecretion:	
- Adrenergic/noradrenergic phenotype, <i>n</i> =22	13/9
- Urinary MN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =19	9.3 ± 14
- Urinary NMN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =19	7.7 ± 5.6
- Plasma free MN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =15	4.5 ± 5.0
- Plasma free NMN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =15	6.2 ± 6.1
- CGA, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =12	3.4 ± 2.6
Pathology:	
- Tumor size, cm (mean + range), <i>n</i> =21	4.5 (1.7-8)
- Ki-67, % (mean + range), <i>n</i> =12	2.1 (1-5)
- PASS score (mean + range), <i>n</i> =22	1.9 (0-6)
Genetics: <i>n</i> =16	
- No germline mutation (%)	9 (56.25%)
- <i>NF1</i>	4 (25%)
- <i>RET</i>	1 (6.25%)
- <i>SDHB</i>	1 (6.25%)
- <i>SDHD</i>	1 (6.25%)

MN: metanephrine, NMN: normetanephrine, ULN: upper limit normal, CGA: chromogranin A, PASS: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score, NF1: Neurofibromatosis type 1, RET: Rearranged during transfection, SDHB: Succinate dehydrogenase B, SDHD: Succinate dehydrogenase D.

Table 2: Biological and clinical characteristics of the 5 patients from which Pheo were used for proteomic analysis

Characteristics, <i>n</i> available	
Age at diagnosis (mean ± SD, years), <i>n</i> =5	58 ± 8
Males (%), <i>n</i> =5	2 (40 %)
Symptoms at diagnosis: <i>n</i> =5	
- Tumoral-related symptoms (%)	1 (20%)
- Hormonal-related symptoms (%)	5 (100%)
Hormonal hypersecretion:	
- Adrenergic/noradrenergic phenotype, <i>n</i> =5	4/1
- Urinary MN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =4	3.7 ± 4.2
- Urinary NMN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =4	6.8 ± 8
- Plasma free MN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =2	3.0 ± 2.8
- Plasma free NMN, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =2	3.0 ± 2.8
- CGA, ULN ratio (mean ± SD), <i>n</i> =2	4.7 ± 2.9
Pathology:	
- Tumor size, cm (mean + range), <i>n</i> =5	5.3 (3-8)
- Ki-67, % (mean + range), <i>n</i> =3	3.3 (1-7)
- PASS score (mean + range), <i>n</i> =3	3 (0-9)
Genetics: <i>n</i> =3	
- No germline mutation (%)	3 (100%)

MN: metanephrine, NMN: normetanephrine, ULN: upper limit normal, CGA: chromogranin A, PASS: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score.

Analysis of catecholamine secretion in human pheochromocytoma by carbon fiber amperometry

A representative amperometric trace recorded from tumor chromaffin cell cultured (from patient 17) is illustrated in **Figure 1A**. Each individual spike represents a single granule fusion event and is composed of a rapid rise of the electrode current corresponding to the oxidation of catecholamines quickly released at high concentration through the fusion pore as it dilates, followed by a slower decay representing the subsequent diffusion of molecules from the release site to the electrode surface. In addition to the quantification of number of events per cell, the analysis of individual amperometric spike provides valuable dynamic information on the exocytic process. Hence, the surface area or quantal size (Q) is proportional to the amount of catecholamines released per event, the spike amplitude value (I_{max}) reflects the maximal flux of catecholamines, whereas the half-width ($T_{1/2}$), and the time to peak (T_{peak}) reflect the duration of the exocytotic event and the kinetics of the fusion pore expansion, respectively (**Figure 1A**).

Primary culture of human Pheo cells is rather efficient as every attempt was successful. However, culturing non-tumor chromaffin cells taken outside the tumor zone sample appeared trickier and failed most of the time. Nevertheless, we were able to obtain 4 different cultures of non-tumor human chromaffin cells that could be used for amperometry recording. Therefore, we have compared the distribution of the amperometric parameters of each of the 22 patients individually with the mean values calculated from these 4 non-tumor samples. All the amperometric parameters are detailed **Table 3**. The most important change concerns the total number of spike. Indeed, among the 22 patients, 14 (64%) exhibit a significant increase of the number of spikes up to 3.4 fold suggesting that one of the main causes of tumor-associated catecholamine hypersecretion could be an increase of the number of exocytic events (**Figure 2A** and **Table 3**).

Next, by comparing the spike parameters, we found that the cell cultures from 18 patients (82%) displayed significant differences with the mean spike parameters of non-tumor cells (**Figure 2, bottom**). Among those, essentially 2 types of secretory profiles came out. Firstly, in a limited number of 4 patient's cultured cells (18%) displayed a significant increase of their spike half-width ($T_{1/2}$) leading, for two patients, to a reduce spike amplitude (I_{max} , patients 5 and 7, **Figure 2B** and **Table 3**) and accordingly to a slower release kinetics. Secondly, 14

patients (64%) for which tumor cells presented a significant reduction of the spike half-width $T_{1/2}$ and/or the spike rise time (T_{peak}), often accompanied (9 patients) with a reduction of the quantal size (charge Q; **Figure 2C, D** and **Table 3**). The later type of amperometric profile corresponds to exocytic events occurring with a faster kinetics compared to normal cells. Altogether, our amperometric analysis indicate that catecholamine secretion in tumor chromaffin cells from patients with Pheo often involves a high number and/or fast secretory events which most likely contribute to the tumor-associated hypersecretion.

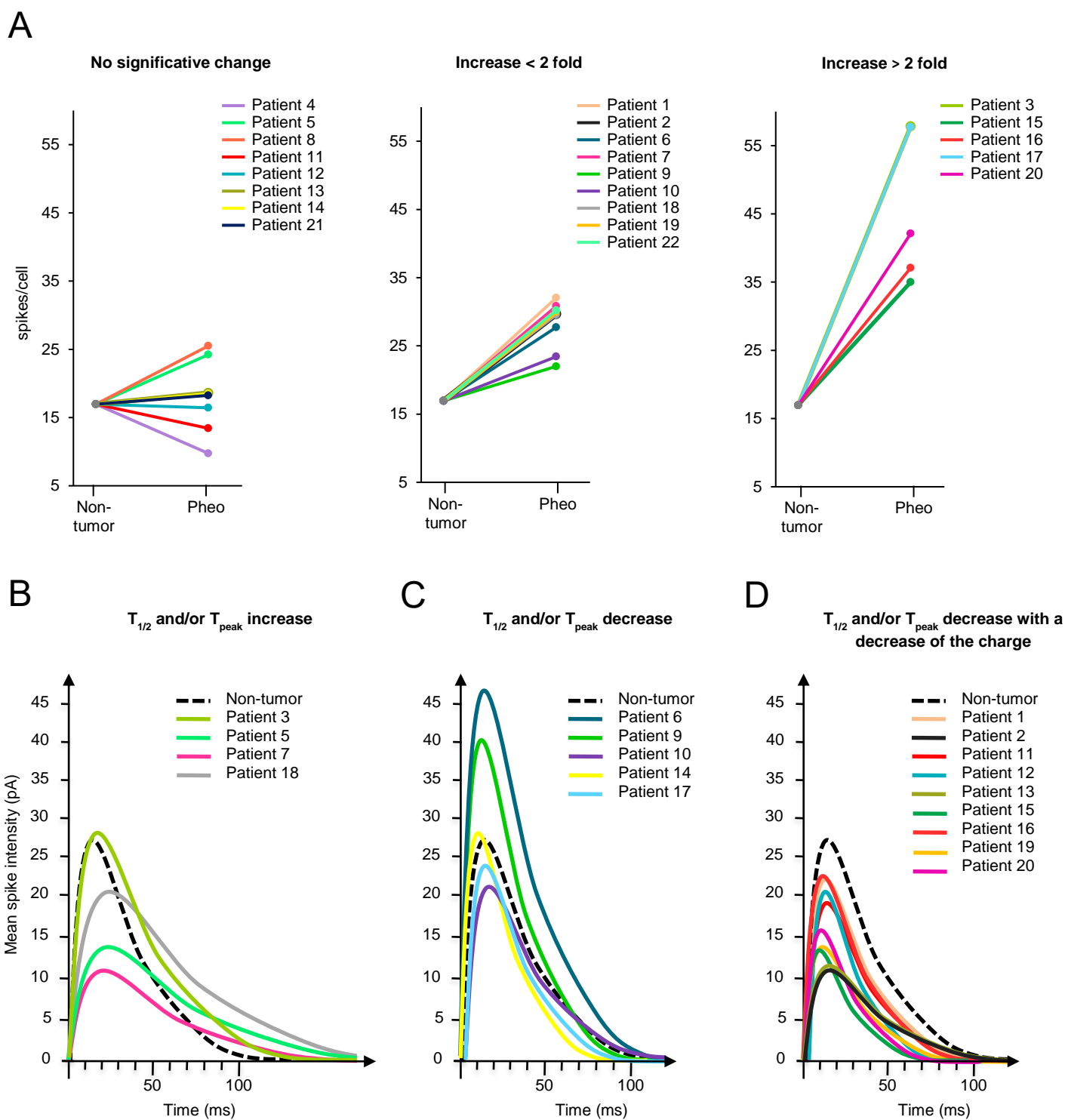


Figure 2: Carbon fiber amperometry analysis of catecholamine secretion in pheo cells from each patient. (A) Representation of the variation of the mean number of total spikes per cell between non-tumor cells and Pheo cells for each patient. Patients are color coded. (B) Superimposition of average spike obtained for cells of each patient. All the average amperometric data are detailed in Table 3.

Table 3: Characteristics of amperometric spikes from 22 Pheos and 4 non-tumor tissues.

Identification	Number of cells	Total number of spikes	Total number of spikes/cell	Number of spikes	Imax (pA)	Charge Q (pC)	T _{1/2} (ms)	T _{peak} (ms)
Non-tumor 1	19	224	11.79 ± 0.67	146	41.56 ± 2.23	2.22 ± 0.13	51.90 ± 1.14	42.21 ± 1.24
Non-tumor 2	11	164	14.91 ± 2.05	126	10.92 ± 0.81	0.92 ± 0.10	68.41 ± 3.41	29.87 ± 1.67
Non-tumor 3	8	144	18.00 ± 3.44	102	18.77 ± 2.35	0.73 ± 0.20	30.76 ± 3.94	13.50 ± 2.07
Non-tumor 4	6	214	35.67 ± 2.17	112	15.51 ± 1.65	0.97 ± 0.12	56.13 ± 4.26	28.50 ± 2.10
Patient 1	19	609	32.05 ± 6.61 **	469	21.34 ± 2.16	0.90 ± 0.10 *	38.97 ± 2.70 ***	16.37 ± 1.41 ***
Patient 2	22	653	29.68 ± 3.26 ***	518	12.45 ± 0.65 ***	0.71 ± 0.04 ***	52.11 ± 1.69	23.69 ± 1.03 ***
Patient 3	24	1388	57.83 ± 8.01 ***	1032	27.85 ± 2.91	1.79 ± 0.16	61.69 ± 2.74 *	29.26 ± 1.42
Patient 4	4	39	9.75 ± 1.70	38	13.08 ± 3.20	0.71 ± 0.26	44.90 ± 8.53	21.05 ± 4.65
Patient 5	14	339	24.21 ± 4.51	252	13.73 ± 0.80 *	1.27 ± 0.10	79.40 ± 5.21 ***	35.94 ± 2.01
Patient 6	18	499	27.72 ± 1.60 ***	320	45.78 ± 2.00 ***	2.33 ± 0.10 ***	48.34 ± 0.76 *	40.43 ± 0.90
Patient 7	17	524	30.82 ± 3.32 ***	408	11.04 ± 0.58 **	0.96 ± 0.07	69.70 ± 3.27 **	30.43 ± 1.43
Patient 8	8	204	25.50 ± 5.30	177	30.81 ± 4.12	1.74 ± 0.28	58.39 ± 6.97	28.00 ± 3.31
Patient 9	31	682	22.00 ± 1.85 *	416	40.28 ± 1.61 ***	1.71 ± 0.08	40.29 ± 1.13 ***	34.45 ± 1.18
Patient 10	59	1382	23.42 ± 2.04 †	1231	21.26 ± 1.28	1.25 ± 0.08	52.81 ± 2.19	26.49 ± 1.06 **
Patient 11	12	161	13.42 ± 1.31	130	17.39 ± 2.35	0.85 ± 0.11 *	42.54 ± 2.76 *	19.00 ± 1.75 ***
Patient 12	21	345	16.43 ± 2.01	292	20.17 ± 2.71	0.81 ± 0.10 **	35.45 ± 1.20 ***	16.75 ± 0.84 ***
Patient 13	23	428	18.61 ± 2.16	353	11.28 ± 0.81 ***	0.68 ± 0.05 ***	52.01 ± 2.47	25.47 ± 1.13 **
Patient 14	4	74	18.50 ± 5.24	59	27.09 ± 5.68	1.01 ± 0.14	35.08 ± 1.80 **	16.11 ± 0.79 **
Patient 15	9	315	35.00 ± 6.88 **	187	13.91 ± 1.93 *	0.49 ± 0.08 ***	30.03 ± 1.99 ***	14.59 ± 1.13 ***
Patient 16	12	482	37.08 ± 5.96 ***	334	21.58 ± 2.30	0.93 ± 0.14 *	37.39 ± 2.83 **	20.30 ± 3.34 **
Patient 17	15	866	57.73 ± 2.76 ***	400	23.72 ± 1.15	1.04 ± 0.06	39.65 ± 0.89 ***	30.66 ± 0.84
Patient 18	9	266	29.56 ± 5.66 *	140	19.18 ± 1.75	1.72 ± 0.24	79.57 ± 6.60 ***	41.97 ± 4.35 *
Patient 19	9	270	30.00 ± 5.31 **	197	13.96 ± 1.03 *	0.55 ± 0.04 ***	35.21 ± 1.19 ***	17.32 ± 0.74 ***
Patient 20	9	379	42.11 ± 5.25 ***	276	15.84 ± 2.19	0.60 ± 0.10 ***	33.53 ± 2.29 ***	16.95 ± 1.58 ***
Patient 21	4	73	18.25 ± 4.23	59	16.29 ± 5.83	0.74 ± 0.19	45.37 ± 2.51	22.65 ± 1.94
Patient 22	5	151	30.20 ± 5.42 *	82	25.13 ± 5.40	1.72 ± 0.30	65.82 ± 6.82	32.50 ± 3.74

Amperometric recordings were performed on primary culture of human pheochromocytoma cells or non-tumor cells. Cells were stimulated with 100 μM of nicotine for 10 s. The number of cells, amperometric spikes per cell, amperometric spikes, and single-event kinetic parameters are indicated. Results represent the mean ± SEM. Bold values are considered significantly different from the control conditions; † p=0.05, **p< 0.05, ***p< 0.001 compared to the mean of non-tumor tissue; non-paired Wilcoxon test.

Differential expression of the exocytic machinery in human pheochromocytoma

The molecular mechanism deregulating catecholamine secretion in human Pheo is currently not known. To get a hint on the pathways dysregulated we performed a quantitative mass spectrometry analysis comparing 5 pairs of human Pheo with their respective matched adjacent non-tumor tissue. To increase detection and sensitivity, we conducted the proteomic analysis on purified subcellular fraction in place of total homogenate. Two main subcellular fractions were isolated from each tissue sample, a membrane-enriched fraction and a fraction enriched in cytosolic proteins (see Materials and Methods section).

In order to focus on the core machinery of secretory granule exocytotic process, we selected from our proteomic data set proteins specifically involved in the significant functional enrichment GO terms regulated exocytosis (#BPGO:0045055) and secretory granule (#CCGO:0030141). In total, we observed 166 proteins significantly up or downregulated in the tumor by comparison with the corresponding non-tumor tissue, with fold change values greater than or equal to 2. 62 were specifically deregulated in the cytosolic fraction, 54 in the membrane-enriched fraction and 50 in both fractions (**Figure 3A**). The volcano plot (**Figure 3B**) shows the relationship between the p-values of a statistical test and the magnitude of the difference in expression values of the samples. The hierarchical clustering of all differentially expressed proteins in row according the paired samples and the corresponding cellular compartment in columns, is presented in **Figure 3C**. This specific data set of proteins corresponding to the proteins involved in the machinery of secretory granule exocytotic process clearly differentiate, by their modulation of expressions, the Pheo samples from the non-tumor samples and each cellular compartment in each tissue type. **Table 4** details the median value of the relative expression changes of the 5 pairs of Pheo samples for all the 166 selected proteins associated with their known function. The functions of the deregulated proteins linked to secretory granule exocytosis include mainly: secretory granule organization and biogenesis, hormone processing, vesicular trafficking, docking, priming, membrane fusion, actin cytoskeleton organization, and small GTPases (**Table 4** and **Figure 4A**). Hence, we observed that numerous secretory granules cargo, as well as different proteins involved in the control of the frequency and the dynamic of the exocytic events are up-regulated. We next wanted to confirm the specific modulation of some of these proteins and focused on various chromogranins (CHGA, CHGB, SCG2, SCG3), enzymes involved in catecholamine synthesis or in hormone processing (DBH, PCSK1, PSCK2, CPE, PAM), different SNAREs or SNAREs interacting proteins (STX1A, SYTL4, STXBP1, SYT1) and Rab GTPases (RAB3A,

RAB27A, RAB27B). To do so, we performed a multiplexed MRM MS assay in total protein homogenates prepared from an independent cohort of 25 pairs of human Pheo and their matched non-tumor tissue (Croise, *et al.* 2016). As MRM is a targeted MS approach that uses synthetic peptide reference standards, it is used to confirm and quantify the presence of proteins of interest on smaller amounts of sample with high sensitivity, which eliminates the need for fractionation (Keshishian, *et al.* 2007). As observed for subcellular fraction, we found that the expression of all these proteins were significantly increased in Pheo compared with the matched adjacent non-tumor adrenal tissue (**Figure 4B**).

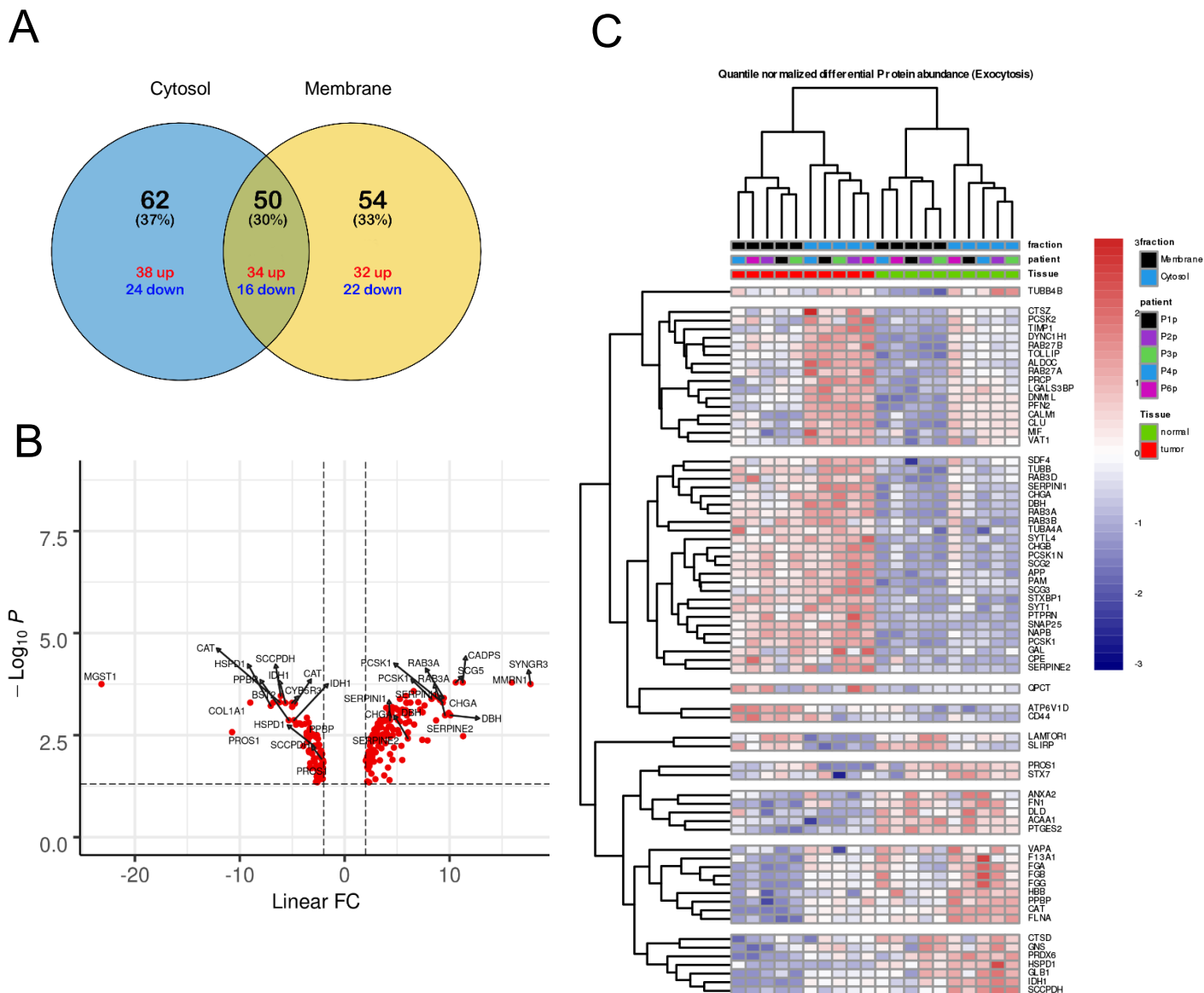


Figure 3: Identification in human Pheo tissue of differentially expressed proteins involved in the exocytotic pathway. (A) Venn diagram showing the distribution of the differentially expressed proteins in fractions enriched in cytosolic and membrane proteins. Colors indicate up- (red) or down- (blue) regulation. (B) Volcano plot of all differentially expressed proteins between Pheo and non-tumor samples. (C) Two-way hierarchical clustering of the patients (P1p, P2p, P3p, P4p, P6p), the corresponding paired samples (non-tumor in green and tumor in red) and the corresponding cellular compartments (membrane in black and cytosol in blue), in column, according to the validated protein of the data set in row. Protein expression values were z-score normalized prior to clustering using the complete-linkage method together with the Euclidean distance using R. Each row represents a differentially expressed protein and each column, a patient according to the tissue type and the cellular compartment. The color scale illustrates the relative level of protein expression: red, highly expressed protein; blue, low expressed protein.

Table 4: List of up- and down-regulated proteins in Pheo by comparison with the adjacent non-tumor tissue.

Gene	Protein	Entry (UniProtKB)	Fraction	Fold change	adj-p value	Function
SYNGR3	Synaptogyrin-3	O43761	Membrane	17.72	0.00018	Neurotransmitter uptake, regulation of dopamine transporter activity
MMRN1	Multimerin-1	Q13201	Cytosol	15.94	0.00016	Protein localized in granules, carrier protein for platelet factor V-Va
SERPINE2	Glia-derived nexin	P07093	Cytosol	11.29	0.00335	Secretory granule organization, granule biogenesis
CADPS	Calcium-dependent secretion activator 1	Q9ULU8	Cytosol	11.25	0.00016	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
SCG5	Neuroendocrine protein 7B2	P05408	Cytosol	10.59	0.00016	Secreted, in granules, peptide hormone processing
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	P09172	Cytosol	10.09	0.00103	Dopamine synthesis pathway
CHGA	Chromogranin-A	P10645	Cytosol	9.92	0.00090	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing
SERPINI1	Neuroserpin	Q99574	Cytosol	9.57	0.00103	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing
RAB3A	Ras-related protein Rab-3A	P20336	Cytosol	9.45	0.00039	Vesicle trafficking, docking
PCSK1	Neuroendocrine convertase 1	P29120	Membrane	9.36	0.00050	Peptide hormone processing
SCG3	Secretogranin-3	Q8WXD2	Cytosol	9.19	0.00040	Secreted, in granules, peptide hormone processing
RAB3A	Ras-related protein Rab-3A	P20336	Membrane	9.09	0.00043	Vesicle trafficking, docking
CHGB	Secretogranin-1	P05060	Cytosol	8.79	0.00036	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing
PCSK1N	ProSAAS	Q9UHG2	Membrane	8.72	0.00137	Peptide hormone processing
SCG2	Secretogranin-2	P13521	Cytosol	8.56	0.00034	Secreted, in granules, peptide hormone processing
PCSK1	Neuroendocrine convertase 1	P29120	Cytosol	8.29	0.00041	Peptide hormone processing
SV2B	Synaptic vesicle glycoprotein 2B	Q7L1I2	Membrane	7.90	0.00427	Binds synaptotagmin1, synaptotagmin trafficking, calcium regulator
RAB3D	Ras-related protein Rab-3D	O95716	Membrane	7.61	0.00059	Vesicle trafficking, docking
PCSK1N	ProSAAS	Q9UHG2	Cytosol	7.44	0.00087	Peptide hormone processing
GAL	Galanin peptides	P22466	Cytosol	7.39	0.00413	Inhibits exocytosis, peptide hormone processing
SCG2	Secretogranin-2	P13521	Membrane	7.19	0.00075	Secreted, in granules, peptide hormone processing
PAM	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	P19021	Membrane	7.02	0.00049	Secretory granule transmembrane protein, fatty acid biosynthetic process
PSAP	Prosaposin	P07602	Cytosol	6.63	0.00174	Lysosomal protein, lipid binding, GM1 binding
SYTL4	Synaptotagmin-like protein 4	Q96C24	Cytosol	6.58	0.00026	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding

NAPB	Beta-soluble NSF attachment protein	Q9H115	Membrane	6.26	0.00050	Recycling, NSF activity, vesicular transport endosome golgi
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25	P60880	Cytosol	6.17	0.00089	SNARE, priming
CPE	Carboxypeptidase E	P16870	Cytosol	6.14	0.00145	Peptide hormone processing
ALDOC	Fructose-bisphosphate aldolase C	P09972	Cytosol	6.05	0.00090	Cytoskeletal binding protein, catalytic activity
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	P01033	Cytosol	6.03	0.00271	Metalloproteinase inhibitor, peptide hormone processing, secreted
CHGA	Chromogranin-A	P10645	Membrane	6.02	0.00381	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing
SYT1	Synaptotagmin-1	P21579	Cytosol	5.93	0.00104	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
PAM	Peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase	P19021	Cytosol	5.91	0.00051	Secretory granule transmembrane protein, fatty acid biosynthetic process
STX1A	Syntaxin-1A	Q16623	Membrane	5.88	0.00050	SNARE, priming
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1	P61764	Cytosol	5.85	0.00034	Priming, fusion, binds SNARE and Munc13
CHGB	Secretogranin-1	P05060	Membrane	5.81	0.00077	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing
ATP6AP2	Renin receptor	O75787	Membrane	5.80	0.00161	Renin receptor, V-ATPase assembly
ATP6V1D	V-type proton ATPase subunit D	Q9Y5K8	Membrane	5.50	0.00075	Vacuolar ATPase activity
CTSZ	Cathepsin-Z	Q9UBR2	Cytosol	5.49	0.01285	Lysosomal protease (unclear role in exocytosis)
PCSK2	Neuroendocrine convertase 2	P16519	Cytosol	5.41	0.00578	Peptide hormone processing
B2M	Beta-2-microglobulin	P61769	Cytosol	5.33	0.00089	Peptide hormone processing, component of the major histocompatibility complex
CADPS2	Calcium-dependent secretion activator 2	Q86UW7	Cytosol	5.27	0.00041	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
PTPRN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	Q16849	Cytosol	5.26	0.00145	Regulates number of DCV, DCV maturation
PRCP	Lysosomal Pro-X carboxypeptidase	P42785	Cytosol	5.17	0.00290	Peptide hormone processing
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	P09172	Membrane	5.08	0.00136	Dopamine synthesis pathway
CPE	Carboxypeptidase E	P16870	Membrane	5.07	0.00239	Peptide hormone processing
SNAP25	Synaptosomal-associated protein 25	P60880	Membrane	5.06	0.00076	SNARE, priming
RAPGEF4	Rap guanine nucleotide exchange factor 4	Q8WZA2	Cytosol	5.03	0.00115	Interacts with RIM2, cAMP dependent-PKA independant exocytosis, GEF of RAP 1-3
NFASC	Neurofascin	O94856	Membrane	4.85	0.00069	Adhesion, spectrin-organisation, plasma membrane localization

ECM1	Extracellular matrix protein 1	Q16610	Cytosol	4.70	0.00639	Platelet degranulation
RAB27A	Ras-related protein Rab-27A	P51159	Cytosol	4.62	0.00231	Interacts with granuphilin to regulate exocytosis, GTPase, docking, priming, DCV maturation, regulates endocytic pathway
CST3	Cystatin-C	P01034	Cytosol	4.58	0.00315	Neutrophil degranulation (unclear role in exocytosis)
SYT2	Synaptotagmin-2	Q8N9I0	Membrane	4.56	0.01268	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
CD44	CD44 antigen	P16070	Membrane	4.55	0.00066	Transmembrane protein, assembles via its cytoplasmic domain a protein complex including RhoA, Rac1, RHO-K and PLC, calcium mobilization, actin reorganization
PREPL	Prolyl endopeptidase-like	Q4J6C6	Cytosol	4.52	0.00075	PMSF regulation, synaptic vesicle exocytosis
SMPD1	Sphingomyelin phosphodiesterase	P17405	Cytosol	4.46	0.00089	Lipid reorganization of the plasma membrane, acid sphingomyelin phosphodiesterase activity
CD63	CD63 antigen	P08962	Membrane	4.41	0.00198	Reorganization of actin cytoskeleton, vesicular transport
RAB11FIP5	Rab11 family-interacting protein 5	Q9BXF6	Cytosol	4.34	0.00340	Protein trafficking from endosomes to plasma membrane, Rab effector, regulates V-ATPase
CARTPT	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript protein	Q16568	Cytosol	4.33	0.00924	Regulates insulin secretion and production, no mechanism known
SERPINI1	Neuroserpin	Q99574	Membrane	4.32	0.00137	Granule biogenesis, secretory granule organization, peptide hormone processing
QPCT	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	Q16769	Membrane	4.27	0.03997	Neutrophil degranulation (unclear role in exocytosis)
STXBP1	Syntaxin-binding protein 1	P61764	Membrane	4.27	0.00113	Priming, fusion, binds SNARE and Munc13
SYTL4	Synaptotagmin-like protein 4	Q96C24	Membrane	4.25	0.00095	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
NAPB	Beta-soluble NSF attachment protein	Q9H115	Cytosol	4.21	0.00194	Recycling, NSF activity, Vesicular transport endosome golgi
ATP8A1	Phospholipid-transporting ATPase IA	Q9Y2Q0	Membrane	4.20	0.00076	Lipid reorganization of the plasma membrane, flippase, P4-ATPase
RAB3B	Ras-related protein Rab-3B	P20337	Cytosol	4.13	0.01969	Vesicle trafficking, GTPase, vesicle biogenesis, priming
SYNGR1	Synaptogyrin-1	O43759	Membrane	4.02	0.00286	Synaptic vesicle protein, inhibits exocytosis
RAB27B	Ras-related protein Rab-27B	O00194	Membrane	4.00	0.00136	GTPase, docking, priming
RAB3B	Ras-related protein Rab-3B	P20337	Membrane	3.97	0.00233	Vesicle trafficking, GTPase, vesicle biogenesis, priming
RAB27B	Ras-related protein Rab-27B	O00194	Cytosol	3.96	0.00067	GTPase, docking, priming
SRP14	Signal recognition particle 14 kDa protein	P37108	Cytosol	3.92	0.00141	Secretory granule lumen (unclear role in exocytosis)

SYT7	Synaptotagmin-7	O43581	Membrane	3.88	0.00500	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
ATP6V0A1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a1	Q93050	Membrane	3.87	0.00135	Vacuolar ATPase activity, vesicle acidification
SCG3	Secretogranin-3	Q8WXD2	Membrane	3.86	0.00331	Secreted, in granules, peptide hormone processing
GAL	Galanin peptides	P22466	Membrane	3.77	0.03071	Inhibits exocytosis, peptide hormone processing
PTPRN	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase-like N	Q16849	Membrane	3.61	0.00305	Regulates number of DCV, DCV maturation
AMPD3	AMP deaminase 3	Q01432	Cytosol	3.59	0.00320	Energy metabolism (unclear role in exocytosis)
RAB4A	Ras-related protein Rab-4A	P20338	Cytosol	3.58	0.00149	Vesicle trafficking, docking, priming
DNM1L	Dynamin-1-like protein	O00429	Membrane	3.55	0.00137	GTPase, endocytosis, fusion
SERPINE2	Glia-derived nexin	P07093	Membrane	3.50	0.00662	Secretory granule organization, granule biogenesis
SYNJ1	Synaptojanin-1	O43426	Cytosol	3.49	0.00399	Regulation of lipid composition of the plasma membrane, endocytosis
TOLLIP	Toll-interacting protein	Q9H0E2	Membrane	3.47	0.00204	Autophagy, ubiquitin dependent process (unclear role in exocytosis)
PTPRN2	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase N2	Q92932	Membrane	3.38	0.00137	Regulates number of DCV, DCV maturation, lipid reorganization
SERPINA5	Plasma serine protease inhibitor	P05154	Cytosol	3.36	0.01310	Secreted
PFN2	Profilin-2	P35080	Cytosol	3.33	0.00163	Actin reorganization, binds PIP2, Inhibits PIP2 hydrolysis
ENPP4	Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase ENPP4	Q9Y6X5	Membrane	3.24	0.00449	Unclear role in exocytosis
ALDOA	Fructose-bisphosphate aldolase A	P04075	Cytosol	3.22	0.00584	Glycogenesis, scaffold protein, secreted
TUBB4B	Tubulin beta-4B chain	P68371	Membrane	3.16	0.00164	Microtubules component, cytoskeletal protein
RAB3D	Ras-related protein Rab-3D	O95716	Cytosol	3.10	0.00301	Vesicle trafficking, docking, priming
DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	Q14204	Membrane	3.09	0.00201	Vesicle transporter, ATPase
TUBB	Tubulin beta chain	P07437	Membrane	3.09	0.00243	Microtubules component, cytoskeletal protein
SYT1	Synaptotagmin-1	P21579	Membrane	3.08	0.00386	Priming, calcium binding, plasma membrane binding, SNARE binding
SCAMP1	Secretory carrier-associated membrane protein 1	O15126	Membrane	3.08	0.00388	Present at docking, priming sites, role in exocytosis
DYNC1L1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	Q9Y6G9	Membrane	3.07	0.00220	Vesicle transporter, ATPase

APP	Amyloid-beta precursor protein	P05067	Cytosol	3.04	0.00251	Interacts with synaptic release machinery, facilitate transmitters release
TOM1	Target of Myb protein 1	O60784	Cytosol	2.98	0.00293	Priming, negatively regulates exocytosis
CD9	CD9 antigen	P21926	Membrane	2.95	0.00831	Cell adhesion, Fusion
RPH3A	Rabphilin-3A	Q9Y2J0	Membrane	2.93	0.03797	Docking, fusion, priming
PPP3CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform	P16298	Cytosol	2.87	0.00228	Protein phosphatase (unclear role in exocytosis)
LYN	Tyrosine-protein kinase Lyn	P07948	Membrane	2.87	0.00386	Tyrosine protein kinase (unclear role in exocytosis)
DYNC1H1	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	Q9Y6G9	Cytosol	2.83	0.00233	Vesicle transporter, ATPase
CALM1	Calmodulin-1	P0DP23	Cytosol	2.82	0.00301	Priming, fusion, vesicle trafficking
VAMP3	Vesicle-associated membrane protein 3	Q15836	Membrane	2.80	0.00332	SNARE, involved in vesicular transport from late endosomes to TGN
SDF4	45 kDa calcium-binding protein	Q9BRK5	Membrane	2.79	0.01404	Involved in exocytosis of zymogens by pancreatic acini
MYO5A	Unconventional myosin-Va	Q9Y4I1	Membrane	2.76	0.00731	Actin motor, vesicle transport, cytoskeleton
TOLLIP	Toll-interacting protein	Q9H0E2	Cytosol	2.75	0.00446	Autophagy, ubiquitin dependent process (unclear role in exocytosis)
SNAPIN	SNARE-associated protein Snapin	O95295	Cytosol	2.72	0.00307	Vesicle trafficking, priming, fusion, interacts with SNAREs
APP	Amyloid-beta precursor protein	P05067	Membrane	2.67	0.00311	Interacts with synaptic release machinery, facilitate transmitters release
GARS	Glycine--tRNA ligase	P41250	Cytosol	2.65	0.00332	Unclear role in exocytosis
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	P68366	Membrane	2.63	0.01056	Microtubules component, cytoskeletal protein
CLU	Clusterin	P10909	Membrane	2.61	0.00736	Secreted
ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	P19652	Cytosol	2.58	0.00440	Lipid reorganization, actin reorganization, endocytosis
SDF4	45 kDa calcium-binding protein	Q9BRK5	Cytosol	2.57	0.00877	Involved in exocytosis of zymogens by pancreatic acini
PCSK2	Neuroendocrine convertase 2	P16519	Membrane	2.55	0.02773	Peptide hormone processing
FAM3C	Protein FAM3C	Q92520	Membrane	2.52	0.01201	Interacts with SNAP23 and RalA (unclear role in exocytosis)
SERPINF2	Alpha-2-antiplasmin	P08697	Cytosol	2.48	0.00378	Secretory granule organization, granule biogenesis
DBNL	Drebrin-like protein	Q9UJU6	Membrane	2.48	0.00462	Binds actin and dynamin-1, actin polymerization, endocytosis
CTSZ	Cathepsin-Z	Q9UBR2	Membrane	2.43	0.01022	Lysosomal protease (unclear role in exocytosis)
DNAJC3	DnaJ homolog subfamily C member 3	Q13217	Membrane	2.41	0.00880	Unclear role in exocytosis
PFN2	Profilin-2	P35080	Membrane	2.41	0.00569	Actin reorganization, binds PIP2, Inhibits PIP2 hydrolysis

VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	Q99536	Cytosol	2.37	0.01795	Vesicle protein, calcium binding (unclear role in exocytosis)
RAB27A	Ras-related protein Rab-27A	P51159	Membrane	2.36	0.01470	Interacts with granuphilin to regulate exocytosis, GTPase, docking, priming, DCV maturation, regulates endocytic pathway
RAB3GAP1	Rab3 GTPase-activating protein catalytic subunit	Q15042	Cytosol	2.36	0.01642	Vesicle trafficking, docking
PFKL	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type	P17858	Cytosol	2.33	0.01501	Unclear role in exocytosis
TIMP1	Metalloproteinase inhibitor 1	P01033	Membrane	2.33	0.04521	Metalloproteinase inhibitor, peptide hormone processing, secreted
SRI	Sorcin	P30626	Cytosol	2.29	0.01565	Calcium binding protein, lipid rafts
SEPT5	Septin-5	Q99719	Cytosol	2.27	0.00802	GTPase, cytoskeleton reorganization
LGALS3BP	Galectin-3-binding protein	Q08380	Cytosol	2.25	0.01028	Unclear role in exocytosis
TUBA4A	Tubulin alpha-4A chain	P68366	Cytosol	2.25	0.02017	Microtubules component, cytoskeletal protein
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	P14174	Cytosol	2.24	0.02151	Cytokine, secreted
TUBB	Tubulin beta chain	P07437	Cytosol	2.21	0.01572	Microtubules component, cytoskeletal protein
ENDOD1	Endonuclease domain-containing 1 protein	O94919	Membrane	2.20	0.01953	Unclear role in exocytosis
PNP	Purine nucleoside phosphorylase	P00491	Cytosol	2.20	0.01009	Unclear role in exocytosis, maybe secreted
ACTR1B	Beta-centractin	P42025	Membrane	2.17	0.01056	Cytoskeletal organization, microtubules
ANO6	Anoctamin-6	Q4KMQ2	Membrane	2.17	0.01947	Phospholipid scrambling, lipid reorganization of the plasma membrane
TRAPPC1	Trafficking protein particle complex subunit 1	Q9Y5R8	Cytosol	2.16	0.04291	Vesicular transport ER to Golgi
AP2A2	AP-2 complex subunit alpha-2	O94973	Membrane	2.10	0.01217	Endocytosis, protein transport
DNM1L	Dynamin-1-like protein	O00429	Cytosol	2.09	0.01299	GTPase, endocytosis, fusion
MAN2B1	Lysosomal alpha-mannosidase	O00754	Cytosol	2.01	0.01332	Unclear role in exocytosis
A2M	Alpha-2-macroglobulin	P01023	Cytosol	-2.03	0.01478	Unclear role in exocytosis
STXBP3	Syntaxin-binding protein 3	O00186	Membrane	-2.06	0.01323	Docking, fusion, priming
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	Cytosol	-2.06	0.01507	Unclear role in exocytosis
DERA	Deoxyribose-phosphate aldolase	Q9Y315	Membrane	-2.07	0.02014	Unclear role in exocytosis

VAPA	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	Q9P0L0	Membrane	-2.08	0.02654	Vesicle trafficking
FGA	Fibrinogen alpha chain	P02671	Cytosol	-2.09	0.03711	Unclear role in exocytosis
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2	Q9H7Z7	Cytosol	-2.14	0.00915	Receptor coupled to G protein Gi, AMPc (unclear role in exocytosis)
VCL	Vinculin	P18206	Cytosol	-2.15	0.01566	Actin filament binding protein, cytoskeletal reorganization
THBS1	Thrombospondin-1	P07996	Cytosol	-2.16	0.02546	Secreted
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q8NBX0	Membrane	-2.21	0.01198	Unclear role in exocytosis
ANXA2	Annexin A2	P07355	Membrane	-2.23	0.02400	Calcium binding protein, lipid binding, cytoskeletal reorganization, lipid microdomains
FCER1G	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma	P30273	Membrane	-2.23	0.00763	Unclear role in exocytosis
FGA	Fibrinogen alpha chain	P02671	Membrane	-2.26	0.02179	Unclear role in exocytosis
PRDX6	Peroxiredoxin-6	P30041	Cytosol	-2.28	0.00786	Phospholipase, phospholipids reorganization, secreted
PLEK	Pleckstrin	P08567	Cytosol	-2.29	0.03768	PKC target, phosphoinositide binding, lipid binding
HBB	Hemoglobin subunit beta	P68871	Membrane	-2.34	0.01042	Unclear role in exocytosis
S100A9	Protein S100-A9	P06702	Cytosol	-2.35	0.00924	Calcium and zinc binding, degranulation neutrophil by MAPK dependent mechanism, modulation microtubule cytoskeleton, secreted
PROS1	Vitamin K-dependent protein S	P07225	Membrane	-2.36	0.03700	Calcium binding (unclear role in exocytosis)
SLIRP	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	Q9GZT3	Cytosol	-2.37	0.02528	Unclear role in exocytosis
PRDX6	Peroxiredoxin-6	P30041	Membrane	-2.37	0.00880	Phospholipase, phospholipids reorganization, secreted
LGALS3	Galectin-3	P17931	Cytosol	-2.40	0.01781	Unclear role in exocytosis
NIT2	Omega-amidase NIT2	Q9NQR4	Cytosol	-2.43	0.00548	Secreted (unclear role in exocytosis)
ELANE	Neutrophil elastase	P08246	Membrane	-2.43	0.02242	Secreted (unclear role in exocytosis)
CYBA	Cytochrome b-245 light chain	P13498	Membrane	-2.48	0.02766	Unclear role in exocytosis
STOM	Stomatin	P27105	Membrane	-2.52	0.00533	Lipid raft component, scaffold protein
RNPEP	Aminopeptidase B	Q9H4A4	Cytosol	-2.54	0.00389	Peptidase (unclear role in exocytosis)
GLA	Alpha-galactosidase A	P06280	Cytosol	-2.59	0.03945	Glycosphingolipid hydrolysis, lipid reorganization, lipid degradation in lysosome, glycoprotein

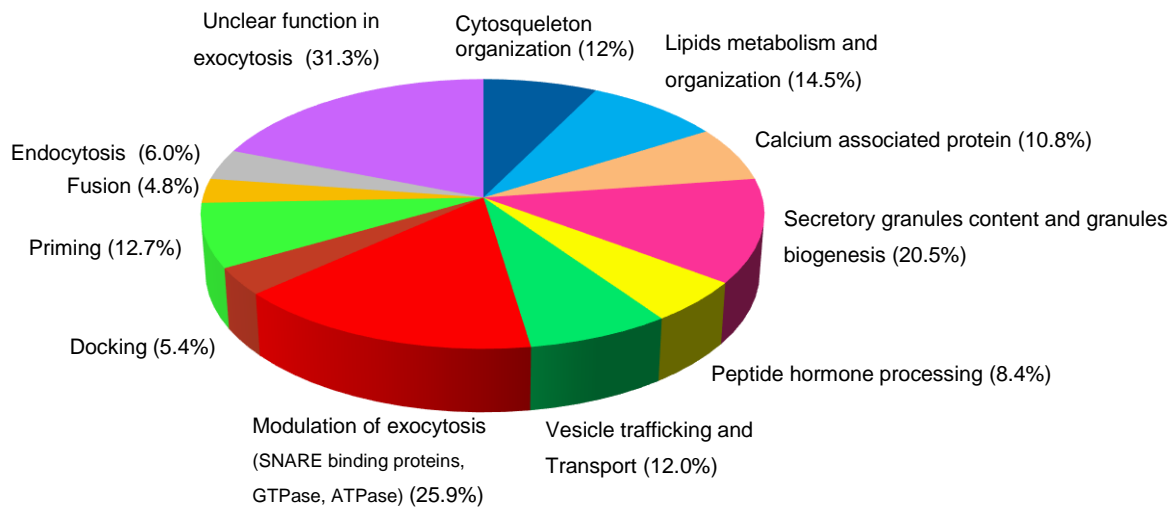
S100A13	Protein S100-A13	Q99584	Membrane	-2.60	0.04494	Calcium binding, binds phosphatidylserine, lipid binding, secreted, regulate FGF-1 secretion
PGM1	Phosphoglucomutase-1	P36871	Cytosol	-2.64	0.00315	Glucose synthesis and catalysis pathway, secreted
LAMTOR1	Ragulator complex protein LAMTOR1	Q6IAA8	Cytosol	-2.65	0.00603	mTor pathway, activated by amino-acids, anchoring regulator complex to membranes, may play a role in RhoA activation, lysosomal exocytosis
GNS	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	P15586	Membrane	-2.67	0.03261	Calcium binding (unclear role in exocytosis)
FGG	Fibrinogen gamma chain	P02679	Cytosol	-2.69	0.01811	Unclear role in exocytosis
FGB	Fibrinogen beta chain	P02675	Cytosol	-2.72	0.02085	Unclear role in exocytosis
CTSA	Lysosomal protective protein	P10619	Cytosol	-2.73	0.04395	Lysosomal protease (unclear role in exocytosis)
HBB	Hemoglobin subunit beta	P68871	Cytosol	-2.76	0.00349	Unclear role in exocytosis
METTL7A	Methyltransferase-like protein 7A	Q9H8H3	Membrane	-2.82	0.01175	Unclear role in exocytosis
APOOL	MICOS complex subunit MIC27	Q6UXV4	Membrane	-2.85	0.01445	Mitochondrial inner membrane (unclear role in exocytosis)
DLD	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	P09622	Cytosol	-2.87	0.00574	Unclear role in exocytosis
FGB	Fibrinogen beta chain	P02675	Membrane	-2.93	0.01206	Unclear role in exocytosis
HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	Membrane	-2.93	0.00580	Protein folding, acrosomal exocytosis
ACAA1	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	Membrane	-2.99	0.00305	Lipid metabolism, fatty acid metabolism, insulin secretion
STX7	Syntaxin-7	O15400	Cytosol	-3.10	0.00905	Protein trafficking from plasma membrane to endosomes, homotypic fusion of endocytic organelles, endocytosis, SNARE, SNARE binding,
ITGA2B	Integrin alpha-IIb	P08514	Membrane	-3.17	0.00290	Platelet degranulation
CTSD	Cathepsin-D	P07339	Membrane	-3.17	0.02030	Lysosomal protease (unclear role in exocytosis)
COMMD3	COMM domain-containing protein 3	Q9UBI1	Cytosol	-3.19	0.00751	Phosphoinositides regulation, lipids
F13A1	Coagulation factor XIII A chain	P00488	Cytosol	-3.29	0.01539	Calcium binding, coagulation factor (unclear role in exocytosis)
PPBP	Platelet basic protein	P02775	Cytosol	-3.31	0.00348	Stimulates formation and secretion of plasminogen activator, secreted
GLB1	Beta-galactosidase	P16278	Membrane	-3.32	0.01990	Lipid organisation and metabolism
PTGES2	Prostaglandin E synthase 2	Q9H7Z7	Membrane	-3.33	0.00219	Receptor coupled to G protein Gi, AMPc (unclear role in exocytosis)
ANXA11	Annexin A11	P50995	Membrane	-3.35	0.00743	Vesicular trafficking ER to golgi, calcium binding, lipid binding
SYPL1	Synaptophysin-like protein 1	Q16563	Membrane	-3.36	0.00318	Syntaxin1 binding, SNARE binding, VAMP2 binding, endocytosis
CYBB	Cytochrome b-245 heavy chain	P04839	Membrane	-3.40	0.00825	Regulation of cellular pH, ROS (unclear role in exocytosis)

GLB1	Beta-galactosidase	P16278	Cytosol	-3.42	0.00759	Lipid organisation and metabolism
FN1	Fibronectin	P02751	Membrane	-3.42	0.00157	Cell adhesion, cell motility, opsonization, wound healing, maintenance of cell shape, extracellular matrix glycoprotein (unclear role in exocytosis)
FGG	Fibrinogen gamma chain	P02679	Membrane	-3.50	0.00445	Unclear role in exocytosis
SNCA	Alpha-synuclein	P37840	Cytosol	-3.54	0.00338	Synaptic vesicle trafficking, priming, fusion, dilation of fusion pores, calcium regulation, SNAREs assembly
FLNA	Filamin-A	P21333	Cytosol	-3.60	0.00118	Actin filament branching, cytoskeletal regulation, scaffold protein, exocyst
CTSH	Pro-cathepsin H	P09668	Cytosol	-3.62	0.00312	Lysosomal protease (unclear role in exocytosis)
CREG1	Protein CREG1	O75629	Cytosol	-3.63	0.00275	Control of cell growth and differentiation, secreted
F13A1	Coagulation factor XIII A chain	P00488	Membrane	-3.79	0.00168	Calcium binding, coagulation factor (unclear role in exocytosis)
ACAA1	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	P09110	Cytosol	-3.94	0.00584	Lipid metabolism, fatty acid metabolism, insulin secretion
FLNA	Filamin-A	P21333	Membrane	-4.09	0.00175	Actin filament branching, cytoskeletal regulation, scaffold protein, exocyst
DGAT1	Diacylglycerol O-acyltransferase 1	O75907	Membrane	-4.26	0.00164	Triacylglycerol synthesis, DAG pathway, lipid organization
IQGAP2	Ras GTPase-activating-like protein IQGAP2	Q13576	Cytosol	-4.37	0.00163	Binds to activated Cdc42 and Rac1, associate with calmodulin, cytoskeleton regulation, exocyst complex, endocytosis
CD109	CD109 antigen	Q6YHK3	Cytosol	-4.64	0.00175	Modulates negatively TGFB1 signaling in keratinocytes (unclear role in exocytosis)
CAT	Catalase	P04040	Cytosol	-4.74	0.00053	Antioxidant enzyme (unclear role in exocytosis)
IDH1	Isocitrate dehydrogenase	O75874	Membrane	-4.82	0.00136	Catalytic activity, phospholipid biosynthetic and catalytic process, insulin secretion
FERMT3	Fermitin family homolog 3	Q86UX7	Cytosol	-5.00	0.00064	Cell adhesion (unclear role in exocytosis)
CYB5R3	NADH-cytochrome b5 reductase 3	P00387	Cytosol	-5.02	0.00051	Lipid organisation, cholesterol biosynthesis (unclear role in exocytosis)
PPBP	Platelet basic protein	P02775	Membrane	-5.33	0.00136	Stimulates formation and secretion of plasminogen activator, secreted
IDH1	Isocitrate dehydrogenase	O75874	Cytosol	-5.64	0.00051	Catalytic activity, phospholipid biosynthetic and catalytic process, insulin secretion
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase-like oxidoreductase	Q8NBX0	Cytosol	-6.09	0.00034	Unclear role in exocytosis
CAT	Catalase	P04040	Membrane	-6.20	0.00049	Antioxidant enzyme (unclear role in exocytosis)
BST2	Bone marrow stromal antigen 2	Q10589	Membrane	-6.81	0.00050	Actin cytoskeleton organization

HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	P10809	Cytosol	-7.05	0.00060	Protein folding, acrosomal exocytosis
COL1A1	Collagen alpha-1(I) chain	P02452	Membrane	-9.00	0.00050	Extracellular matrix (unclear role in exocytosis)
PROS1	Vitamin K-dependent protein S	P07225	Cytosol	-10.73	0.00266	Calcium binding (unclear role in exocytosis)
MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1	P10620	Membrane	-23.19	0.00018	Unclear role in exocytosis

List of proteins involved in exocytosis detected by mass spectrometry in cytosol- and membrane-enriched fractions. The mean fold change is obtained by comparing the expression from 5 pairs of tumor matched to non-tumor tissues. DAG: diacylglycerol, DCV: dense-core vesicle, ER: endoplasmic reticulum, FGF-1: fibroblast growth factor 1, GM1: monosialotetrahexosylganglioside, MAPK: mitogen-activated protein kinase, NSF: N-ethylmaleimide-Sensitive Factor, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C, SNARE: soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor, ROS: reactive oxygen species, TGFB1: transforming growth factor beta 1, TGN: trans-Golgi network.

A



B

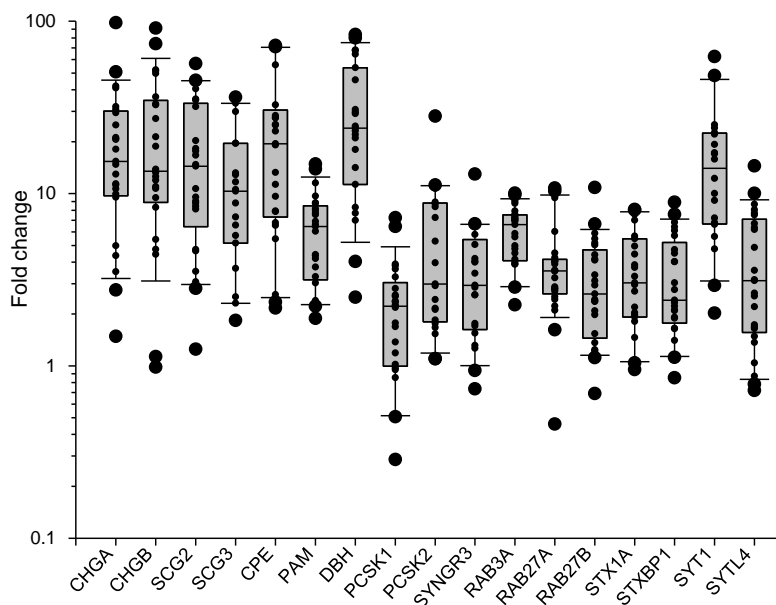


Figure 4: Functional enrichment of exocytic proteins and global variation confirmation of few selected proteins. (A) Functional enrichment analysis of identified proteins. Each differentially expressed protein selected for their potential role in calcium-regulated exocytosis (Table 4) has been classified in one or several indicated biological functions. (B) Expression variation of the indicated proteins was quantified at the protein level by MRM-MS in 25 pairs of human Pheo normalized to their matched adjacent non-tumor tissue.

DISCUSSION

Dysfunction of the hormones and neuropeptides secretion in NETs is a serious health issue. Patients with midgut primary carcinoids have increased serotonin and metabolite secretion, corresponding to higher metastatic tumor burdens (Onaitis, *et al.* 2000). Hypothalamic tumors, including gliomas and gangliocytomas produce excessive “growth hormone releasing hormone” with subsequent growth hormone hypersecretion and resultant acromegaly (Doga, *et al.* 2001). The rising levels of local histamine secretion in melanoma accelerate tumor growth and increase the metastatic colony-forming potential (Pos, *et al.* 2005). Excessive level of circulating catecholamines in patient with Pheo can trigger life-threatening medical problems such as cardiopathy and stroke (Y-Hassan and Falhammar 2020; Zhang, *et al.* 2017). Moreover, enhanced secretory activity of NET cells may develop over time with negative impact on prognosis. For example, silent pituitary adenoma can evolve into an active secreting adenoma whereas non-functional pancreatic tumors can become hormonally active, hence turning to a more aggressive tumor phenotype (Brown, *et al.* 2006; Daems, *et al.* 2009; Juhlin, *et al.* 2019). Small cell lung cancer (SCLC) is a high-grade malignant cancer because of the progressive neuroendocrine nature of SCLC cells that secrete a variety of neuropeptides together with growth factors that all dramatically accelerate the invasive growth by their autocrine action (Cuttitta, *et al.* 1985; Song, *et al.* 2003). These few examples taken from a longer list clearly revealed that dysfunction of the secretory pathways in NETs can lead to severe clinical complications and can also impact the tumor development and prognosis. Today, a clear unmet need is to identify the cellular and molecular mechanisms triggering hypersecretory activity in NETs.

The aim of the present study was to uncover part of the mechanisms triggering catecholamines hypersecretion in human Pheo cells. To do so, we have used carbon fiber amperometry recording to analyze catecholamine secretion on individual tumor chromaffin cells cultured directly from freshly resected human Pheo. In parallel, we have analyzed the expression level of various proteins involved in calcium-regulated exocytosis by quantitative and differential mass spectrometry methods applied on human Pheo tissue.

At the cellular level, several hypotheses which may not be mutually exclusive can be put forward to try to explain the hypersecretory phenotype of Pheo: i) a leakage of

catecholamines through the constitutive secretory pathway, ii) a global increase in the quantity of catecholamines in the secretory granules, iii) a simple mass effect, as the number of cells increases within the tumor and iv) a dysfunction of the calcium-regulated secretory pathway. Interestingly, our amperometric analysis has allowed us to identify the cause of this phenomenon. First, leakage of catecholamines in resting tumor chromaffin does probably not occur as we never observed any spontaneous amperometric spike prior cell stimulation (data not shown). Second, an increase of catecholamines in the secretory granules is very unlikely since in most cases, quantal size of the spikes was very unfrequently increased. Third, we showed that the number of exocytic events is significantly increased in single tumor chromaffin cells compared to a non-tumor cell indicating that the cell proliferation within the tumor cannot be responsible alone for the hypersecretion phenotype. Moreover, by analyzing the spike kinetics, we have also observed that, for many patients, exocytic events tend to be faster. Altogether, our data clearly demonstrated that the regulation of the calcium-regulated exocytosis process is highly perturbed in tumor cells. To our knowledge, this is the first report analysing the catecholamine secretion using carbon fiber amperometry recording directly performed on human tumor chromaffin cells.

Which specific step of the exocytic pathway and which proteins might be involved in this amplified secretory activity remain to be explored. A significant increase in spikes frequency can be consistent with an enhancement of the different steps upstream of the fusion process including recruitment, docking and priming or with a greater calcium sensitivity of the exocytosis machinery. A faster kinetics of the exocytotic events might also reflect a direct effect on the fusion process. Through the differential mass spectrometry analysis, we have identified several proteins involved in the regulation of these various step of exocytosis, that are significantly over-expressed in the tumor tissue compared to the non-tumor one. Among them, some are known to impact the amperometric spike frequency and/or the kinetic of the spike when their expression changes in chromaffin cells. This is the case for example of SNAREs proteins (SNAP25, Syntaxin1) as well as proteins regulating the SNARE complex (Synaptotagmin-1 and -7) or the actin cytoskeleton organization (Rab27A or Annexin-A2) (Desnos, *et al.* 2003; Fang, *et al.* 2008; Gabel, *et al.* 2015; Tawfik, *et al.* 2021). Intriguingly among the core exocytotic machinery the calcium sensor Syt1 was found to be the most overexpressed in tumor cells (**Figure 4B**), which could lead to an increase in calcium sensitivity and probability of release. It must be mentioned that at

this stage, we cannot rule out an increase of number of secretory granules in chromaffin tumor cells as various specific soluble cargos of the secretory granules, like different chromogranins or enzymes involved in hormone processing, were also found to be overexpressed. These observations are in line with previous reports indicating that chromogranins or chromogranin-derived peptides are highly expressed in Pheo (Guerin, *et al.* 2010).

To conclude, we have reported here that calcium regulated exocytosis is deregulated in human Pheo chromaffin cells and we have described tumor-associated expression changes of various key players of the exocytic pathway. The next challenge will be to understand how exactly these changes are associated with the hypersecretion of tumor.

Ethics approval and consent to participate

The present study used the data and the human biological material of the biological collection “Approche moléculaire des tumeurs corticosurréaliennes” which was agreed by the “Comité de Protection des Personnes Est III” ethical advisory committee, and was conducted according to currently accepted ethical guidelines, including informed written consent approval signed by all patients prior to inclusion.

Funding and acknowledgements

This work was financially supported by ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences & Health) within the framework of the Cancer Plan to SG and LB (Single Cell 2018 N° 19CS004-00); by the University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) for a Fellowship, within the French national programme “Investment for the future” (IdEx-Unistra) to SG; by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (“SecretoNET”, N° ANR-16-CE17-0022-01) and from the Ligue contre le Cancer (CCIR Grand-Est) to SG; by a fellowship from la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; FDM201806005916) to SM. INSERM is providing salary to SG and NV.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

REFERENCES

- Anantharam A & Kreutzberger AJB 2019 Unraveling the mechanisms of calcium-dependent secretion. *J Gen Physiol* 151 417-434.
- Bader MF, Holz RW, Kumakura K & Vitale N 2002 Exocytosis: the chromaffin cell as a model system. *Ann N Y Acad Sci* 971 178-183.
- Brown RL, Muzzafar T, Wollman R & Weiss RE 2006 A pituitary carcinoma secreting TSH and prolactin: a non-secreting adenoma gone awry. *Eur J Endocrinol* 154 639-643.
- Burgoyne RD & Morgan A 2003 Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83 581-632.
- Croise P, Houy S, Gand M, Lanoix J, Calco V, Toth P, Brunaud L, Lomazzi S, Paramithiotis E, Chelsky D, et al. 2016 Cdc42 and Rac1 activity is reduced in human pheochromocytoma and correlates with FARP1 and ARHGEF1 expression. *Endocr Relat Cancer* 23 281-293.
- 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.
- Daems T, Verhelst J, Michotte A, Abrams P, De Ridder D & Abs R 2009 Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas. *Pituitary* 12 80-86.
- Desnos C, Schonn JS, Huet S, Tran VS, El-Amraoui A, Raposo G, Fanget I, Chapuis C, Menasche G, de Saint Basile G, et al. 2003 Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* 163 559-570.
- Doga M, Bonadonna S, Burattin A & Giustina A 2001 Ectopic secretion of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in neuroendocrine tumors: relevant clinical aspects. *Ann Oncol* 12 Suppl 2 S89-94.
- Eisenhofer G, Lenders JW, Goldstein DS, Mannelli M, Csako G, Walther MM, Brouwers FM & Pacak K 2005 Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines. *Clin Chem* 51 735-744.
- Fang Q, Berberian K, Gong LW, Hafez I, Sorensen JB & Lindau M 2008 The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 15388-15392.
- Fathali H & Cans AS 2018 Amperometry methods for monitoring vesicular quantal size and regulation of exocytosis release. *Pflugers Arch* 470 125-134.
- Gabel M, Delavoie F, Demais V, Royer C, Bailly Y, Vitale N, Bader MF & Chasserot-Golaz S 2015 Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 210 785-800.
- Gasman S & Vitale N 2017 Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biol Cell* 109 381-390.
- Guerin M, Guillemot J, Thouennon E, Pierre A, El-Yamani FZ, Montero-Hadjadje M, Dubessy C, Magoul R, Lihmann I, Anouar Y, et al. 2010 Granins and their derived peptides in normal and tumoral chromaffin tissue: Implications for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma. *Regul Pept* 165 21-29.
- Houy S, Estay-Ahumada C, Croise P, Calco V, Haeberle AM, Bailly Y, Billuart P, Vitale N, Bader MF, Ory S, et al. 2015 Oligophrenin-1 Connects Exocytotic Fusion to Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *J Neurosci* 35 11045-11055.
- Juhlin CC, Skoglund S, Juntti-Berggren L, Karlberg M & Calissendorff J 2019 Non-functioning neuroendocrine pancreatic tumors transforming to malignant insulinomas - four cases and review of the literature. *Neuro Endocrinol Lett* 40 175-183.
- Keshishian H, Addona T, Burgess M, Kuhn E & Carr SA 2007 Quantitative, multiplexed assays for low abundance proteins in plasma by targeted mass spectrometry and stable isotope dilution. *Mol Cell Proteomics* 6 2212-2229.

- Lang T & Jahn R 2008 Core proteins of the secretory machinery. *Handb Exp Pharmacol* 107-127.
- Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo AP, Grebe SK, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF, Jr. & Endocrine S 2014 Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 99 1915-1942.
- Lenders JWM, Kerstens MN, Amar L, Prejbisz A, Robledo M, Taieb D, Pacak K, Crona J, Zelinka T, Mannelli M, et al. 2020 Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 38 1443-1456.
- Malacombe M, Bader MF & Gasman S 2006 Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763 1175-1183.
- Moog S, Houy S, Chevalier E, Ory S, Weryha G, Rame M, Klein M, Brunaud L, Gasman S & Cuny T 2018 18F-FDOPA PET/CT Uptake Parameters Correlate with Catecholamine Secretion in Human Pheochromocytomas. *Neuroendocrinology* 107 228-236.
- Mosharov EV & Sulzer D 2005 Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2 651-658.
- 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.
- Pappachan JM, Tun NN, Arunagirinathan G, Sodi R & Hanna FWF 2018 Pheochromocytomas and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 20 3.
- Pos Z, Safrany G, Muller K, Toth S, Falus A & Hegyesi H 2005 Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers. *Cancer Res* 65 4458-4466.
- Pourian M, Mostafazadeh DB & Soltani A 2015 Does this patient have pheochromocytoma? A systematic review of clinical signs and symptoms. *J Diabetes Metab Disord* 15 11.
- Segura F, Brioso MA, Gomez JF, Machado JD & Borges R 2000 Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J Neurosci Methods* 103 151-156.
- Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP & Spindel ER 2003 Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63 214-221.
- Tanguy E, Coste de Bagneaux P, Kassas N, Ammar MR, Wang Q, Haeberle AM, Raheindratsara J, Fouillen L, Renard PY, Montero-Hadjadje M, et al. 2020 Mono- and Poly-unsaturated Phosphatidic Acid Regulate Distinct Steps of Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. *Cell Rep* 32 108026.
- Tawfik B, Martins JS, Houy S, Imig C, Pinheiro PS, Wojcik SM, Brose N, Cooper BH & Sorensen JB 2021 Synaptotagmin-7 places dense-core vesicles at the cell membrane to promote Munc13-2- and Ca(2+)-dependent priming. *Elife* 10.
- Thompson LD 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.
- Y-Hassan S & Falhammar H 2020 Cardiovascular Manifestations and Complications of Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Med* 9.
- Zandee WT, Kamp K, van Adrichem RC, Feelders RA & de Herder WW 2017 Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis. *Endocr Relat Cancer* 24 R261-R274.
- Zhang R, Gupta D & Albert SG 2017 Pheochromocytoma as a reversible cause of cardiomyopathy: Analysis and review of the literature. *Int J Cardiol* 249 319-323.

Supplementary Table: Clinical, biochemical, and functional characteristics of the 27 patients with Pheo evaluated in this study.

#	Age	Gender	Symptom	Hormonal hypersecretion phenotype	Urinary MN (ULN ratio)	Urinary NMN (ULN ratio)	Plasma free MN (ULN ratio)	Plasma free NMN (ULN ratio)	Plasma CGA (ULN ratio)	Size (cm)	Ki-67 (%)	PASS score	Genetics
1	46	M	No	AD	8.1	1.2	-	-	4.9	3.7	-	3	Spor
2	54	F	No	AD	2.1	0.9	6.0	2.0	0.5	2	1	0	NF1
3	50	M	Yes	AD	2.8	13.5	3.1	2.0	1.5	3.5	-	1	NF1
4	34	M	Yes	NAD	0.6	7.1	1.0	3.0	4.8	1.7	4	1	SDHD
5	75	F	No	AD	14.1	4.7	-	-	4.6	8.0	-	3	Spor
6	61	M	Yes	NAD	1.5	2.0	2.0	10.0	-	2.5	-	3	Spor
7	64	M	No	AD	6.5	5.5	5.3	5.0	-	4.2	1	4	Spor
8	43	F	Yes	NAD	0.4	16	1.0	26.0	3.6	5.0	-	4	Spor
9	30	M	No	NAD	0.3	6.6	0.1	4.4	3.1	5.5	3	1	SDHB
10	47	M	Yes	NAD	1.0	8.7	-	-	-	4	-	2	-
11	47	F	Yes	AD	38.6	3.7	3.4	2.0	-	6.5	1	6	NF1
12	58	M	Yes	AD	1.9	4.6	-	-	0.9	4.4	5	0	-
13	36	F	Yes	AD	6.6	7.9	10.3	10	3.4	5.0	2	2	-
14	50	M	Yes	AD	18.0	5.2	-	-	-	7.0	1	2	Spor
15	42	M	Yes	NAD	2.0	13.0	0.1	5.6	1.5	4.0	-	0	-
16	47	F	Yes	NAD	4.6	23.4	-	-	1.2	7.0	1	0	Spor
17	58	F	Yes	AD	-	-	1.9	2.5	-	-	-	1	NF1
18	62	M	Yes	AD	54.1	9.6	-	-	-	4.5	-	0	-
19	46	M	Yes	NAD	0.9	12.5	0.8	8.3	10	5.0	-	3	RET
20	58	F	Yes	AD	2.8	10.3	4.4	7.4	-	3.5	1	4	-
21	53	F	No	AD	-	-	2.6	1.3	-	2.5	4	4	Spor
22	45	M	Yes	AD	-	-	19.9	2.2	-	4.9	1	1	Spor
1P	62	F	Yes	NAD	1.5	18.6	1.0	1.0	-	5	-	-	Spor
2P	48	F	Yes	AD	10	5	-	-	-	3.5	-	-	-
3P	58	M	Yes	AD	1.3	1.5	5.0	5.0	2.6	8.0	1	0	Spor
4P	52	F	Yes	AD					6.3	5.0	7	9	Spor
6P	69	M	Yes	AD	2.0	2.0	-	-	-	3.0	2	0	-

Age at diagnosis, gender (F: female, M: male), hormonal hypersecretion symptoms and phenotype, biochemical and functional values are represented for each patient number (#). AD: adrenergic, NAD: noradrenergic, MN: metanephrine, NMN: normetanephrine, ULN: upper limit normal, CGA: chromogranin A, PASS: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score, Spor: sporadic, NF1: Neurofibromatosis type 1, RET: Rearranged during transfection, SDHB: Succinate dehydrogenase B, SDHD: Succinate dehydrogenase D, - : not available.

2. Publication n°2 : Effet des analogues de la somatostatine sur la sécrétion de catécholamines par les cellules de phéochromocytomes humains

2.1. Objectifs et déroulement de l'étude

Aujourd'hui il n'existe aucune thérapie ciblée permettant de bloquer directement cette hypersécrétion dans le phéochromocytome. Par leurs effets inhibiteurs connus sur les voies de sécrétion et leurs applications cliniques sur plusieurs tumeurs neuroendocrines, l'octréotide et le pasiréotide (SOM230), deux analogues de la somatostatine apparaissent comme des candidats de choix pour tenter d'inhiber la sécrétion incontrôlée du phéochromocytome. En effet, l'effet anti-sécrétoire de ces molécules a été démontré par différentes études cliniques et sur plusieurs tumeurs neuroendocrines (Mazziotti *et al.*, 2017; Vitale *et al.*, 2018; Lamberts *and* Hofland, 2019). Cependant, leur impact sur la sécrétion des cellules chromaffines tumorales n'a jamais été étudié.

L'objectif de cette étude fut donc de tester l'effet potentiel de l'octréotide et du SOM230 sur l'activité sécrétrice des cellules chromaffines de phéochromocytomes humains, et d'en étudier le mécanisme. Étant donné le caractère rare et précieux des échantillons humains, j'ai tout d'abord utilisé des cultures primaires de cellules chromaffines bovines afin de mettre en évidence un effet anti-sécrétoire potentiel de ces analogues. J'ai ainsi réalisé des courbes dose-réponse pour trouver une concentration efficace. J'ai poursuivi cette étude en utilisant la technique d'ampérométrie à fibre de carbone pour mesurer la sécrétion de catécholamines sur des cultures primaires de cellules chromaffines humaines directement cultivées à partir de phéochromocytomes humains. Cette approche m'a permis de mesurer précisément, à l'échelle unicellulaire, le nombre d'évènements d'exocytose, la quantité de catécholamines libérées ainsi que divers paramètres cinétiques du processus d'exocytose. Enfin, grâce à une collaboration avec Sylvain Hugel, chercheur dans l'institut, nous avons tenté de mettre en évidence le mécanisme d'action de ces drogues en utilisant des techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie.

2.2. Résultats

Les résultats obtenus sont exposés dans l'article intitulé « **Somatostatin analogue pasireotide (SOM230) inhibits catecholamine secretion in human pheochromocytoma cells** » que je signe en premier auteur et que nous avons très récemment soumis au journal « *Cancer Letters* » :

Dans cet article j'ai réalisé l'ensemble des expériences excepté l'imagerie calcique et les enregistrements des courants nicotiques. Des résultats complémentaires à cette étude sont également présentés dans la partie discussion pages 67 et 70.



Somatostatin analogue pasireotide (SOM230) inhibits catecholamine secretion in human pheochromocytoma cells

Laura Streit^a, Sophie Moog^a, Sylvain Hugel^a, Marion Rame^a, Emeline Tanguy^a, Virginie Andry^{a,b}, Herbert A. Schmid^c, Laurent Brunaud^d, Florence Bihain^d, Claire Nominé-Criqui^d, Yannick Goumon^{a,b}, Stéphanie Lacomme^e, Sandra Lomazzi^e, Michel Vix^f, Didier Mutter^f, Nicolas Vitale^a, Stéphane Ory^{a,1}, Stéphane Gasman^{a,*}

^a Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000, Strasbourg, France

^b SMPMS-INCL, Mass Spectrometry Facilities of the CNRS UPR3212, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000, Strasbourg, France

^c Novartis Pharmaceuticals, WSJ-103.5.10.1, CH-4002, Basel, Switzerland

^d Département de Chirurgie Viscérale, Métabolique et Cancérologique (CVMC), Unité médico-chirurgicale de chirurgie métabolique, endocrinienne et thyroïdienne (UMET), Unité médico-chirurgicale de chirurgie de l'obésité (UMCO), Université de Lorraine, CHRU NANCY, Hôpital Brabois Adultes, F-54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^e Centre de Ressources Biologiques Lorrain, CHRU Nancy, Hôpitaux de Brabois, F-54511, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^f NHC Strasbourg, Service de Chirurgie Digestive et Endocrinienne des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, Hôpital Civil, F-67000, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Somatostatin analogues
Pasireotide (SOM230)
Octreotide
Neuroendocrine tumor
Pheochromocytoma
Exocytosis
Secretion

ABSTRACT

Increasingly common, neuroendocrine tumors (NETs) are regarded nowadays as neoplasms potentially causing debilitating symptoms and life-threatening medical conditions. Pheochromocytoma is a NET that develops from chromaffin cells of the adrenal medulla, and is responsible for an excessive secretion of catecholamines. Consequently, patients have an increased risk for clinical symptoms such as hypertension, elevated stroke risk and various cardiovascular complications. Somatostatin analogues are among the main anti-secretory medical drugs used in current clinical practice in patients with NETs. However, their impact on pheochromocytoma-associated catecholamine hypersecretion remains incompletely explored. This study investigated the potential efficacy of octreotide and pasireotide (SOM230) on human tumor cells directly cultured from freshly resected pheochromocytomas using an implemented catecholamine secretion measurement by carbon fiber amperometry. SOM230 treatment efficiently inhibited nicotine-induced catecholamine secretion both in bovine chromaffin cells and in human tumor cells whereas octreotide had no effect. Moreover, SOM230 specifically decreased the number of exocytic events by impairing the stimulation-evoked calcium influx as well as the nicotinic receptor-activated inward current in human pheochromocytoma cells. Altogether, our findings indicate that SOM230 acts as an inhibitor of catecholamine secretion through a mechanism involving the nicotinic receptor and might be considered as a potential anti-secretory treatment for patients with pheochromocytoma.

1. Introduction

Neuroendocrine tumors (NETs) are a heterogeneous group of neoplasms arising from hormone, amine and peptide secreting cells that are spread all over the body, and its incidence has constantly increased during the last decades. NETs are often associated with a deregulation of hormone secretion which can induce clinical complications [1–6].

Pheochromocytoma (Pheo) is a NET arising from chromaffin cells of the adrenal medulla, which store and then secrete catecholamines in the blood stream. While Pheos are rare, most of them are responsible for catecholamine hypersecretion that may lead to severe and potentially life-threatening clinical complications. Clinical symptoms in patients with Pheos are mainly related to catecholamine hypersecretion and include the classic triad of headaches, palpitations, and profuse sweating

* Corresponding author.

E-mail address: gasman@inci-cnrs.unistra.fr (S. Gasman).

¹ S. Ory and S. Gasman contributed equally to this paper.

but also permanent or paroxysmal hypertension [7–9]. It has been also reported that Pheo can lead to severe acute cardiovascular complications including myocarditis, Takotsubo syndrome, as well as various forms of cardiomyopathies [10,11]. Accordingly, a retrospective study has shown that patients with Pheo have a 14-fold higher rate of cardiovascular events than patients with essential hypertension [12]. Finally, it is interesting to note that approximately 1 Pheo is found every 2000 autopsies (0.05%), a proportion significantly higher than the estimated prevalence of the general population suggesting a premature mortality caused by Pheo [13,14].

Although currently controversial, the symptoms of patients with Pheo can be treated by preoperative antihypertensive medications such as α - and β -blockers or calcium channel blockers to counteract the negative effect of excessive catecholamine secretion during surgical resection [15]. In France, the most common antihypertensive treatments currently use are calcium channel blockers such as nifedipine [16,17]. However, to this date, no drug has been shown to directly and specifically prevent hypersecretion of tumor cells from Pheo. Interestingly, somatostatin analogues are currently among the most widely used drugs to treat the symptoms of different NETs, including excessive hormone secretion [18]. Octreotide and lanreotide were the two first-generation analogues tested and are still currently used in the treatment of gastroenteropancreatic NETs and acromegaly caused by a pituitary adenoma [19]. These analogues were reported to have a dual effect by decreasing both tumor cell proliferation and tumor hypersecretion [18, 20,21]. In the early 2000s, a new generation of somatostatin analogues has emerged with the development of pasireotide (SOM230). While octreotide binds preferentially the somatostatin receptor SSR2, SOM230 is a multi-receptor-targeted analogue with a 40-, 30- and 5-fold higher affinity than octreotide for somatostatin receptors SSR5, SSR1 and SSR3, respectively [22,23]. For instance, SOM230 has been authorized for Cushing disease and acromegaly treatments [24,25]. *In vitro* and *in vivo* data have also shown that this analog is able to effectively inhibit gastroenteropancreatic NETs secretion and improve symptoms in patients refractory to octreotide treatment [20,26].

As somatostatin receptors are also expressed by Pheo [27,28], the aim of the present work was to investigate whether somatostatin analogues impact catecholamine secretion of adrenal chromaffin cells *in vitro* and thus determine its potential to prevent catecholamine hypersecretion. Using carbon fiber amperometry, we have tested the effect of octreotide and SOM230 treatments on primary cultures of either bovine chromaffin cells or tumor cells directly cultured from freshly resected human Pheos and found that SOM230 has an effective anti-secretory effect.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Octreotide and pasireotide (SOM230) were obtained from Novartis, Basel, Switzerland. Analogues were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and stock solutions at 10^{-2} or 10^{-3} M were stored at -20°C and protected from light exposure.

2.2. Patient population

The medical files of patients with Pheo in 2 French centers between 2017 and 2021 were retrospectively reviewed. We collected the following data: initial diagnosis, including a clinical examination looking for hormonal-related symptoms and biological analysis. As recommended by the Endocrine Society clinical practice guideline published in 2014 [29], Pheo genetic testing was proposed to identify germline mutations in the major susceptibility genes (SDHB, SDHC, SDHD, VHL, NF1, RET, TMEM127, MAX) using Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Then, as recommended in the consensus statement published in 2017 [30],

next-generation-sequencing (NGS)-based diagnostic was carried out for more recent patients. Biological analysis comprised the measurement of metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) levels (in urine and/or plasma). When available, chromogranin A (CGA) measurements were also registered. Levels of free MN, NMN and CGA in plasma, as well as urinary levels of MN and NMN are presented as ratios normalized by the normal upper limits. Urinary or plasma MN and NMN levels reaching two-fold the upper limit of the normal range and/or CGA exceeding the upper limit of the normal range was defined as the threshold of abnormal hormonal secretion [7]. Catecholamine-producing phenotype of Pheo were categorized as previously described [31]: adrenergic (AD) phenotype, when MN content exceeded 10% of the combined MN and NMN contents, or noradrenergic (NAD) phenotype when MN content remained below 10% of the combined MN and NMN contents. Pathological evaluation was reviewed, including tumor size, Ki-67 result and the PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score) as previously described [32].

2.3. Primary culture of chromaffin cells

Bovine chromaffin cells were cultured as previously described [33]. Human tumor cells were cultured from freshly resected Pheos following surgery [34]. In the operating room and immediately after the resection, the adrenal gland was cut longitudinally in two parts. Roughly a 1 cm^3 piece of tumor tissue was dissected and immediately plunged into ice cold transport medium (Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free Hank's Balanced Salt Solution (CMF HBSS, Sigma) supplemented with 0.2% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma) or MACS Medium Tissue Storage solution (Miltenyi Biotec). Up to 3 h after resection, the tumor sample was minced into 1 mm^3 pieces in a dish containing CMF HBSS. Chunks were collected, centrifuged at 250 g for 5 min at room temperature and the pellet resuspended in 15 mL of complete medium (RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco), 15% FBS, 1% penicillin/streptomycin). Red blood cells, debris and fat were separated from minced tissue by sedimentation for 15 min at room temperature. The supernatant was removed and 15 mL of complete medium were added to the pellet before centrifugation at 250 g for 5 min. Tumor pieces were resuspended in HBSS (in 10 times the tissue volume), containing 1.5 mg/mL of collagenase B (Roche) and 1 mg/mL of the protease dispase II (Gibco) and gently rocked for 45 min at 37°C . 5 min before the end of protease digestion, 0.1 mg/mL DNase I (Roche) was added to remove potential DNA clumps. Samples were left for a few minutes to sediment at room temperature and supernatant recovered (fraction 1). The pellet was resuspended in 5 mL of CMF HBSS and triturated for a couple of minutes to dislodge tumor cells from chunks. The remaining pieces were left few minutes to sediment and the supernatant recovered (fraction 2). Both fractions were centrifuged at 800 g for 5 min at room temperature. Cell pellets were resuspended in 2 mL of CMF HBSS. 4 mL of Red Blood Cell Lysis Buffer (Roche) were added before being gently rocked for 10 min at room temperature. The fractions were centrifuged at 500 g for 5 min and resuspended into complete medium. Cell viability and density were estimated under a microscope and 300 μL of cell suspension were seeded into type I collagen (Corning)-coated 35 mm dishes (MatTek) for amperometry or polylysine (Sigma)-coated glass coverslips for calcium imaging and electrophysiology experiments. Cells were left to adhere overnight at 37°C in an incubator with water-saturated and 5% CO_2 atmosphere. 2 mL of complete RPMI were added the following day and cells were used within two days.

2.4. Catecholamine secretion assay

Assays were performed as previously described [33]. Briefly, bovine chromaffin cells were seeded in 96 well plates (Thermo Fisher Scientific) at a density of 250,000 cells per well and were maintained in culture for 48–72 h before experiments. Cells were washed 3 times for 7 min with

200 μL of Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 11 mM glucose, 0.01 mM EDTA, 0.56 mM ascorbic acid and 15 mM HEPES, pH 7.5) at 37 °C and stimulated for 10 min with 50 μL of an high K^+ solution (Locke's solution containing 59 mM KCl, pH 7.2) or 10 μM nicotine (Sigma) with or without SOM230 or octreotide. Basal secretion was obtained by maintaining cells in Locke's solution for 10 min. The secretion was stopped by placing cells at 4 °C and supernatants were immediately collected. Cells were lysed with 200 μL of Locke's solution containing 1% Triton X-100 (Sigma) for 3 min at 37 °C. The plate was then centrifuged at 3,000 g for 10 min at room temperature. 20 μL of each sample were transferred to a black 96-well plate (Thermo Fisher Scientific). 150 μL of CH_3COOH (1 M, pH 6) and 15 μL of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (0.25%) were added to oxidize the noradrenaline and adrenaline to noradrenochrome and adrenochrome, respectively. Addition of 50 μL of NaOH (5 M) containing ascorbic acid (0.3 mg/mL) transformed aminochromes to fluorescent noradrenolutine and adrenolutine. Fluorescence was measured ($\lambda_{\text{excitation}}$: 430 nm, $\lambda_{\text{emission}}$: 520 nm) with a spectrofluorometer (Mithras LB 940, Berthold). Amounts of secreted catecholamines are expressed as percent of total catecholamines. Data are representative of at least 3 independent cultures and each measurement was realized in triplicate. The sigmoid curve in Fig. 1B has been fitted using the 4-parameter logistic regression curve method (Sigma Plot).

2.5. Mass spectrometry

Preparation and derivation: bovine chromaffin cells were stimulated as described above in 2.4. The secretion medium was then recovered and 50 μL of H_2O containing 0.1 mM ascorbic acid was added to the well containing chromaffin cells. Cells were detached mechanically and the cell lysates were sonicated (4×10 s, 100 W; Model 505 Sonic Dismembrator; Fisher Scientific). After centrifugation (20,000 g, 30 min, 4 °C), supernatants were collected.

20 μL of the cell extract or 20 μL of the secretion medium were mixed with 30 μL of borate buffer, 10 μL AccQTag Ultra reagent (AccQ-Tag Ultra derivatization kit, Waters, Guyancourt) and 10 μL of internal standards containing 20 pmoles of D4-Dopamine, D6-Adrenaline and C6-Noradrenaline in 0.1 mM ascorbic acid. The mixture was incubated 10 min at 55 °C under agitation. Then, 280 μL of acetonitrile was added in order to precipitate proteins, and samples were centrifuged at 20,000 g during 15 min at 4 °C. The resulting supernatants were dried under vacuum and suspended in 20 μL of H_2O containing 0.1% formic acid (v/v). Finally, 5 μL of the resulting extracts were analyzed by LC-MS/MS (see below). Samples were loaded into reverse phase Zorbax column (1SB-C18, #863600-902; 1 mm \times 150 mm, 3.5 μm , Agilent Technologies).

LC-MS/MS conditions: a LC-MS/MS approach was used to quantify the presence of dopamine, adrenaline, and noradrenaline using the

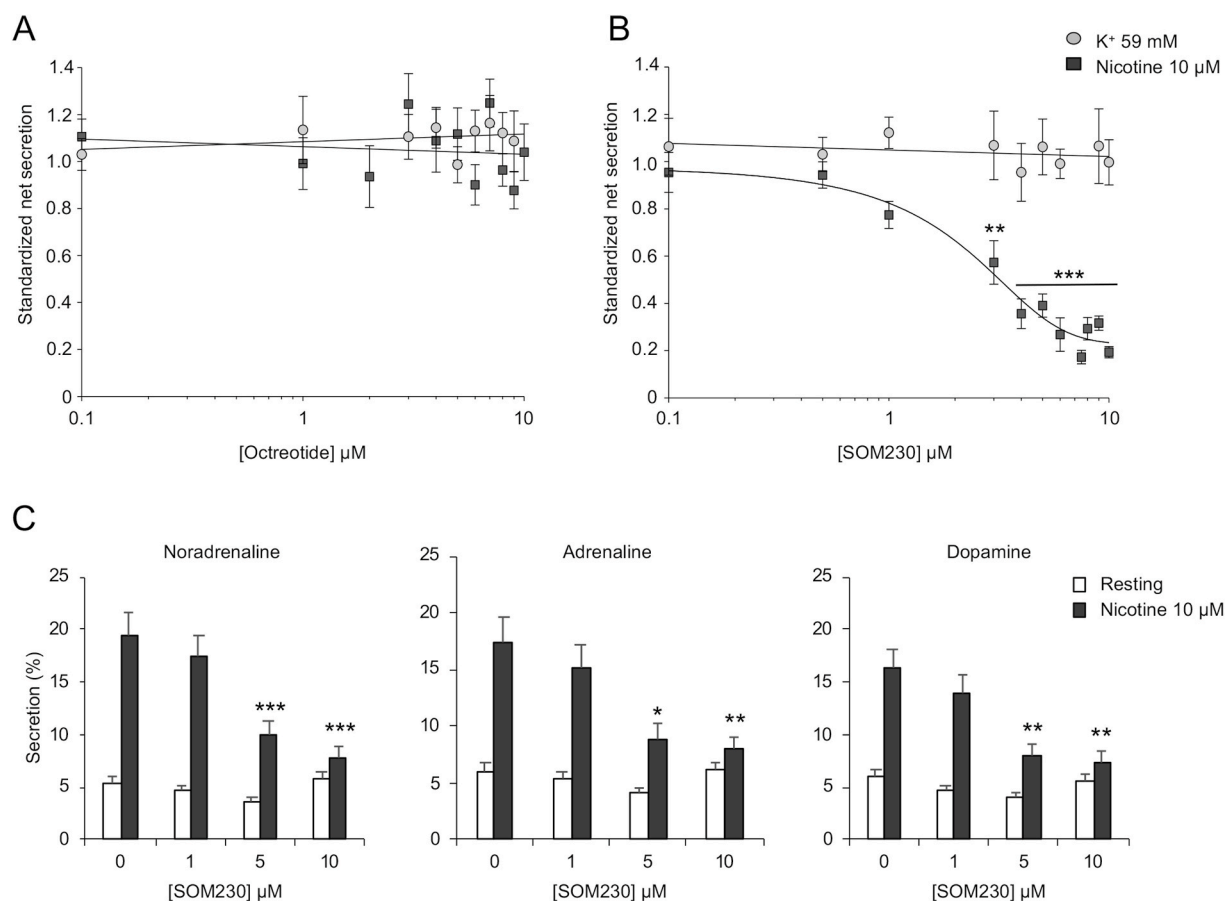


Fig. 1. The somatostatin analogue pasireotide (SOM230) specifically inhibits catecholamine secretion from bovine chromaffin cells. Bovine chromaffin cells were stimulated with 10 μM nicotine or with a high K^+ depolarizing solution (59 mM) for 10 min in the presence of the indicated concentrations of octreotide (a) or SOM230 (b). Catecholamine release was quantified using an adrenolutine fluorescent assay (a, b) or mass spectrometry (c). For adrenolutine assay, basal release was subtracted to obtain the net catecholamine secretion and for each concentration of analogues, secretion was normalized to control secretion (untreated cells) which was fixed to 1. The proportion of catecholamines secreted in resting and stimulated conditions are indicated in Supplementary Figures 1A and B. Data are given as the mean values \pm SEM obtained from different cell cultures ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by Dunn's test or One Way ANOVA followed by Dunnett's test.

multiple reaction monitoring mode (MRM). Analyses were performed on a Dionex Ultimate 3000 HPLC system (Thermo Scientific) coupled with an Endura triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Electron). The system was controlled by Xcalibur v. 2.0 software (Thermo Electron).

Elution of the compounds was performed at a flow rate of 90 $\mu\text{L}/\text{min}$, at 40 $^{\circ}\text{C}$, according to the gradient detailed in [Supplementary Table 1](#). Buffer A corresponded to H_2O 98.9%/ACN 1%/formic acid 0.1% (v/v/v), whereas buffer B was ACN 99.9%/formic acid 0.1% (v/v). The MRM mode was used to identify and quantify target molecules according to the instrument settings and target compounds molecular signatures detailed in [Supplementary Table 2](#). The selection of the monitored transitions and the optimization of the collision energy (CE) were manually determined. The identification of the compounds was based on precursor ion, selective fragment ions and retention times obtained for dopamine, adrenaline, and noradrenaline and their corresponding internal standards. Amounts of neurotransmitters were quantified according to the isotopic dilution method [35].

2.6. Carbon fiber amperometry

Chromaffin cells were washed with Locke's solution (without ascorbic acid) and processed for catecholamine release measurements by amperometry as previously described [36,37]. A carbon fiber

electrode of 5 μm diameter (ALA Scientific Instruments) was held at a potential of +650 mV compared with the reference electrode (Ag/AgCl) and approached close to one cell. Secretion of catecholamines was induced by a 10 s pressure ejection of a 100 μM nicotine (Sigma) solution from a micropipette (Femtotips®, Eppendorf) positioned 10 μm from the cell and recorded over 60 s. The somatostatin analogue (octreotide or SOM230) was added either in the stimulation pipette or directly in the incubation medium. The amperometric recordings were performed with an AMU130 amplifier (Radiometer Analytical), calibrated at 5 kHz, and digitally low-pass filtered at 1 kHz. Analysis of the amperometric recordings was performed as previously described with a macro (laboratory of Dr. R. Borges; <http://webpages.ull.es/users/rborges/>) written for Igor software (WaveMetrics), allowing automatic spike detection and extraction of spike parameters [38]. The spike parameters analysis was restricted to spikes with amplitudes higher than 5 pA, which were considered as exocytic events. All spikes identified by the program were visually inspected. Overlapping spikes and spikes with aberrant shapes were discarded for parameters analysis. Quantal size (spike charge, Q) of each individual spike was measured by calculating the spike area above the baseline. Spike area is defined as the time integral of each transient current, I_{max} as the height of each spike, half-width as the width of each spike at half its height ($T_{1/2}$) and T_{peak} as the spike rise time ([Fig. 2C](#)).

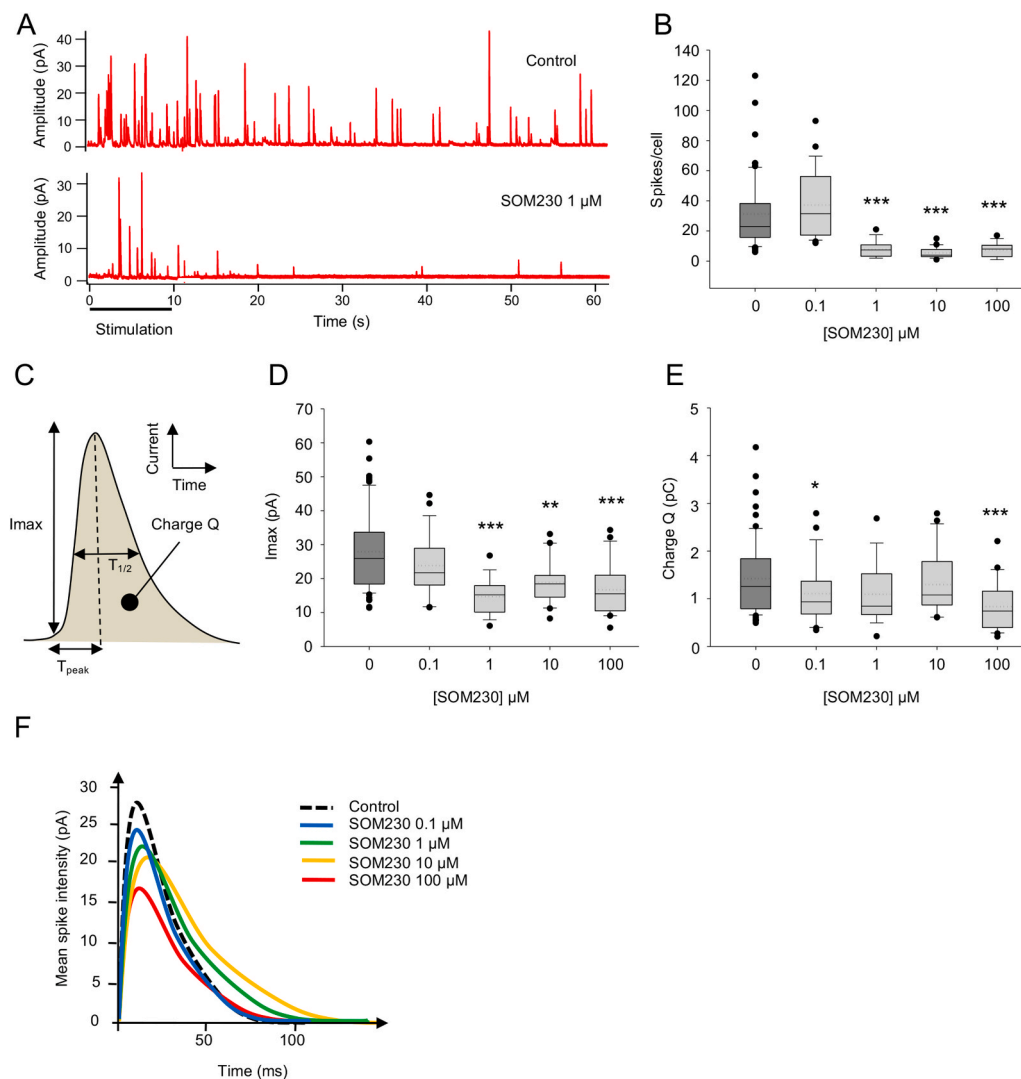


Fig. 2. SOM230 affects different parameters of individual exocytotic events from single adrenal bovine chromaffin cells. Single bovine chromaffin cells were stimulated with a local application of 100 μM nicotine for 10 s and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. (a) Example of a typical amperometric recording obtained from an untreated cell (control) or a cell treated with 1 μM SOM230. (b) Box and whisker diagrams illustrating the number of amperometric spikes per cell. Each plot represents the 1st quartile (bottom line), the median (line in the box), the mean (dotted line in the box) and the third quartile (upper line). Whiskers correspond to the 5th (bottom) and the 95th (top) percentile and black dots represent outlier observations; *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test. (c) Scheme of a spike representing a single granule fusion event and parameters that can be evaluated from each individual spike. (d, e) Increasing concentrations of SOM230 significantly affects the spike amplitude (I_{max} ; (d)) and the quantal size (Charge Q; (e)); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test. (f) The superimposition of average spikes for each condition illustrates the effect on the spike shape of SOM230 when applied through the stimulation pipette. All the average amperometric data are detailed in [Table 1](#).

2.7. Intracellular calcium imaging

Changes in the intracellular Ca^{2+} concentration were detected by the ratiometric fluorescent probe Fura-2. Cells were loaded during a 1 h incubation with 2 μM of the cell-permeant precursor Fura-2 acetoxymethyl ester (Fura-2AM; Molecular Probes) and 0.001% (w/v) pluronic acid (Molecular Probes). The recording saline solution contained 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM glucose and 10 mM HEPES, pH 7.4. Fluorescence measurements were performed on an inverted microscope (Axiovert 35; Zeiss) with an oil immersion 40 Nikon objective (Fluor 40, NA 1.30) and a cooled CCD camera (Cool-Snap HQ; Photometrics). The Imaging Workbench 4.0 software (Axon Instruments) was used for image acquisition. Fluorescence was excited alternately at 350 and 380 nm with a Lambda-10 filter wheel (Sutter Instruments), and emitted light was collected above 520 nm. Pairs of images were acquired every 2 s. Intracellular calcium level is expressed throughout as the fluorescence ratio F_{350}/F_{380} , calculated after background subtraction. Experiments were performed at 34 °C. During calcium measurements, cells were continuously perfused with saline solution: the whole dish by a bath perfusion of control medium and the recorded field by a single-tip multichannel gravity-fed system, allowing switching between various solutions. Analysis was performed using Clampfit 10.2 (MDS Analytical Technologies). Responses induced by 15 μM nicotine in presence of SOM230 were normalized with respect to the average of the previous and subsequent responses induced by 15 μM nicotine alone.

2.8. Electrophysiological recordings

Whole-cell patch-clamp recordings were performed with an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments) and low resistance (3–4 M Ω) electrodes. The final series resistance during electrophysiological recordings was between 5 and 15 M Ω . Membrane currents were recorded under voltage-clamp at a steady holding potential of –60 mV. The recording saline solution was the same as for calcium imaging experiments (see above). The culture dish was continuously perfused with extracellular solution at a rate of 3 mL·min⁻¹. Recording electrodes were filled with: 140 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 2 mM MgATP, pH 7.3. 1 mM QX314 (Alomone Labs) was added to the intrapipette solution to prevent spiking of the recorded cell. Experiments were performed at room temperature (20–22 °C). The different substances were applied or coapplied locally by means of a U-tube allowing a relatively fast solution exchange around the cell (<50 ms). Signals were low-pass filtered at 5 kHz, sampled at 20 kHz, digitized using a BNC-2110 data acquisition card (National Instruments) and acquired with the Strathclyde electrophysiology software (WinWCP, John Dempster, University of Strathclyde). Analysis was performed using Clampfit 10.2 (MDS Analytical Technologies). Responses induced by 15 μM nicotine in presence of SOM230 were normalized with respect to the average of the previous and subsequent responses induced by 15 μM nicotine alone.

2.9. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SigmaPlot 13.0 (Ritme). One way ANOVA followed by Dunnett test were performed to assess the difference between multiple groups when data followed normal distribution and equal variance. If normality or equal variance failed, significance was estimated by non-parametric tests. Wilcoxon Rank Sum test or Mann-Whitney Rank Sum test was used for comparison between two groups and multiple comparisons Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by Dunn's test were performed to assess the difference between multiple groups. A p value < 0.05 was considered to be significant for all tests.

3. Results

3.1. Effect of octreotide and pasireotide on bovine chromaffin cells secretion

We first analyzed the potential effect of the first-generation somatostatin analogue octreotide and the next-generation somatostatin analogue pasireotide (SOM230) on catecholamine secretion from primary culture of bovine chromaffin cells. To analyze the global catecholamine release, we used an assay based on the oxidation of catecholamines into fluorescent aminolutin [33]. Secretion was evoked either by 10 μM nicotine or by a high K^+ depolarizing solution (59 mM). As shown in Fig. 1A, increasing concentration of octreotide did not affect catecholamine secretion regardless of the stimulus type. On contrary, SOM230 treatment triggered a significant dose-dependent inhibition of the nicotine-induced catecholamine secretion (IC_{50} = 2.64 μM and maximum efficacy = 77% inhibition), whereas no effect was observed on K^+ -evoked secretion (Fig. 1B). At higher concentration, SOM230 inhibited catecholamine release up to 81.0% \pm 2.4% (Fig. 1B). In agreement with previous studies [39,40], we also observed in our experimental conditions that somatostatin (SS14) inhibited catecholamine secretion in a concentration range similar to SOM230 (data not shown).

To confirm that SOM230 inhibits secretagogue-evoked catecholamine release and to check whether the secretion of different catecholamines is equally affected, we quantified noradrenaline, adrenaline and dopamine release using mass spectrometry. As shown in Fig. 1C, SOM230 similarly inhibited noradrenaline, adrenaline and dopamine secretion. In control experiments, we have shown that 10 μM octreotide does not modify the secretion of any of the catecholamines (Supplementary Fig. 1C).

To better investigate the effect of SOM230 on secretion, we next recorded catecholamine release by carbon fiber amperometry (Fig. 2). More sensitive than the adrenolutine assay, carbon fiber amperometry is an electrochemical method that allows to calculate frequency, quantal size and kinetics of individual exocytic events from single cells [41,42]. Cultured bovine chromaffin cells were stimulated by a puff application using a stimulation pipette containing 100 μM nicotine, with or without the indicated concentration of SOM230. As illustrated by the representative amperometric traces in Fig. 2A, the most striking effect of SOM230 treatment is a reduction in the number of amperometric spikes. Indeed, increasing concentrations of SOM230 reduced substantially the spike number per cell (reduction from 76 to 82%) indicating a strong decrease of exocytic events (Fig. 2B and Table 1). These results clearly demonstrated that SOM230 treatment drastically inhibits exocytosis leading to a large reduction of catecholamine release.

Each individual spike represents a single granule fusion event and is composed of a rapid rise corresponding to the quick release of a high concentration of catecholamines through a fusion pore as it dilates, followed by a slower decay representing the subsequent diffusion of molecules from the release site to the electrode surface. Therefore, analyzing the individual amperometric spike provided valuable dynamic information on the remaining exocytic process. The surface area or quantal size (Q) is proportional to the amount of catecholamines released per event, the spike amplitude value (I_{max}) reflects the maximal flux of catecholamines, whereas the half-width ($T_{1/2}$) and the time to peak (T_{peak}) reflect the duration of exocytotic events and the kinetics of the fusion pore expansion, respectively (Fig. 2C). The spike parameters means for each SOM230 concentration are listed in Table 1. From 1 μM concentration in the stimulation pipette, SOM230 reduced the spike amplitude with or without reducing the quantal size (Fig. 2D and E, Table 1). This effect on quantal size may depend on the capacity of SOM230 to change the spike kinetics and duration as a concomitant increase of $T_{1/2}$ and T_{peak} has been observed only at concentrations of 1 and 10 μM (Table 1). Accordingly, superimposing the average shape of spikes for each SOM230 treatment condition revealed that the spike

Table 1

Characteristics of amperometric spikes from bovine chromaffin cells treated with puff application of SOM230 in pipette. Amperometric recordings were performed on cultured bovine chromaffin cells. Cells were stimulated with 100 μM of nicotine and the indicated SOM230 concentration for 10 s. The number of cells, the number of amperometric spikes per cell and the different amperometric spike parameters are indicated. Results represent the mean \pm SEM. Bold values are considered significantly different from the control condition; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test.

[SOM230] μM	0	0.1	1	10	100
Number of cells	69	28	16	20	21
Total number of spikes	2067	1043	125	110	155
Number of spikes/cell	31.32 \pm 2.85	37.25 \pm 4.24	7.81 \pm 1.33 ***	5.50 \pm 0.83 ***	7.38 \pm 1.11 ***
Number of analyzed spikes	1463	735	57	53	72
I _{max} (pA)	27.88 \pm 1.39	23.84 \pm 1.76	14.70 \pm 1.31 ***	18.87 \pm 1.41 **	16.70 \pm 1.69 ***
Charge Q (pC)	1.42 \pm 0.09	1.11 \pm 0.12 *	1.10 \pm 0.16	1.30 \pm 0.14	0.84 \pm 0.11 ***
T _{1/2} (ms)	46.10 \pm 1.86	41.94 \pm 3.10	65.49 \pm 6.62 **	60.82 \pm 4.12 **	43.62 \pm 2.17
T _{peak} (ms)	22.76 \pm 0.92	21.95 \pm 2.06	31.14 \pm 3.13 **	29.75 \pm 2.40 **	22.00 \pm 1.29

height is progressively decreasing upon increasing concentration of SOM230 with a mild shift of spike kinetics for 1 and 10 μM SOM230 treatment (Fig. 2F). Altogether, the amperometric spike analyses suggest that SOM230 treatment might also affect the fusion pore formation/expansion/closure of the residual exocytic events or the granule catecholamine content.

Puff application of SOM230 close to single recorded cells is likely to misjudge the effective inhibiting dose of SOM230 because of the rapid dilution of the SOM230 solution in the cell incubation medium. Therefore, we also tested different SOM230 concentrations directly in the bath (Supplementary Fig. 2). Under those conditions, treatment of cells with 0.01 and 0.1 μM SOM230 significantly inhibits the number of exocytic events by around 20 and 60%, respectively. However, the residual spike amplitude was inhibited by around 30% only at 0.1 μM , whereas quantal size was not significantly affected most likely due to an increase of T_{1/2} and T_{peak}. These results indicate that SOM230 starts to significantly affect the exocytic process from 0.1 μM and above.

3.2. Effect of SOM230 treatment on catecholamine secretion of human pheochromocytoma cells

The ability of SOM230 to also inhibit catecholamine secretion of human pheochromocytoma (Pheo) cells was the next important point we decided to address. Ten patients (6 females and 4 males, mean age of 62 \pm 10 years) with histologically confirmed Pheo were included in this study (Table 2). Seven patients (70%) were diagnosed with hormonal-related symptoms whereas all of them presented abnormal hormonal secretion (100%). All were considered to have an adrenergic phenotype although three had excess of normetanephrines. Two out of 10 patients (20%) were diagnosed with a neurofibromatosis type 1 and one had a confirmed sporadic disease while the genotype of the 7 other patients

Table 2

Clinical, biochemical, and functional characteristics of the 10 patients with pheochromocytoma evaluated in this study. Age at diagnosis, gender (F: female, M: male), the presence (Yes) or absence (No) of hormonal hypersecretion symptoms, biochemical and functional values are represented for each patient number (#). MN: metanephrine, NMN: normetanephrine, ULN: upper limit normal, CGA: chromogranin A, PASS: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score, Spor: sporadic, NF1: neurofibromatosis type 1, -: not available.

#	Age	Gender	Symptoms	Urinary MN (ULN ratio)	Urinary NMN (ULN ratio)	Plasma free MN (ULN ratio)	Plasma free NMN (ULN ratio)	Plasma CGA (ULN ratio)	Size (cm)	Ki-67 (%)	PASS score	Genetics
1	47	F	Yes	4.7	23.4	–	–	1.2	7	1	0	Spor
2	58	F	Yes	–	–	1.9	2.5	–	2	1	1	NF1
3	58	F	Yes	2.8	10.4	4.4	7.4	–	3.5	1	4	–
4	56	F	No	–	–	4.9	8	4.9	4.9	1	1	–
5	72	M	Yes	10.3	9.6	–	–	–	6.5	1	2	–
6	70	F	Yes	1.4	5.6	–	–	–	3.5	2	2	NF1
7	52	F	No	13.3	0.8	21.9	2.0	–	5	1	2	–
8	61	M	No	1.2	1.3	0.9	2.3	0.8	1.8	4.8	1	–
9	77	M	Yes	10.6	4.6	–	–	–	4	5	2	–
10	72	M	Yes	3.8	2.1	3.4	1.45	2.2	2.8	1.5	1	–

was not known yet. The mean tumor size was 4.3 cm (range 1.8–7.0 cm). Other pathological characteristics are detailed in Table 2.

Catecholamine secretion analysis by carbon fiber amperometry was performed on tumor cells directly cultured from 8 of these freshly resected human Pheos. Four patient's cultures have been treated with SOM230 present in the stimulation pipette (patients 1 to 4), whereas the 4 others cultures have been treated with SOM230 directly added to the cell culture medium with lower SOM230 concentrations (patients 5 to 8). One to three different concentrations have been tested per patient depending on the culture viability over time and on the amount of material. All the amperometric parameters measured on human Pheo cells are summarized in Table 3.

Fig. 3A shows representative amperometric traces recorded from untreated human Pheo cells (control) or from Pheo cells treated with 1 μM SOM230 in stimulation pipette (left) or with 0.1 μM SOM230 in cell culture medium (right). From these recordings it is noticed that, as observed in bovine chromaffin cells, SOM230 treatment drastically reduced the number of spikes. Fig. 3B illustrates the variation of the total amount of spikes per cell for each patient. Importantly, all patients were sensitive to SOM230 showing a significant decrease of exocytic events. Furthermore, the inhibitory effect of SOM230 on catecholamine release was dose-dependent in all the cases, when different concentrations of SOM230 were tested on cells from the same patient. Of note, the inhibitory effect of SOM230 on catecholamine secretion appears more potent when it is present in the cell medium than when it is added to the pipette, because of the rapid dilution of SOM230 resulting from this type of application. Indeed, when present in the cell medium, SOM230 inhibits catecholamine secretion from 0.1 μM (patients 5, 6, 7 and 8 with inhibition by around 88%, 56%, 63% and 42%, respectively), a concentration that corresponds more or less to a puff of 1 μM through the stimulation pipette. Accordingly, 1 μM SOM230 treatment of Pheo cells

Table 3
 Characteristics of amperometric spikes from 8 pheochromocytomas treated with SOM230. Amperometric recordings were performed on primary culture of human pheochromocytoma cells. Cells were stimulated with 100 μM of nicotine and the indicated SOM230 concentration for 10 s. For patients 1 to 4, SOM230 is in pipette stimulation and for patients 5 to 8, SOM230 is incubated in the cell medium. The number of cells, the number of amperometric spikes per cell and the different amperometric spike parameters are indicated. Results represent the mean \pm SEM. Bold values are considered significantly different from the control conditions; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test. Due to a limited number of spikes, spike parameters were not analyzed for 10 μM SOM230 in cells from patient 6 (-).

Identification	Treatment	Number of cells	Total number of spikes	Number of spikes/cell	Number of analyzed spikes	Inmax (pA)	Charge Q (pC)	$T_{1/2}$ (ms)	T_{peak} (ms)
Patient 1	SOM230 in pipette	Control	482	37.08 \pm 5.96	334	21.58 \pm 2.30	0.93 \pm 0.14	37.39 \pm 2.83	20.30 \pm 3.34
		100 μM	61	4.69 \pm 1.87 ***	46	13.29 \pm 1.86 *	0.50 \pm 0.07 *	33.05 \pm 2.46	13.84 \pm 1.40
		Control	866	57.73 \pm 2.76	400	23.72 \pm 1.15	1.04 \pm 0.06	39.65 \pm 0.89	30.66 \pm 0.84
Patient 2	SOM230 in pipette	Control	191	8.68 \pm 0.77 ***	70	19.75 \pm 1.58 *	0.98 \pm 0.11	46.65 \pm 2.81 *	35.79 \pm 1.88 *
		100 μM	22	42.11 \pm 5.25	276	15.84 \pm 2.19	0.60 \pm 0.10	33.53 \pm 2.29	16.95 \pm 1.58
		Control	379	39.00 \pm 10.70	110	16.28 \pm 3.38	0.72 \pm 0.19	39.57 \pm 2.33	20.41 \pm 1.61
Patient 3	SOM230 in pipette	Control	156	23.92 \pm 2.05 *	170	14.99 \pm 0.91	0.54 \pm 0.04	33.06 \pm 1.86	16.90 \pm 1.23
		0.1 μM	4	18.86 \pm 4.58 *	107	19.16 \pm 4.80	0.56 \pm 0.13	28.50 \pm 1.42	13.30 \pm 1.07
		1 μM	12	11.69 \pm 1.69	118	13.28 \pm 1.23	1.33 \pm 0.18	91.26 \pm 6.40	47.43 \pm 3.60
Patient 4	SOM230 in pipette	Control	187	10.18 \pm 3.83 *	76	7.96 \pm 0.73 **	0.92 \pm 0.08	105.13 \pm 4.56	57.91 \pm 3.91
		0.1 μM	11	4.50 \pm 1.39 ***	44	9.89 \pm 1.10	1.12 \pm 0.18	101.16 \pm 5.65	54.60 \pm 3.49
		1 μM	14	15.64 \pm 1.85	436	15.21 \pm 0.94	1.11 \pm 0.06	71.74 \pm 2.61	35.78 \pm 1.40
Patient 5	SOM230 in medium	Control	516	1.92 \pm 0.48 ***	40	10.73 \pm 2.86 ***	0.90 \pm 0.15 *	80.76 \pm 5.36	40.89 \pm 2.95
		0.1 μM	46	20.06 \pm 2.13	556	19.44 \pm 2.15	0.72 \pm 0.10	34.32 \pm 2.07	16.46 \pm 1.18
		Control	662	8.74 \pm 1.74 ***	185	16.07 \pm 2.79	0.66 \pm 0.12	38.33 \pm 1.87	19.55 \pm 1.37
Patient 6	SOM230 in medium	Control	201	6.24 \pm 1.16 ***	138	13.09 \pm 1.50 *	0.49 \pm 0.06	35.98 \pm 1.87	17.82 \pm 1.07
		0.1 μM	156	0.53 \pm 0.42 ***	7	-	-	-	-
		1 μM	10	28.50 \pm 4.86	555	12.79 \pm 0.83	0.68 \pm 0.04	52.05 \pm 2.27	25.85 \pm 1.40
Patient 7	SOM230 in medium	Control	627	10.53 \pm 3.28 ***	169	10.28 \pm 0.66 *	0.64 \pm 0.04	59.30 \pm 2.55 *	31.72 \pm 1.69 *
		0.1 μM	200	18.23 \pm 2.06	449	12.91 \pm 0.88	0.82 \pm 0.07	61.66 \pm 3.54	34.18 \pm 2.23
		Control	547	16.90 \pm 3.43	314	10.78 \pm 0.74 *	0.76 \pm 0.05	65.91 \pm 3.09	36.68 \pm 2.15
Patient 8	SOM230 in medium	Control	355	10.58 \pm 2.13 **	224	15.63 \pm 1.67	1.00 \pm 0.12	60.18 \pm 2.74	32.39 \pm 1.47
		0.01 μM	21	-	-	-	-	-	-
		0.1 μM	24	-	-	-	-	-	-

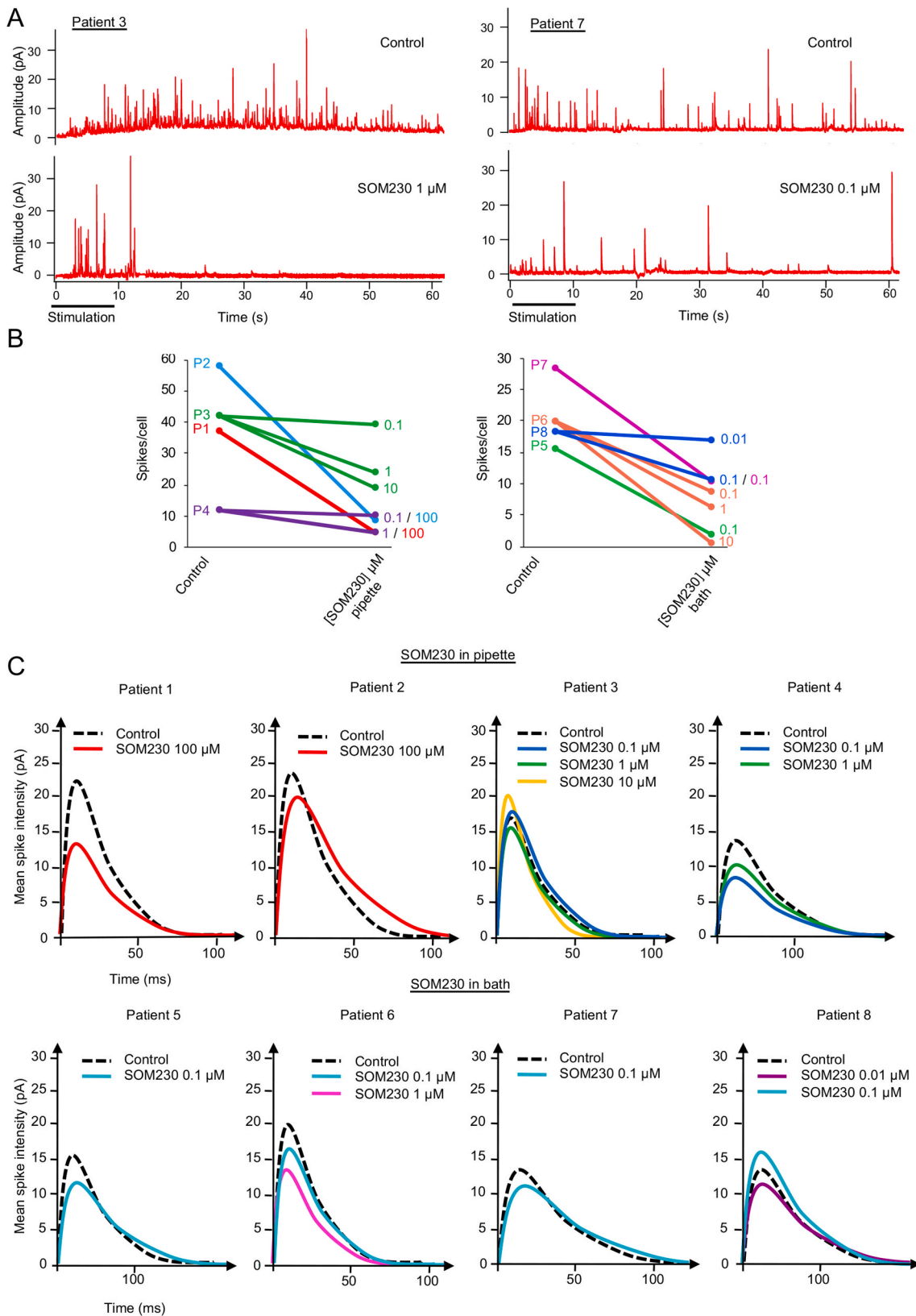


Fig. 3. SOM230 inhibits the secretion of human pheochromocytoma cells. Single human pheochromocytoma cells were stimulated with a local application of 100 μ M nicotine for 10 s in the absence or the presence of SOM230 and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. (a) Example of a typical amperometric recording obtained from untreated cells (controls, top) or cells treated with 1 μ M SOM230 in pipette (patient 3, bottom left), or with 0.1 μ M SOM230 in the cell incubation bath (patient 7, bottom right). (b) Representation of the mean number of spikes per cell in response to SOM230. Patients (P) are color-coded. SOM230 was present in the stimulation pipette (left) or added directly to the incubation bath (right) and the concentration is indicated. (c) Superimposition of average spike obtained for cells of each patient according to treatment conditions. SOM230 was applied either through the stimulation pipette (top) or in the incubation bath (bottom). All the average amperometric data are detailed in [Table 3](#).

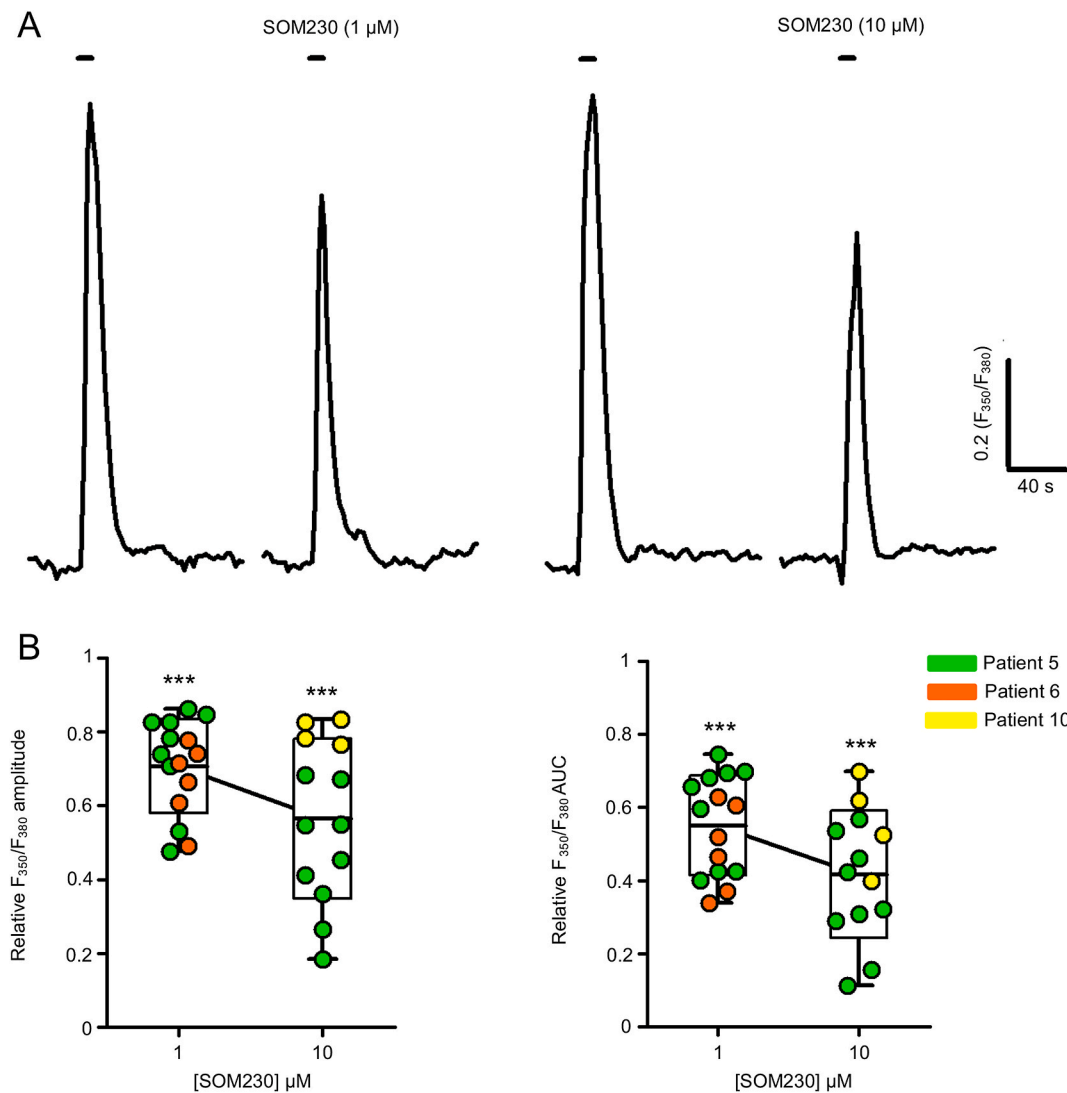


Fig. 4. Dose-dependent inhibition by SOM230 of calcium transients evoked by brief nicotine application on tumor cells from human pheochromocytoma. (a) Example of typical traces of calcium transients, represented as ratiometric changes in fluorescence emission during 10 s applications of 15 μM nicotine or during co-applications of nicotine with 1 or 10 μM SOM230 on human pheochromocytoma (data from patient 5). Nicotine application times are indicated by the horizontal lines. (b) Average amplitude (left) and area under the curve (AUC, right) of the ratiometric changes induced by 15 μM nicotine co-applied with 1 and 10 μM SOM230 normalized to the ratiometric changes induced by 15 μM nicotine alone. ****p* < 0.001 compared to control; Wilcoxon Rank Sum test.

through the stimulation pipette led to a significant inhibition of the number of spikes by around 43% (patient 3) and 61% (patient 4).

Next we analyzed the dynamic parameters of the residual spikes upon treatment with different concentrations of SOM230. Fig. 3C shows the average shape of spikes for each patient. Spike amplitude was reduced in 80% of patients' Pheo cells (ranging from 15 to 40% inhibition depending on SOM230 concentration) either alone (patients 4, 6 and 8) or associated with a decrease of the quantal size (patients 1 and 5) or with an increase of the kinetic and the duration of the exocytic events (patients 2 and 7). No significant changes have been observed for patient 3. These data tend to indicate that the residual exocytic events might be differentially affected from one patient to another.

Note that when octreotide treatment was tested on tumor cells from patient 2 at the highest dose of SOM230 (100 μM; Supplementary Fig. 3), only a modest decrease of the spike amplitude (around 15%) was observed, whereas the number of exocytic events and the other spike parameters remained unchanged. These data support a lack of effect of octreotide on catecholamine secretion from human Pheo cells and validate the specificity of the effect of SOM230.

3.3. Effect of SOM230 on intracellular calcium levels and membrane currents evoked by nicotine in human pheochromocytoma cells

Nicotine-induced stimulation of exocytosis in chromaffin cells triggers an elevation of intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) [43]. We therefore examined whether the rise in $[Ca^{2+}]_i$ induced by nicotine was inhibited by SOM230. To this end, we performed $[Ca^{2+}]_i$ imaging at single-cell resolution in tumor cells from 3 different human Pheos (patients 5, 6 and 10; Fig. 4). Stimulation of chromaffin cells with 15 μM nicotine generated a rapid increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4A). Co-application of nicotine with 1 or 10 μM SOM230 reduced the amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ by 29% and 42% respectively and the total integrated signal (area under the curve) by 45% and 58% respectively (Fig. 4B).

Since SOM230 reduced $[Ca^{2+}]_i$ responses to nicotine, we examined whether it affected the membrane currents evoked by nicotine. To this end, we performed whole-cell patch-clamp recordings in the voltage-clamp mode on human tumor cells cultured from 3 different Pheos (patients 7, 8 and 9; Fig. 5). Co-application of 15 μM nicotine with 1, 5 or 10 μM SOM230 significantly reduced the amplitude and the area under the curve of the current evoked by nicotine in a concentration-

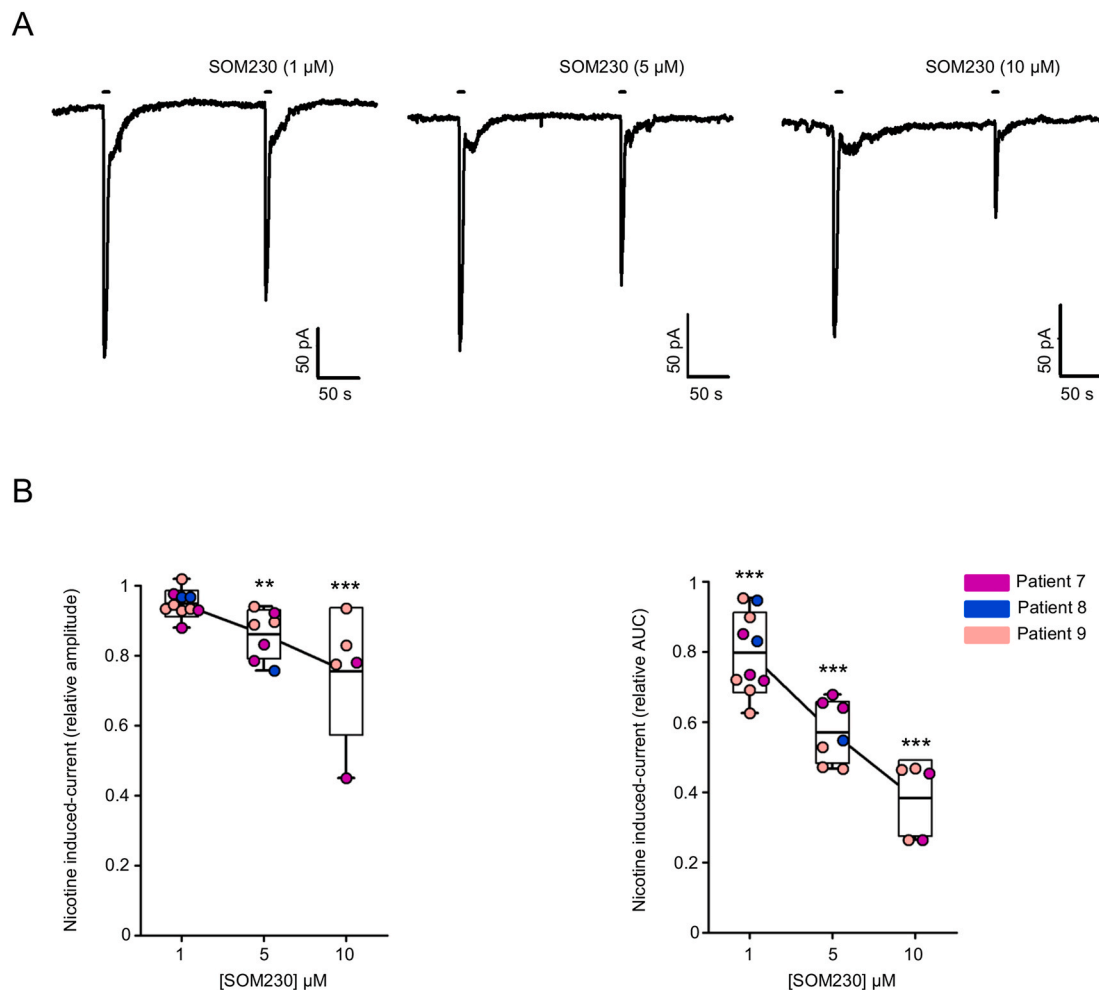


Fig. 5. Dose-dependent inhibition by SOM230 of currents evoked by brief nicotine application on tumor cells from human pheochromocytoma. (a) Example of currents induced by 3 s applications of 15 μM nicotine recorded in a cell incubated with 1, 5 or 10 μM SOM230 (data from patient 7). When SOM230 is co-applied with nicotine, the amplitude of the current is reduced. Nicotine application times are indicated by the horizontal lines. (b) Average amplitude (left) and area under the curve (AUC, right) of the current induced by nicotine coapplied with 1, 5 and 10 μM SOM230 normalized to the current induced by 15 μM nicotine alone. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control; Wilcoxon Rank Sum test.

dependent manner (Fig. 5A). On average, 1, 5 and 10 μM SOM230 respectively reduced the amplitude of nicotine-induced current by 5%, 14% and 25% and the area under the curve by 20%, 43% and 62% (Fig. 5B). These data indicate that SOM230 has a fast and concentration-dependent action on the function of nicotinic receptors.

4. Discussion

Historically misunderstood as relatively rare and harmless, current understanding shows that NETs are increasingly common and are now regarded as neoplasms that can cause debilitating symptoms and are life-threatening for patients. Indeed, loss of control of hormone secretion by NETs can result in a broad spectrum of symptoms and clinical syndromes ranging from feeling ill up to severe complications such as hypertension, hypoglycemia, carcinoid syndrome, cardiopathy and stroke. Moreover, NETs with initial low secretory activity can transform into high secreting lesions with negative impact on prognosis just by progressively becoming hormonally active [44–47]. Today, an unmet need is to identify drugs targeting the secretory activity of the tumor.

The main anti-secretory therapies currently used in clinic on patients with certain NETs and endocrine syndromes are the somatostatin analogues [48,49]. However, the impact of somatostatin analogues on pheochromocytoma-associated catecholamine hypersecretion has been poorly explored *in vitro*. First, we tested the effect of octreotide and

pasireotide (SOM230), two different-generation somatostatin analogues, on animal model (bovine chromaffin cells) by measuring catecholamine release either at the whole population level by the adrenolutine assay and mass spectrometry or at the single cell level by carbon fiber amperometry. Using these 3 methods, we have shown that the somatostatin analogue SOM230 efficiently inhibits the nicotine-evoked catecholamine secretion, whereas octreotide has no significant effect. In agreement with our observations, Ribeiro et al. reported that octreotide had no effect on 1-methyl-4-phenylpyridinium secretion from bovine chromaffin cells [50]. Moreover, the potential use of octreotide for Pheo treatment has been already investigated in clinic. Except for very few cases [51,52], octreotide treatment did not significantly affect catecholamine secretion. For example, octreotide treatment did not significantly change the level of plasma and urinary catecholamine or metanephrine compared to placebo treatment in several patients with benign or malignant Pheo [53,54]. Likewise, urinary catecholamine levels remained unchanged after octreotide treatment of patients with secreting head and neck paraganglioma [55].

As we observed an important inhibition of bovine chromaffin cells secretion by SOM230, we next tested this analogue on human tumor cells directly cultured from freshly resected Pheo. We show here that SOM230 inhibits catecholamine secretion of tumor cells with a significant effect starting from 0.1 μM. To our knowledge, this is the first evidence of an inhibitory effect of SOM230 on catecholamine secretion

from human Pheo cells. Nevertheless, in agreement with our observations, the effect of SOM230 on hormone secretion has been tested on various types of other tumor cells *in vitro*. For example, SOM230 efficiently inhibits prolactin, growth hormone and adrenocorticotrophic hormone secretion from primary cultures of human secreting pituitary adenomas [56,57]. It also significantly decreases secretion of chromogranin A in cells cultured from human gastroenteropancreatic NETs [20]. Moreover, Quinn et al. demonstrated *in vivo*, in a mouse model with insulinoma, that SOM230 injection inhibits hypersecretion of insulin thus preventing hypoglycemia [58].

Using carbon fiber amperometry, we have further dissected the anti-secretory effect of SOM230 on the exocytic pathway. The main effect observed after the application of 0.1 μM SOM230 was an important inhibition of the number of exocytic events on both bovine chromaffin cells (decreased by around 60%) and human tumor cells (decrease ranging from 42 to 88%; patients 5 to 8). Note that, due to the dilution factor, the effect seen with 0.1 μM in bath of SOM230 corresponds more or less to the one seen with 1 μM co-incubated with nicotine in the stimulation pipette. Accordingly, under the latter experimental condition, the number of exocytic events was reduced by SOM230 with a comparable efficiency (by 43 and 61% in patients 3 and 4, respectively and by 75% in average for bovine model). These results support the notion that SOM230 affects early steps in the exocytotic process, such as the recruitment of the secretory granules or their docking at the plasma membrane. Moreover, the analysis of the amperometric parameters revealed that the amplitude of the remaining exocytic events tends to be lower upon SOM230 treatment, an effect sometimes accompanied by a decrease of the kinetics. This suggests that, even when secretory granule fusion is engaged, the release might be disturbed, being incomplete and/or slowed down. To our knowledge, only a single study investigated the *in vitro* effect of SOM230 on tumor cells cultured from human Pheos. Hence, Pasquali et al. showed that a long-lasting (24 h) treatment of 0.1 and 1 μM SOM230 significantly decreased the intracellular content of dopamine and noradrenaline [28]. However, in contrast to our study, they didn't measure the secretory activity of the tumor cells. A reduction of cellular catecholamine levels can be the consequence of a decrease in the number of secretory granules and/or the level of catecholamines per granule. In our study, the total amount of catecholamines in cells remains unchanged which was expected because relatively short SOM230 treatments were performed. This indicates that the effect we observed on secretion is necessarily independent from its potential long-term effect on catecholamine metabolism. It is also of note that the inhibitory effect of SOM230 on catecholamine release was seen only when the drug was present during the stimulation period and a pre-incubation period did not significantly further increase this inhibition of secretion (data not shown). These data show that the effect of SOM230 is rapid and that a long pre-incubation is not required.

In our experimental conditions, we found that SOM230 drastically inhibited catecholamine secretion of tumor cells at 100 nM but not at 10 nM. Accordingly, inhibitory effects with similar concentrations have been previously observed in cells cultured from human cancer such as growth hormone-secreting pituitary adenoma and growth hormone-releasing hormone-producing bronchial carcinoid [59,60]. However, this concentration is relatively high compared to the IC_{50} (ranging from 0.2 to 1 nM) reported after long lasting treatment of SOM230 on the secretory activity of rat pituitary cells, rat pancreatic islets, mouse corticotroph adenoma cells and human pituitary adenoma cells [56,57,61,62], raising the question of the mechanisms by which SOM230 inhibits catecholamine secretion in human Pheo cells. As frequency and amplitude of exocytic events depend on the level of secretagogue-evoked intracellular calcium elevation [63,64], it was tempting to imagine that SOM230 might affect secretory granule exocytosis upstream of calcium entry. Indeed, we showed that SOM230 significantly inhibited nicotine-evoked increase of intracellular calcium in human tumor cells. One other interesting aspect is that SOM230 acts instantly and exclusively on secretion induced by nicotine without affecting secretion

induced by high K^+ solution. In agreement with our results, several studies demonstrated that somatostatin itself was able to inhibit catecholamine release when chromaffin cells are stimulated with nicotine or acetylcholine but not upon membrane depolarization [39,40,65,66]. In fact, we show here by whole cell recordings in the voltage-clamp mode that SOM230 is able to reduce the nicotinic current. Since membrane potential remains constant under these recording conditions, this effect most likely involves an effect on the function of nicotinic receptors and not on voltage-dependent Na^+ and Ca^{2+} channels. Accordingly, co-application of somatostatin with nicotine reversibly inhibits the nicotine-induced inward current in guinea pig chromaffin cells [67]. Whether SOM230 indirectly affects the function of the nicotinic receptor via its own somatostatin receptor or via a direct action on the nicotinic receptor is currently unknown. Interestingly, several evidences indicated that somatostatin receptors are able to either homo-oligomerize or to hetero-oligomerize between different subtypes of somatostatin receptors or with other types of receptor like the dopamine receptor D2 or the μ -opioid receptor MOR1 [68–72]. Potential oligomerization between somatostatin and nicotinic receptors has never been reported and will require further investigations.

This pre-clinical study allowed us to uncover a novel anti-secretory role of SOM230 on tumor adrenal medulla cells from patients with functional Pheo and abnormal secretion. If SOM230 treatment could actually improve the management of patients remains a key question that will require further clinical studies. As SOM230 efficiently inhibits catecholamine secretion by directly acting on the tumor secretion, it might be considered for preoperative medical preparation or intra-operative management of highly secreting Pheo. SOM230 might also be useful to treat some metastatic Pheos resistant to conventional antihypertensive medications, especially as high hormonal secretion impacts overall survival in patient with metastatic Pheo [73]. Moreover, as long lasting effect of SOM230 is known to reduce catecholamine synthesis in Pheo cells [28], treatment of patients may lead to a combination of reduced catecholamine synthesis and secretion which is in fact likely to boost the effect of SOM230 on lowering catecholamine levels in patients with Pheo.

In conclusion, a long-acting release formulation of SOM230 might be a potential lead to consider a therapy aimed at treating the symptoms induced by excessive catecholamine secretion of Pheo. This new data may be used to better control catecholamine hypersecretion when needed and should be evaluated in clinical practice.

Ethics approval and consent to participate

The present study used the data and the human biological material of the biological collection “Approche moléculaire des tumeurs corticosurrénales” which was agreed by the “Comité de Protection des Personnes Est III” ethical advisory committee, and was conducted according to currently accepted ethical guidelines, including informed written consent approval signed by all patients prior to inclusion.

Fundings and acknowledgements

This work was financially supported by ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences & Health) within the framework of the Cancer Plan to SG and LB (Single Cell 2018 N° 19CS004-00); by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (“SecretoNET”, N° ANR-16-CE17-0022-01) and from the Ligue contre le Cancer (CCIR Grand-Est) to SG; by the University of Strasbourg Institute for Advanced Study (USIAS) for a Fellowship to SG, within the French national programme “Investment for the future” (IdEx-Unistra); by a fellowship from la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; FDM201806005916) to SM. INSERM is providing salary to YG, NV and SG. We acknowledge the municipal slaughterhouse of Haguenau (France) for providing the bovine adrenal glands. The authors are also grateful to Dr. Nan Qin (University of

Dresden, Germany) for her advices on primary culture of human pheochromocytoma cells and to Tamou Thahouly and Alexander Wolf (INCI, CNRS, Strasbourg, France) for their technical assistance on bovine chromaffin cell culture.

CRedit authorship contribution statement

Laura Streit: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – review & editing. **Sophie Moog:** Investigation, Formal analysis. **Sylvain Hugel:** Investigation, Formal analysis, Methodology. **Marion Rame:** Investigation, Formal analysis. **Emeline Tanguy:** Investigation, Formal analysis, Writing – review & editing. **Virginie Andry:** Investigation, Formal analysis. **Herbert A. Schmid:** Resources, Methodology. **Laurent Brunaud:** Supervision, Resources, Funding acquisition, Methodology. **Florence Bihain:** Resources, Methodology. **Claire Nominé-Criqui:** Resources, Methodology. **Yannick Goumon:** Investigation, Formal analysis, Methodology. **Stéphanie Lacomme:** Investigation, Formal analysis, Data curation, Validation. **Sandra Lomazzi:** Investigation, Formal analysis, Data curation, Validation. **Michel Vix:** Resources, Methodology. **Didier Mutter:** Resources, Methodology. **Nicolas Vitale:** Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Validation, Writing – review & editing. **Stéphane Ory:** Conceptualization, Supervision, Validation, Writing – review & editing. **Stéphane Gasman:** Conceptualization, Supervision, Validation, Funding acquisition, Project administration, writing (original and review).

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

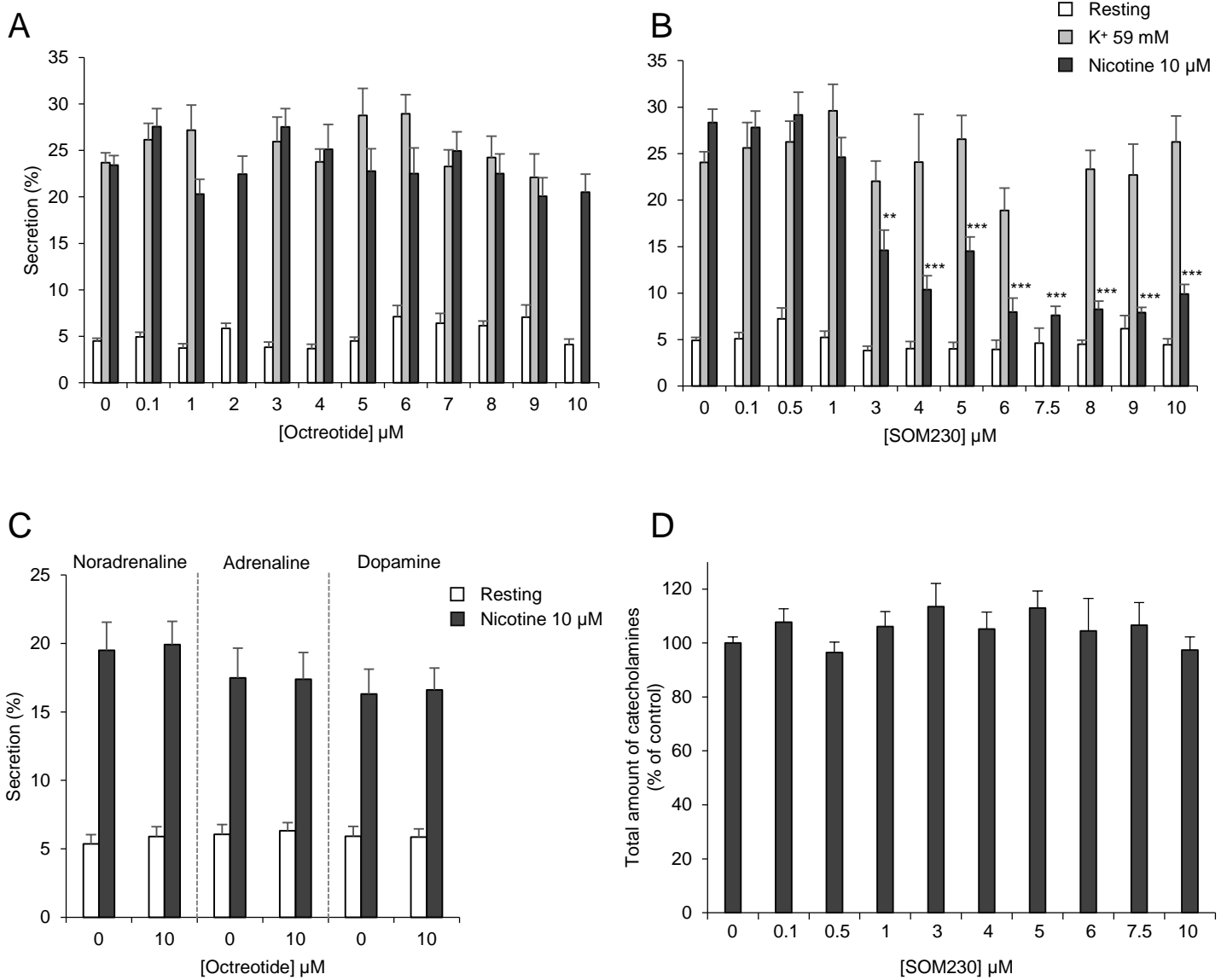
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.10.009>.

References

- [1] L. Streit, L. Brunaud, N. Vitale, S. Ory, S. Gasman, Hormones secretion and Rho GTPases in neuroendocrine tumors, *Cancers* 12 (2020).
- [2] D. Clement, J. Ramage, R. Srirajaskanthan, Update on pathophysiology, treatment, and complications of carcinoid syndrome, *J. Oncol.* 2020 (2020) 8341426.
- [3] W.T. Zandee, K. Kamp, R.C. van Adrichem, R.A. Feelders, W.W. de Herder, Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis, *Endocr. Relat. Cancer* 24 (2017) R261–R274.
- [4] B. Oronsky, P.C. Ma, D. Morgensztern, C.A. Carter, Nothing but net: a review of neuroendocrine tumors and carcinomas, *Neoplasia* 19 (2017) 991–1002.
- [5] A. Dasari, C. Shen, D. Halperin, B. Zhao, S. Zhou, Y. Xu, T. Shih, J.C. Yao, Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States, *JAMA Oncol* 3 (2017) 1335–1342.
- [6] D.M. Halperin, C. Shen, A. Dasari, Y. Xu, Y. Chu, S. Zhou, Y.T. Shih, J.C. Yao, Frequency of carcinoid syndrome at neuroendocrine tumour diagnosis: a population-based study, *Lancet Oncol.* 18 (2017) 525–534.
- [7] J.W.M. Lenders, M.N. Kerstens, L. Amar, A. Prejbisz, M. Robledo, D. Taieb, K. Pacak, J. Crona, T. Zelinka, M. Mannelli, T. Deutschbein, H. Timmers, F. Castinetti, H. Dralle, J. Widimsky, A.P. Gimenez-Roqueplo, G. Eisenhofer, Genetics, diagnosis, management and future directions of research of pheochromocytoma and paraganglioma: a position statement and consensus of the Working Group on Endocrine Hypertension of the European Society of Hypertension, *J. Hypertens.* 38 (2020) 1443–1456.
- [8] J.M. Pappachan, N.N. Tun, G. Arunagirinathan, R. Sodi, F.W.F. Hanna, Pheochromocytomas and hypertension, *Curr. Hypertens. Rep.* 20 (2018) 3.
- [9] M. Pourian, D.B. Mostafazadeh, A. Soltani, Does this patient have pheochromocytoma? A systematic review of clinical signs and symptoms, *J. Diabetes Metab. Disord.* 15 (2015) 11.
- [10] S. Y-Hassan, H. Falhammar, Cardiovascular manifestations and complications of pheochromocytomas and paragangliomas, *J. Clin. Med.* 9 (2020).
- [11] R. Zhang, D. Gupta, S.G. Albert, Pheochromocytoma as a reversible cause of cardiomyopathy: analysis and review of the literature, *Int. J. Cardiol.* 249 (2017) 319–323.
- [12] R.F. Stolk, C. Bakx, J. Mulder, H.J. Timmers, J.W. Lenders, Is the excess cardiovascular morbidity in pheochromocytoma related to blood pressure or to catecholamines? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98 (2013) 1100–1106.
- [13] A.R. McNeil, B.H. Blok, T.D. Koelmeyer, M.P. Burke, J.M. Hilton, Pheochromocytomas discovered during coronal autopsies in Sydney, Melbourne and Auckland, *Aust. N. Z. J. Med.* 30 (2000) 648–652.
- [14] J.K. Platts, P.J. Drew, J.N. Harvey, Death from pheochromocytoma: lessons from a post-mortem survey, *J. R. Coll Physicians Lond.* 29 (1995) 299–306.
- [15] A. Jain, R. Baracco, G. Kapur, Pheochromocytoma and paraganglioma—an update on diagnosis, evaluation, and management, *Pediatr. Nephrol.* 35 (2020) 581–594.
- [16] G. Lebuffe, E.D. Dosseh, G. Tek, H. Tytgat, S. Moreno, B. Tavernier, B. Vallet, C. A. Proye, The effect of calcium channel blockers on outcome following the surgical treatment of pheochromocytomas and paragangliomas, *Anaesthesia* 60 (2005) 439–444.
- [17] L. Brunaud, M. Boutami, P.L. Nguyen-Thi, B. Finnerty, A. Germain, G. Weryha, T. J. Fahey 3rd, E. Mirallie, L. Bresler, R. Zarnegar, Both preoperative alpha and calcium channel blockade impact intraoperative hemodynamic stability similarly in the management of pheochromocytoma, *Surgery* 156 (2014) 1410–1417, discussion1417–1418.
- [18] G. Mazziotti, A. Mosca, S. Frara, G. Vitale, A. Giustina, Somatostatin analogs in the treatment of neuroendocrine tumors: current and emerging aspects, *Expet Opin. Pharmacother.* 18 (2017) 1679–1689.
- [19] K. Oberg, S.W. Lamberts, Somatostatin analogues in acromegaly and gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: past, present and future, *Endocr. Relat. Cancer* 23 (2016) R551–R566.
- [20] A. Mohamed, M.P. Blanchard, M. Albertelli, F. Barbieri, T. Brue, P. Niccoli, J. R. Delpéro, G. Monges, S. Garcia, D. Ferone, T. Florio, A. Enjalbert, V. Moutardier, A. Schonbrunn, C. Gerard, A. Barlier, A. Saveanu, Pasireotide and octreotide antiproliferative effects and sst2 trafficking in human pancreatic neuroendocrine tumor cultures, *Endocr. Relat. Cancer* 21 (2014) 691–704.
- [21] M. Michael, R. Garcia-Carbonero, M.M. Weber, C. Lombard-Bohas, C. Toumpanakis, R.J. Hicks, The antiproliferative role of lanreotide in controlling growth of neuroendocrine tumors: a systematic review, *Oncol.* 22 (2017) 272–285.
- [22] H.A. Schmid, Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications, *Mol. Cell. Endocrinol.* 286 (2008) 69–74.
- [23] C. Susini, L. Buscail, Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents, *Ann. Oncol.* 17 (2006) 1733–1742.
- [24] D. Cuevas-Ramos, M. Fliseriu, Pasireotide: a novel treatment for patients with acromegaly, *Drug Des. Dev. Ther.* 10 (2016) 227–239.
- [25] R. Pivonello, R. Ferrigno, M.C. De Martino, C. Simeoli, N. Di Paola, C. Pivonello, L. Barba, M. Negri, C. De Angelis, A. Colao, Medical treatment of cushing’s disease: an overview of the current and recent clinical trials, *Front. Endocrinol.* 11 (2020) 648.
- [26] L.K. Kvols, K.E. Oberg, T.M. O’Dorisio, P. Mohideen, W.W. de Herder, R. Arnold, K. Hu, Y. Zhang, G. Hughes, L. Anthony, B. Wiedenmann, Pasireotide (SOM230) shows efficacy and tolerability in the treatment of patients with advanced neuroendocrine tumors refractory or resistant to octreotide LAR: results from a phase II study, *Endocr. Relat. Cancer* 19 (2012) 657–666.
- [27] H. Leijon, S. Remes, J. Hagstrom, J. Louhimo, H. Maenpaa, C. Schalin-Jantti, M. Miettinen, C. Haglund, J. Arola, Variable somatostatin receptor subtype expression in 151 primary pheochromocytomas and paragangliomas, *Hum. Pathol.* 86 (2019) 66–75.
- [28] D. Pasquali, V. Rossi, G. Conzo, G. Pannone, P. Bufò, A. De Bellis, A. Renzullo, G. Bellastella, A. Colao, G. Vallone, A. Bellastella, A.A. Sinisi, Effects of somatostatin analog SOM230 on cell proliferation, apoptosis, and catecholamine levels in cultured pheochromocytoma cells, *J. Mol. Endocrinol.* 40 (2008) 263–271.
- [29] J.W. Lenders, Q.Y. Duh, G. Eisenhofer, A.P. Gimenez-Roqueplo, S.K. Grebe, M. H. Murad, M. Naruse, K. Pacak, W.F. Young Jr., S. Endocrine, Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) 1915–1942.
- [30] R.A. Toledo, N. Burnichon, A. Cascon, D.E. Benn, J.P. Bayley, J. Welande, C. M. Tops, H. Firth, T. Dwight, T. Ercolino, M. Mannelli, G. Opocher, R. Clifton-Bligh, O. Gimm, E.R. Maher, M. Robledo, A.P. Gimenez-Roqueplo, P.L. Dahia, Consensus Statement on next-generation-sequencing-based diagnostic testing of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas, *Nat. Rev. Endocrinol.* 13 (2017) 233–247.
- [31] G. Eisenhofer, J.W. Lenders, D.S. Goldstein, M. Mannelli, G. Csako, M.M. Walther, F.M. Brouwers, K. Pacak, Pheochromocytoma catecholamine phenotypes and prediction of tumor size and location by use of plasma free metanephrines, *Clin. Chem.* 51 (2005) 735–744.
- [32] L.D. Thompson, 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 (2002) 551–566.
- [33] T. Thahouly, E. Tanguy, J. Raheirindratsara, M.F. Bader, S. Chasserot-Golaz, S. Gasman, N. Vitale, Bovine chromaffin cells: culture and fluorescence assay for secretion, *Methods Mol. Biol.* 2233 (2021) 169–179.
- [34] S. Moog, S. Houy, E. Chevalier, S. Ory, G. Weryha, M. Rame, M. Klein, L. Brunaud, S. Gasman, T. Cuny, 18F-FDOPA PET/CT uptake parameters correlate with catecholamine secretion in human pheochromocytomas, *Neuroendocrinology* 107 (2018) 228–236.
- [35] R.H. Liu, G. Foster, E.J. Cone, S.D. Kumar, Selecting an appropriate isotopic internal standard for gas chromatography/mass spectrometry analysis of drugs of abuse—pentobarbital example, *J. Forensic Sci.* 40 (1995) 983–989.
- [36] E. Tanguy, P. Coste de Bagneaux, N. Kassas, M.R. Ammar, Q. Wang, A.M. Haeberle, J. Raheirindratsara, L. Pouillon, P.Y. Renard, M. Montero-Hadjadje, S. Chasserot-

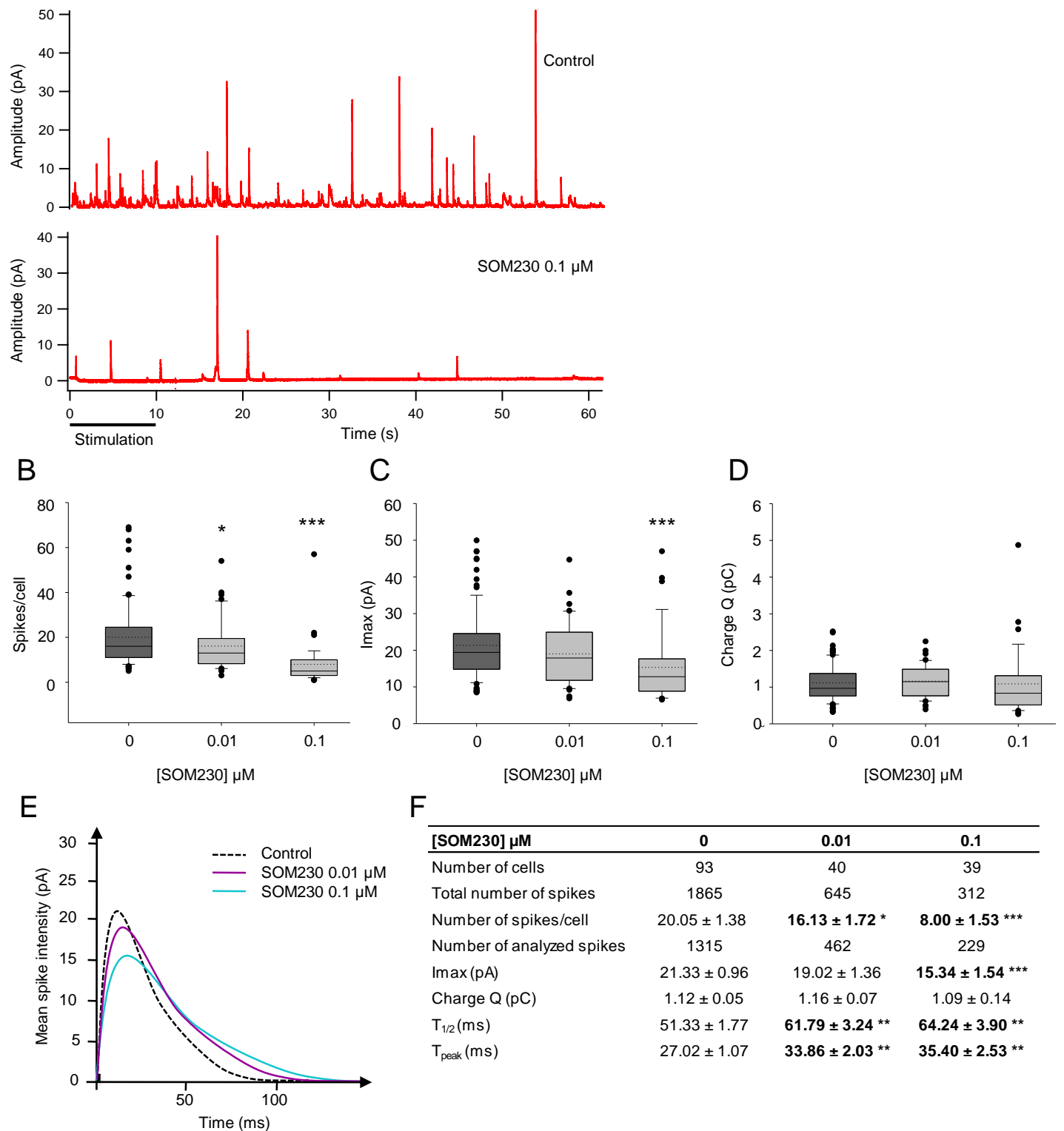
- Golaz, S. Ory, S. Gasman, M.F. Bader, N. Vitale, Mono- and poly-unsaturated phosphatidic acid regulate distinct steps of regulated exocytosis in neuroendocrine cells, *Cell Rep.* 32 (2020) 108026.
- [37] S. Houy, C. Estay-Ahumada, P. Croise, V. Calco, A.M. Haeberle, Y. Bailly, P. Billuart, N. Vitale, M.F. Bader, S. Ory, S. Gasman, Oligophrenin-1 connects exocytotic fusion to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells, *J. Neurosci.* 35 (2015) 11045–11055.
- [38] F. Segura, M.A. Brioso, J.F. Gomez, J.D. Machado, R. Borges, Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis, *J. Neurosci. Methods* 103 (2000) 151–156.
- [39] F. Mizobe, V. Kozousek, D.M. Dean, B.G. Livett, Pharmacological characterization of adrenal paraneurons: substance P and somatostatin as inhibitory modulators of the nicotinic response, *Brain Res.* 178 (1979) 555–566.
- [40] I. Moeller, S.J. Bunn, P.D. Marley, Actions of somatostatin on perfused bovine adrenal glands and cultured bovine adrenal medullary cells, *Brain Res.* 484 (1989) 192–202.
- [41] E.V. Mosharov, D. Sulzer, Analysis of exocytotic events recorded by amperometry, *Nat. Methods* 2 (2005) 651–658.
- [42] D.J. Keating, Amperometry in single cells and tissue, *Methods Mol. Biol.* 2233 (2021) 223–231.
- [43] S.H. Gerber, A. Haunstetter, C. Kruger, A. Kaufmann, R. Nobiling, M. Haass, Role of $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ in nicotine-induced norepinephrine release from bovine adrenal chromaffin cells, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) C572–C581.
- [44] C.C. Juhlin, S. Skoglund, L. Juntti-Berggren, M. Karlberg, J. Calissendorff, Non-functioning neuroendocrine pancreatic tumors transforming to malignant insulinomas - four cases and review of the literature, *Neuroendocrinol. Lett.* 40 (2019) 175–183.
- [45] P. Song, H.S. Sekhon, Y. Jia, J.A. Keller, J.K. Blusztajn, G.P. Mark, E.R. Spindel, Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 214–221.
- [46] R.L. Brown, T. Muzzafar, R. Wollman, R.E. Weiss, A pituitary carcinoma secreting TSH and prolactin: a non-secreting adenoma gone awry, *Eur. J. Endocrinol.* 154 (2006) 639–643.
- [47] T. Daems, J. Verhelst, A. Michotte, P. Abrams, D. De Ridder, R. Abs, Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas, *Pituitary* 12 (2009) 80–86.
- [48] U. Rai, T.R. Thrimawithana, C. Valery, S.A. Young, Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: current view and potential applications, *Pharmacol. Ther.* 152 (2015) 98–110.
- [49] A.K. Stueven, A. Kayser, C. Wetz, H. Amthauer, A. Wree, F. Tacke, B. Wiedenmann, C. Roderburg, H. Jann, Somatostatin analogues in the treatment of neuroendocrine tumors: past, present and future, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019).
- [50] L. Ribeiro, F. Martel, I. Azevedo, The release of 3H-1-methyl-4-phenylpyridinium from bovine adrenal chromaffin cells is modulated by somatostatin, *Regul. Pept.* 137 (2006) 107–113.
- [51] C. Invitti, I. De Martin, G.B. Bolla, F. Pecori Giraldi, E. Maestri, G. Leonetti, F. Cavagnini, Effect of octreotide on catecholamine plasma levels in patients with chromaffin cell tumors, *Horm. Res.* 40 (1993) 156–160.
- [52] N. Koriyama, M. Kakei, K. Yaekura, H. Okui, T. Yamashita, H. Nishimura, S. Matsushita, C. Tei, Control of catecholamine release and blood pressure with octreotide in a patient with pheochromocytoma: a case report with in vitro studies, *Horm. Res.* 53 (2000) 46–50.
- [53] P.F. Plouin, J. Bertherat, G. Chatellier, E. Billaud, M. Azizi, E. Grouzmann, J. Epelbaum, Short-term effects of octreotide on blood pressure and plasma catecholamines and neuropeptide Y levels in patients with pheochromocytoma: a placebo-controlled trial, *Clin. Endocrinol.* 42 (1995) 289–294.
- [54] M. Lamarre-Cliche, A.P. Gimenez-Roqueplo, E. Billaud, E. Baudin, J.P. Luton, P. F. Plouin, Effects of slow-release octreotide on urinary metanephrine excretion and plasma chromogranin A and catecholamine levels in patients with malignant or recurrent pheochromocytoma, *Clin. Endocrinol.* 57 (2002) 629–634.
- [55] L.T. van Hulsteyn, N. van Duinen, B.M. Verbist, J.C. Jansen, A.A. van der Klaauw, J.W. Smit, E.P. Corssmit, Effects of octreotide therapy in progressive head and neck paragangliomas: case series, *Head Neck* 35 (2013) E391–E396.
- [56] L.J. Hofland, J. van der Hoek, R. Feelders, M.O. van Aken, P.M. van Koetsveld, M. Waaijers, D. Sprij-Mooij, C. Bruns, G. Weckbecker, W.W. de Herder, A. Beckers, S.W. Lamberts, The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5, *Eur. J. Endocrinol.* 152 (2005) 645–654.
- [57] L.J. Hofland, J. van der Hoek, P.M. van Koetsveld, W.W. de Herder, M. Waaijers, D. Sprij-Mooij, C. Bruns, G. Weckbecker, R. Feelders, A.J. van der Lely, A. Beckers, S.W. Lamberts, The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 1577–1585.
- [58] T.J. Quinn, Z. Yuan, A. Adem, R. Geha, C. Vrikshajamani, W. Koba, E. Fine, D. T. Hughes, H.A. Schmid, S.K. Libutti, Pasireotide (SOM230) is effective for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) in a multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) conditional knockout mouse model, *Surgery* 152 (2012) 1068–1077.
- [59] A. Ibanez-Costa, E. Rivero-Cortes, M.C. Vazquez-Borrego, M.D. Gahete, L. Jimenez-Reina, E. Venegas-Moreno, A. de la Riva, M.A. Arraez, I. Gonzalez-Molero, H. A. Schmid, S. Maraver-Selfa, I. Gavilan-Villarejo, J.A. Garcia-Arnes, M.A. Japon, A. Soto-Moreno, M.A. Galvez, R.M. Luque, J.P. Castano, Octreotide and pasireotide (dis)similarly inhibit pituitary tumor cells in vitro, *J. Endocrinol.* 231 (2016) 135–145.
- [60] M. van Hoek, L.J. Hofland, Y.B. de Rijke, F.H. van Nederveen, R.R. de Krijger, P. M. van Koetsveld, S.W. Lamberts, A.J. van der Lely, W.W. de Herder, R.A. Feelders, Effects of somatostatin analogs on a growth hormone-releasing hormone secreting bronchial carcinoid, in vivo and in vitro studies, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94 (2009) 428–433.
- [61] C. Bruns, I. Lewis, U. Briner, G. Meno-Tetang, G. Weckbecker, SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile, *Eur. J. Endocrinol.* 146 (2002) 707–716.
- [62] E. Ludvigsen, M. Stridsberg, J.E. Taylor, M.D. Culler, K. Oberg, E.T. Janson, S. Sandler, Regulation of insulin and glucagon secretion from rat pancreatic islets in vitro by somatostatin analogues, *Regul. Pept.* 138 (2007) 1–9.
- [63] M. Bretou, C. Anne, F. Darchen, A fast mode of membrane fusion dependent on tight SNARE zippering, *J. Neurosci.* 28 (2008) 8470–8476.
- [64] A. Elhamdani, H.C. Palfrey, C.R. Artalejo, Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells, *Neuron* 31 (2001) 819–830.
- [65] L.W. Role, S.E. Leeman, R.L. Perlman, Somatostatin and substance P inhibit catecholamine secretion from isolated cells of Guinea-pig adrenal medulla, *Neuroscience* 6 (1981) 1813–1821.
- [66] B.G. Livett, P. Boksa, Receptors and receptor modulation in cultured chromaffin cells, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 62 (1984) 467–476.
- [67] M. Inoue, H. Kuriyama, Somatostatin inhibits the nicotinic receptor-activated inward current in Guinea pig chromaffin cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 (1991) 750–757.
- [68] M. Rocheville, D.C. Lange, U. Kumar, S.C. Patel, R.C. Patel, Y.C. Patel, Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity, *Science* 288 (2000) 154–157.
- [69] M. Grant, H. Alturaihi, P. Jaquet, B. Collier, U. Kumar, Cell growth inhibition and functioning of human somatostatin receptor type 2 are modulated by receptor heterodimerization, *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 2278–2292.
- [70] M. Pfeiffer, T. Koch, H. Schroder, M. Klutzy, S. Kirscht, H.J. Kreienkamp, V. Holtt, S. Schulz, Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A), *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 14027–14036.
- [71] M. Pfeiffer, T. Koch, H. Schroder, M. Lausch, V. Holtt, S. Schulz, Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19762–19772.
- [72] R.K. Somvanshi, S.A. War, N. Chaudhari, X. Qiu, U. Kumar, Receptor specific crosstalk and modulation of signaling upon heterodimerization between beta1-adrenergic receptor and somatostatin receptor-5, *Cell. Signal.* 23 (2011) 794–811.
- [73] S. Hescot, M. Curras-Freixes, T. Deutschbein, A. van Berkel, D. Vezzosi, L. Amar, C. de la Fouchardiere, N. Valdes, F. Riccardi, C. Do Cao, J. Bertherat, B. Goichot, F. Beuschlein, D. Drui, L. Canu, P. Niccoli, S. Laboureaux, A. Tabarin, S. Lebouleux, B. Calsina, R. Libe, A. Faggiano, M. Schlumberger, F. Borson-Chazot, M. Mannelli, A.P. Gimenez-Roqueplo, P. Caron, H. Timmers, M. Fassnacht, M. Robledo, I. Borget, E. Baudin, European network for the study of adrenal, prognosis of malignant pheochromocytoma and paraganglioma (MAPP-Prono study): a European network for the study of adrenal tumors retrospective study, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 104 (2019) 2367–2374.

Supplementary Figure 1



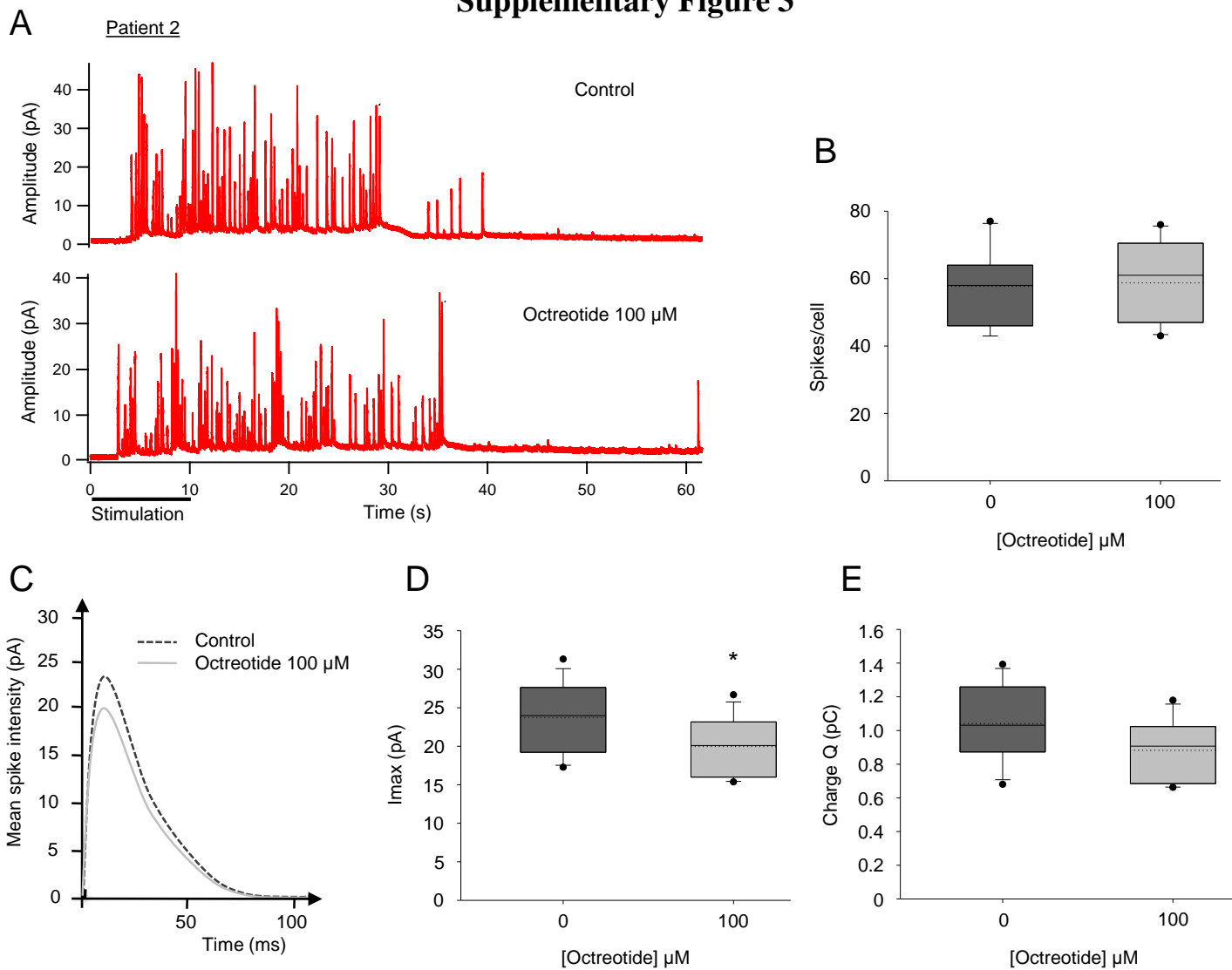
Supplementary Figure 1. Experimental details on the effect of octreotide and SOM230 on catecholamine secretion in bovine chromaffin cells. Bovine chromaffin cells were stimulated with 10 μM nicotine or with a high K⁺ depolarizing solution (59 mM) for 10 min in the presence of the indicated concentrations of octreotide or SOM230. Catecholamine amount was estimated using an adrenolutine fluorescent assay (a, b, d) or mass spectrometry (c). (a, b) Data describing the proportion of catecholamine secreted in resting and stimulated conditions upon treatment of octreotide and SOM230; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by Dunn's test or One Way ANOVA. Note that the effect of 2 and 10 μM octreotide and 7.5 μM SOM230 was not tested upon K⁺-stimulation. (c) Effect of 10 μM octreotide on noradrenaline, adrenaline and dopamine release measured by mass spectrometry. (d) Catecholamines were measured both in the extracellular medium and in the cellular extract after stimulation. The total amount of catecholamines in bovine chromaffin cells was calculated from the adrenolutine secretion assay by adding secreted and cellular catecholamines. For each concentration of SOM230, the amounts of total catecholamines were normalized to control (untreated cells) which was fixed to 100%. Data are given as the mean values \pm SEM obtained from different cell cultures ($n \geq 3$).

Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. SOM230 in the culture medium affects different parameters of individual exocytotic events in single adrenal bovine chromaffin cells. Bovine chromaffin cells were stimulated with a local application of 100 μM nicotine for 10 s and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. (a) Example of a typical amperometric recording obtained from an untreated cell (control) or a cell treated with 0.1 μM SOM230 in bath solution. (b) Box-and-whisker diagram illustrating the number of amperometric spikes per cell. Each plot represents the 1st quartile (bottom line), the median (line in the box), the mean (dotted line in the box) and the third quartile (upper line). Whiskers correspond to the 5th (bottom) and the 95th (top) percentile and black dots represent outlier observations; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test. (c, d) Increasing concentration of SOM230 significantly affects the spike amplitude (I_{max} ; (c)) but not the quantal size (Charge Q; (d)); *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test. (e) The effect of SOM230 on spike shape is illustrated by superimposing average spikes according to cell treatment. (f) Table with all the average amperometric data; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test.

Supplementary Figure 3



F

[Octreotide] μM	0	100
Number of cells	15	13
Total number of spikes	866	764
Number of spikes/cell	57.73 ± 2.76	58.77 ± 3.35
Number of analyzed spikes	400	396
I_{max} (pA)	23.72 ± 1.15	19.97 ± 1.06 *
Charge Q (pC)	1.04 ± 0.06	0.88 ± 0.05
$T_{1/2}$ (ms)	39.65 ± 0.89	39.04 ± 1.01
T_{peak} (ms)	30.66 ± 0.84	30.38 ± 0.91

Supplementary Figure 3. Octreotide does not affect catecholamine secretion of human pheochromocytoma cells.

Pheochromocytoma cells were stimulated with a local application of 100 μM nicotine for 10 s and catecholamine secretion was monitored using carbon fiber amperometry. (a) Example of a typical amperometric recording obtained from an untreated cell (control) or a cell treated with 100 μM octreotide in pipette (patient 2). (b) Box-and-whisker diagrams illustrate the number of amperometric spikes per cell. Each plot represents the 1st quartile (bottom line), the median (line in the box), the mean (dotted line in the box) and the third quartile (upper line). Whiskers correspond to the 5th (bottom) and the 95th (top) percentile and black dots represent outlier observations. (c) The effect of octreotide on spike shape is illustrated by superimposing average spikes according to cell treatment. (d, e) Octreotide significantly affects the spike amplitude (I_{max} ; (d)) but not the quantal size (Charge Q; (e)); * $p < 0.05$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test. (f) Table with all the average amperometric data; * $p < 0.05$ compared to control; Mann Whitney Rank Sum test.

Supplementary Table S1

Elution gradient.

Time (min)	0	2.5	9	11	12	12.5	18
% B mobile phase	0	0	20	98	98	0	0

Detail of MS analysis conditions.

Mode	positive
Spray voltage	3,500 V
Nebulizer gas	Nitrogen
Desolvation (nitrogen) sheath gas	18 Arb
Aux gas	7 Arb
Ion transfer tube temperature	297°C
Vaporizer temperature	131°C
Q1 and Q2 resolutions	0.7 FWHM
Collision gas (CID, argon) pressure	2 mTorr

Supplementary Table S2

Mass spectrometer ionization, selection, fragmentation, and identification parameters.

Compound	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	RF Lens (V)
Dopamine	positive	324.14	116.11	54.24	206
			145.11	33.36	
			171.05	23.90	
D4-Dopamine	positive	328.14	116.11	55.00	206
			128.05	48.67	
			171	20.76	
Adrenaline	positive	354.11	166.04	18.09	179
			171.06	27.69	
			184.04	14.60	
D6-Adrenaline	positive	360.17	171.06	27.19	184
			172.04	18.65	
			190.04	14.35	
Noradrenaline	positive	340.15	116.11	55.00	215
			145.11	36.19	
			171.06	24.61	
C6-Noradrenaline	positive	346.15	145.11	36.04	226
			158.11	18.34	
			171.06	25.62	

**DISCUSSION GÉNÉRALE
ET RÉSULTATS
COMPLÉMENTAIRES**

DISCUSSION GÉNÉRALE ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

1. Critique méthodologique

1.1. Les modèles utilisés

Le modèle d'étude privilégié pendant ma thèse a été le phéochromocytome (PHEO) humain. Bien que cette tumeur soit relativement rare chaque patient mérite d'avoir la meilleure prise en charge possible de sa pathologie. Il apparaît ainsi indispensable de mieux comprendre les origines de l'hypersécrétion et de trouver un traitement anti-sécrétoire du PHEO. La principale force de nos études vient de l'utilisation d'échantillons de PHEO humains pour une grande partie de nos expériences (ampérométrie à fibre de carbone, électrophysiologie, crible protéomique). L'utilisation de cultures primaires humaines réalisées directement à partir de la tumeur nous permet, contrairement à l'utilisation de lignées cellulaires, de nous approcher des conditions physiologiques et de prendre en compte des variations inter-patients qui sont retrouvées lors des études cliniques. En effet, nos études incluent des sujets de différents sexes et âges présentant différents niveaux d'hypersécrétion tumorale associés à des symptômes plus ou moins intenses. Nous avons également inclus des patients dont le PHEO a été diagnostiqué comme d'origine mutationnelle. Le statut génétique est un critère important à considérer puisqu'on estime aujourd'hui qu'environ 40% des tumeurs proviendraient d'une mutation dans la lignée germinale (Buffet *et al.*, 2020). L'utilisation de PHEO humain nous a donc permis d'inclure une hétérogénéité qui existe entre chaque patient. L'inconvénient majeur de ce modèle est la quantité de tumeurs disponibles puisque nous dépendons du planning opératoire des hôpitaux. Or le PHEO est une tumeur rare, ce qui a limité le nombre d'échantillons disponibles pour mes expériences et ainsi le nombre de patients inclus dans les études. Un autre inconvénient provient de la mise en culture. En effet, la quantité de cellules obtenues est très variable d'une culture à l'autre. On pourrait imaginer que cela dépend de la taille de la tumeur mais je n'ai observé aucune corrélation. Enfin, j'ai régulièrement eu des difficultés à stimuler la sécrétion des cellules chromaffines tumorales. J'ai utilisé classiquement une concentration de nicotine de 100 μM dans la pipette de stimulation. Peu de données sont disponibles dans la littérature quant au couplage stimulation-sécrétion

des cellules chromaffines humaines. L'équipe du Dr. Albillos (Alicante, Espagne) utilise jusqu'à 300 μM d'acétylcholine avec un système de perfusion très rapide pour stimuler ces cellules (Hone *et al.*, 2017). Je n'ai jamais testé l'acétylcholine mais quelques fois, en augmentant la concentration de nicotine (de 300 μM à 1 mM), j'ai pu obtenir plus de réponses. Malheureusement, cela n'a souvent pas été suffisant pour obtenir un nombre robuste de cellules répondantes et des résultats exploitables. Une variabilité de la sécrétion des cellules chromaffines humaines en réponse à l'acétylcholine a déjà été montrée (Jaques *and* Tobes, 1986). Ces différences de réponse à la stimulation peuvent venir soit de la qualité de la culture, soit du fait qu'il s'agisse de tumeurs hétérogènes avec des phénotypes sécrétoires propres à chaque patient. Un nouveau mode de stimulation avec de la nicotine cagée est en train d'être mis en place au laboratoire, afin d'avoir un meilleur contrôle spatial et temporel lors de la stimulation des cellules. La nicotine cagée placée dans le milieu des cellules pourra être décagée grâce à un flash lumineux à un temps et une localisation précise sur la cellule. Cet outil nous permettra de nous affranchir de la dilution du sécrétagogue et d'une variabilité du placement de la pipette de stimulation (Filevich *et al.*, 2010).

Le second modèle que j'ai employé est la culture primaire de cellules chromaffines bovines, qui m'a permis de réaliser les courbes doses-réponses des analogues de la somatostatine et de déterminer une gamme de concentrations à tester sur le PHEO. Les cellules chromaffines bovines ont l'avantage d'exprimer les récepteurs nicotiques $\alpha 3\beta 4$ que l'on retrouve également majoritairement sur les cellules chromaffines de la glande médullosurrénale humaine (Hone *et al.*, 2015; Criado, 2018). Le modèle bovin présente également plusieurs avantages techniques. La partie médullaire de la glande surrénale est facilement dissociable de la partie corticale ce qui facilite la culture et améliore les rendements. De plus, il permet d'obtenir une grande quantité de cellules pour effectuer des expériences de biochimie comme le dosage fluorimétrique des catécholamines.

1.2. La sécrétion mesurée sur des cellules en culture primaire est-elle le reflet de la sécrétion tumorale ?

L'utilisation de cultures cellulaires constitue une approche utile et efficace pour tester des drogues, mettre en évidence des mécanismes ou découvrir de nouvelles fonctions. Cependant, je suis consciente que les données *in vitro* ne peuvent pas être extrapolées directement à la physiologie, que ce soit dans un contexte sain ou pathologique. Il faut donc rester prudent quant à l'interprétation des données, et se questionner sur les limites des techniques et approches qui sont employées.

Une fois en culture les cellules tumorales conservent-elles les mêmes capacités sécrétoires qu'*in vivo* ? Plusieurs études ont ainsi mis en évidence que la quantité de catécholamines diminue au cours du temps dans les cultures de PHEO, et ce malgré l'utilisation de différents milieux pour tenter de prévenir cette baisse (Tischler *et al.*, 1984; Jaques *and* Tobes, 1986). De même, les changements de milieux impactent les taux de catécholamines (Finnegan *et al.*, 1996). Ces changements de taux de noradrénaline et d'adrénaline pour les PHEO en culture pourrait impacter notre mesure ampérométrique. Dans notre protocole nous utilisons les cellules chromaffines tumorales dans un délai de 48h en moyenne (parfois 72h au maximum) après la mise en culture, or les changements décrits précédemment sont observés à partir de 3-4 jours. De même notre mode de culture cellulaire en 2D ne pourrait-il pas impacter la sécrétion que nous enregistrons ? En effet, en mettant les cellules de PHEO en culture nous perdons les interactions inter-cellulaires et avec le microenvironnement tumoral. Une étude a ainsi comparé une culture en 2D à une culture en 3D de lignées humaines de tumeurs neuroendocrines (TNE) pancréatiques, et a montré de meilleurs effets des drogues en culture 3D (Herrera-Martínez *et al.*, 2019). Pourrait-on envisager de tester nos drogues dans une modèle de culture en 3D du PHEO ? De façon intéressante, l'utilisation de sphéroïdes générés à partir d'une lignée cellulaire de PHEO de souris (MTT) a permis d'évaluer l'effet de molécules sur la migration et la croissance tumorale (Bechmann *et al.*, 2018). Il serait intéressant d'évaluer l'effet des analogues de la somatostatine sur des cultures de PHEO en 3D, afin d'inclure ces interactions inter-cellulaires et le microenvironnement tumoral. Néanmoins, ce mode de culture ne me semble pas compatible avec l'utilisation de l'ampérométrie à fibre de carbone qui requière la

présence de cellules isolées. Nous pourrions envisager de mesurer la sécrétion des catécholamines avec une autre méthode telle que l'ELISA.

On peut également s'interroger sur l'impact de la technique d'ampérométrie à fibre de carbone : quels sont les avantages et les inconvénients de cette technique pour mesurer la sécrétion des cellules chromaffines ? L'ampérométrie à fibre de carbone permet de mesurer la sécrétion des catécholamines sur cellule unique, et nécessite ainsi un rendement de culture faible. L'utilisation d'un nombre restreint de cellules convient parfaitement à notre modèle d'étude qu'est le PHEO, puisque je ne récupère qu'une petite partie de la tumeur après exérèse chez le patient. De plus, la mesure de la sécrétion sur cellule unique m'a permis de montrer que l'hypersécrétion des PHEO provient probablement d'un dérèglement à l'échelle unicellulaire, et ne peut pas être simplement attribuée à un effet de masse de la tumeur. Enfin, cette technique donne accès à des mesures précises de la cinétique des événements d'exocytose.

L'ampérométrie à fibre de carbone repose sur l'oxydation des catécholamines qui vont chacune libérer des électrons qui sont ensuite détectés par la fibre de carbone (Mosharov *and* Sulzer, 2005). Cependant, l'oxydation électrochimique des catéchols produit également des dérivés de quinone et des protons. En conséquence, à moins que des mécanismes spécifiques puissent être adoptés par la cellule pour réguler le pH près de sa membrane, le pH local entre la membrane cellulaire et l'électrode chute dans la fente électrode/cellule. Lors de la stimulation, une grande quantité de catécholamines est libérée générant beaucoup de protons, le pH pouvant ainsi chuter à des valeurs en dessous de 6 dans la fente électrode/cellule (Amatore *et al.*, 2010).

Je me suis ensuite demandée si le nombre d'évènements d'exocytose que je mesure peut être mis en lien avec la sécrétion tumorale en clinique. De façon intéressante, une étude du laboratoire s'est intéressée à la corrélation entre des paramètres de diagnostic mesurés en imagerie nucléaire (PET/CT : *positron emission tomography/computed tomography*) par le ^{18}F -FDOPA et la sécrétion des PHEO. Une corrélation positive et significative a été montrée entre la radioactivité maximale (SUVmax) mesurée dans la tumeur et le nombre de pics enregistrés en ampérométrie. Ces résultats suggèrent que plus le nombre d'évènements

d'exocytose est élevé, plus la tumeur va absorber le traceur, conduisant à des valeurs de SUVmax élevées. Il existerait donc bien des corrélations entre les données ampérométriques mesurées *in vitro* et le comportement de la tumeur *in vivo*. Malheureusement le taux d'incorporation du ^{18}F -FDOPA n'a pu être corrélé aux taux de métanéphrines et normétanéphrines (Moog *et al.*, 2018). Dans nos études nous n'avons pas trouvé de lien évident entre le nombre d'évènements d'exocytose enregistrés et la sécrétion de catécholamines des PHEO. Un frein important à la mise en évidence de corrélation est le nombre limité de patients, ainsi que le nombre important de paramètres cliniques et biochimiques manquants pour chaque sujet. Il serait intéressant de recruter une cohorte plus importante de patients présentant des données biochimiques et cliniques complètes.

2. L'hypersécrétion tumorale : quels mécanismes possibles ?

Quelle est l'origine de l'hypersécrétion dans les PHEO ? Une des premières idées qui vient à l'esprit est que l'hypersécrétion pourrait simplement être la conséquence d'un effet de masse. En effet, la prolifération cellulaire importante au cours du développement tumoral accroît significativement le nombre de cellules chromaffines tumorales. Est-ce que cette augmentation de la masse cellulaire va forcément entraîner une sécrétion plus importante ? Pour cela, il faudrait qu'une même stimulation de la glande surrénale recrute plus de cellules chromaffines. À ma connaissance aucune donnée n'est disponible dans la littérature à ce sujet. D'un point de vue purement cellulaire, plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour tenter d'expliquer l'hypersécrétion des PHEO. Une fuite de catécholamines vers la voie de l'exocytose constitutive pourrait engendrer une sécrétion excessive et surtout non régulée. Une granulogénèse accrue augmentant significativement le nombre de granules dans les cellules, ou bien simplement une augmentation de la quantité de catécholamines par granule pourraient contribuer à une sécrétion plus importante des PHEO. Enfin, on peut aisément penser qu'un dérèglement d'une des étapes tardives de l'exocytose (recrutement, accostage, arrimage, amorçage, fusion) pourrait aboutir à une plus grande libération de catécholamines.

Afin de vérifier qu'il n'y a pas une libération de catécholamines due à la voie d'exocytose constitutive, j'ai mesuré la sécrétion par ampérométrie à fibre de carbone sur des cellules chromaffines de PHEO sans les stimuler. Je n'ai jamais détecté de sécrétion, tandis que des pics ampérométriques apparaissaient dès que je stimulais ces cellules (résultats non publiés). Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de libération spontanée de catécholamines par les cellules tumorales et donc qu'il n'y a pas de fuite vers la voie d'exocytose constitutive. L'analyse protéomique réalisée sur des tissus de PHEO en comparaison au tissu non tumoral indique une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs granulaires dans les PHEO. On ne peut pas exclure à ce stade qu'il n'y ait pas une augmentation de la granulogénèse dans les cellules tumorales. Une analyse en microscopie électronique de la densité des granules dans les cellules de PHEO est en cours dans l'équipe. Grâce à l'ampérométrie à fibre de carbone, j'ai montré qu'une cellule chromaffine tumorale présente une capacité sécrétrice plus importante, avec une augmentation très significative du nombre d'évènements d'exocytose par rapport à une cellule chromaffine non tumorale. Ces données sont intéressantes car elles montrent dans un premier temps que la sécrétion est augmentée au niveau unicellulaire, ce qui n'est pas en faveur d'un simple effet de masse dû à la prolifération cellulaire. Dans un second temps, cela suggère bien un dérèglement du contrôle de la sécrétion par la cellule. De plus, en analysant les paramètres des évènements d'exocytose, j'ai observé pour de nombreux patients une cinétique de libération accélérée suggérant que la sécrétion se faisait plus rapidement. Ainsi, pour une même stimulation, une cellule chromaffine tumorale sécrèterait une quantité plus importante de catécholamines en sollicitant plus de granules et en accélérant leur exocytose.

Reste à découvrir quelle(s) étape(s) et quel(s) acteur(s) de l'exocytose pourraient être impliqués dans la dérégulation de la sécrétion des PHEO. Une analyse par spectrométrie de masse réalisée par l'entreprise Caprion (Montréal, Canada) en collaboration avec l'équipe a permis de générer une liste de protéines potentiellement impliquées dans l'exocytose et dont l'expression est modifiée dans les PHEO en comparaison au tissu non tumoral. Plusieurs protéines granulaires telles que les chromogranines A et B (CGA, CGB), les sécrétogranines 2 et 3 (SCG2, SCG3) sont surexprimées dans les PHEO. À noter qu'une augmentation de la CGA plasmatique est retrouvée chez 90% des patients atteints de phéochromocytomes ou

de paragangliomes (PPGL), et a conduit à son utilisation pour le diagnostic de cette tumeur (Stridsberg *and* Husebye, 1997; Grossrubatscher *et al.*, 2006). La CGB n'est pas utilisée en diagnostic, néanmoins sa concentration plasmatique est élevée chez 81% des patients atteints de PHEO (Stridsberg *and* Husebye, 1997). Parmi les protéines les plus augmentées dans le PHEO sont retrouvées des enzymes impliquées dans la synthèse et le traitement des composés granulaires (dopamine- β -hydroxylase (D β H), les convertases neuroendocrines (PCSK), peptidylglycine α -amidating monooxygenase (PAM),...), suggérant une dérégulation ces voies.

Notre analyse protéomique a également mis en évidence une augmentation de plusieurs régulateurs de l'exocytose comme des protéines qui composent ou qui régulent le complexe SNARE, des protéines qui régulent l'organisation du cytosquelette d'actine ou encore certains régulateurs clés du processus d'exocytose. Parmi les régulateurs impactés dans le PHEO on retrouve notamment des GTPase. Par exemple, notre étude montre que la protéine Rab4A est augmentée de plus de 9 fois dans la condition tumorale. De façon intéressante, Rab4A semble impliquée dans la sécrétion de procathepsine (une pro-enzyme) conférant un phénotype tumoral agressif et métastatique dans le mélanome. L'expression de Rab4A est corrélée avec la quantité de procathepsine sécrétée, et l'inhibition de cette GTPase diminue la sécrétion tumorale de 80% (Barbarin *and* Frade, 2011). Dans notre étude nous avons également montré que les deux isoformes Rab27A et Rab27B sont surexprimées dans les PHEO. Des données de la littérature montrent que la surexpression de Rab27A engendre une augmentation de la sécrétion de *prostate-specific antigen* (PSA) et de *prostatic-specific acid phosphatase* (PSAP) dans une lignée de carcinome de la prostate (LNCaP) (Johnson *et al.*, 2005). De la même façon, la surexpression de Rab27A favorise la sécrétion d'*insulin-like growth factor-II* (IGF-II) ce qui confère un phénotype invasif et métastatique à des cellules de cancer du sein (Wang *et al.*, 2008). Enfin, la surexpression d'un mutant inactif de Rab27B dans une lignée de tumeur pituitaire (AtT20) inhibe la sécrétion d'ACTH des cellules (Zhao *et al.*, 2002). Ces deux exemples montrent que des protéines régulatrices de l'exocytose comme les GTPases semblent jouer un rôle dans le processus de contrôle de la sécrétion tumorale. Nous avons montré qu'un grand nombre de protéines sont impactées dans les PHEO, suggérant une dérégulation de différentes étapes et processus de l'exocytose. De façon intéressante, une étude sur des PHEO

d'origine génétique (VHL et MEN2) a montré des variations d'expression de nombreuses protéines de l'exocytose entre ces deux conditions. Ces résultats suggèrent que l'origine génétique et le phénotype sécrétoire sont à l'origine de signatures protéiques distinctes (Eisenhofer *et al.*, 2008).

Nos résultats montrent que l'expression de protéines impliquées dans l'exocytose ainsi qu'un certain nombre de régulateurs est modifiée dans les PHEO, renforçant l'hypothèse d'une dérégulation de ce processus de sécrétion. Ces variations d'expressions pourraient peut-être expliquer le dérèglement de la sécrétion des PHEO. Il serait intéressant de confirmer le rôle de certaines de ces protéines dans la sécrétion des PHEO en utilisant par exemple des approches de siRNA ou de surexpression dans les cellules PC12 (PHEO de rat) et de suivre la capacité sécrétrice des cellules.

Comme nous l'avons vu, l'hypersécrétion est un véritable problème pour les patients puisqu'elle engendre de nombreux symptômes, il apparaît donc crucial de la freiner.

3. Effet fonctionnel des analogues de la somatostatine

3.1. Octréotide et SOM230, un impact différent sur la sécrétion catécholaminergique

Le premier constat que j'observe est la différence de résultats obtenus entre l'octréotide (OCT) et le SOM230. En effet, contrairement au traitement par le SOM230, un traitement par l'OCT ne modifie pas l'activité sécrétrice des cellules chromaffines bovines et tumorales quelles que soient les concentrations. J'ai tenté d'incuber les cellules chromaffines bovines avec de l'OCT pendant un temps plus long, jusqu'à 24h, mais je n'ai observé aucun effet inhibiteur. Ces résultats sont en accord avec la plupart des données de la littérature. Pour exemple, les travaux de Ribeiro et collaborateurs en 2006 démontrent qu'à des concentrations de 1 et 10 μM l'OCT n'a pas d'effet sur la sécrétion de cellules chromaffines de bœuf (Ribeiro *et al.*, 2006). *In vivo*, l'administration d'OCT aux patients atteints de PHEO ne semble pas améliorer les symptômes et ne modifie pas la quantité de catécholamines urinaires et plasmatiques (Plouin *et al.*, 1995). De même, chez des patients porteurs de PHEO malin/récurrent ou de paragangliome (PGL) en progression, l'injection d'OCT n'a pas

ou très peu d'effet sur les concentrations de catécholamines (Kopf *et al.*, 1997; Lamarre-Cliche *et al.*, 2002; van Hulsteijn *et al.*, 2013). Quelques cas dans la littérature ont néanmoins rapporté un effet inhibiteur de l'OCT sur des tumeurs issues des cellules chromaffines. Ainsi, une perfusion de 2h d'OCT à 6 patients atteints de PPGL permet de diminuer le taux de noradrénaline. Néanmoins les valeurs remontent au seuil initial dès que la perfusion est arrêtée (Invitti *et al.*, 1993). Un patient atteint de PHEO dont la sécrétion est incontrôlable par d'autres thérapies et un patient porteur de PGL présentent également une diminution du taux de catécholamines suite à l'injection d'OCT (Koriyama *et al.*, 2000; Elshafie *et al.*, 2014). Néanmoins ces études portent sur un nombre très restreint de patients.

Concernant l'effet du SOM230, une seule étude publiée a utilisé cette molécule sur des cellules chromaffines tumorales. Dans cet article, les auteurs proposent qu'un traitement prolongé (24h) des cellules de PHEO humain par le SOM230 diminuerait la quantité de catécholamines stockées dans les cellules de PHEO (Pasquali *et al.*, 2008). Il est difficile de comparer ces données aux nôtres étant donné que nos conditions expérimentales sont très différentes. En effet dans mes protocoles, soit le SOM230 est libéré en puff pendant 10 s et agit donc très rapidement, soit il est présent en bain dans le milieu cellulaire pendant 1h maximum. Au cours de mes expériences avec les cellules de PHEO, j'ai pu observer une diminution de la charge Q des pics ampérométriques sur 2 cultures seulement (patients 1 et 5). Cependant, il est difficile d'imaginer qu'en quelques secondes le SOM230 puisse agir sur la concentration catécholaminergique des granules. Une hypothèse serait que, pour certains patients, un traitement des cellules par le SOM230 favoriserait des événements de sécrétion partiels.

Le SOM230 possède donc un effet inhibiteur sur la sécrétion de catécholamines tandis que l'OCT non. Qu'est ce qui pourrait expliquer cette différence d'effet entre les deux molécules ? On sait que les affinités de ces deux analogues pour les récepteurs à la somatostatine (SSTR) sont différentes. L'OCT a une affinité préférentielle pour le SSTR2, tandis que le SSTR5 est la cible privilégiée du SOM230. À noter que le SOM230 possède une affinité 30, 5 et 40 fois plus élevée pour les SSTR1, SSTR3 et SSTR5 respectivement en comparaison à l'OCT (Schmid,

2008). La première explication pourrait donc venir de l'expression de récepteurs à la somatostatine sur les cellules chromaffines tumorales et bovines.

Dans les échantillons de PHEO, la détection des ARNm par RT-PCR montre que le SSTR2 est largement exprimé, car retrouvé pour tous les patients, sa quantification révèle que le SSTR2 possède la plus forte expression en comparaison aux autres SSTR. Concernant le SSTR5, son ARNm est détecté dans tous les échantillons par Pasquali et collaborateurs, tandis que Saveanu et son équipe n'ont retrouvé le SSTR5 que dans 54% des tumeurs et avec une expression faible. Ces derniers rapportent en revanche une expression de l'ARNm des SSTR1 et SSTR3 dans 95% et 56% des échantillons respectivement (*Pasquali et al., 2008; Saveanu et al., 2011*). Le marquage des SSTR par immunohistochimie montre au contraire une expression majoritaire du SSTR3 dans les échantillons de PHEO (*Mundschenk et al., 2003; Unger et al., 2008; Leijon et al., 2019*). Les SSTR2A et SSTR5 sont ensuite détectés dans 15 à 30% des tumeurs par deux études (*Mundschenk et al., 2003; Unger et al., 2008*), tandis que Leijon et collaborateurs révèlent une expression du SSTR2 dans 75% des échantillons tumoraux (*Leijon et al., 2019*). Il existe donc une grande hétérogénéité quant à l'expression des SSTR par les PHEO (**Tableau 9**). De plus les échantillons utilisés sont variables entre les études puisque certaines distinguent les PHEO des PGL ou bien les tumeurs bénignes des tumeurs malignes, tandis que d'autres regroupent ces catégories. Or, Leijon et son équipe ont montré qu'il existe des différences d'expression des SSTR entre les PHEO/PGL et les tumeurs bénignes/malignes (*Leijon et al., 2019*). L'hétérogénéité tumorale et les différentes sources de variabilités (échantillons, techniques, anticorps, critères de positivité...) peuvent expliquer l'absence de consensus clair sur l'expression majoritaire des SSTR.

Dans les cellules chromaffines bovines, la présence des SSTR a été suggérée uniquement sur la base des effets fonctionnels obtenus avec la somatostatine (SST) (*Boksa et al., 1982; Ribeiro et al., 2007*). Aucun marquage immunologique n'a été réalisé à ce jour. Grâce à l'utilisation de deux anticorps dirigés contre les SSTR2 et SSTR5, les deux isoformes présentant une forte affinité pour l'octréotide et le SOM230 respectivement, j'ai ainsi pu démontrer une expression du SSTR2 dans les cellules chromaffines bovines et les cellules chromaffines humaines de PHEO. En

revanche, bien que je détecte parfaitement l'expression du SSTR5 dans les cellules de PHEO, je ne détecte aucun signal dans les cellules chromaffines bovines (**Figure 14**). Il n'existe cependant pas d'anticorps dirigé spécifiquement contre le récepteur SSTR5 de bœuf. En recherchant la séquence peptidique contre laquelle l'anticorps anti-SSTR5 était dirigé, je me suis aperçue que 60% des acides aminés reconnus par l'anticorps étaient différents chez le bovin, ce qui est largement suffisant pour empêcher la reconnaissance de la forme bovine du récepteur. Du fait de l'absence de spécificité de l'anticorps pour cette espèce, il n'est donc pas possible de conclure sur l'expression du SSTR5 chez le bœuf. Nous n'avons donc pas pu comparer l'expression des SSTR les uns par rapport aux autres. L'analyse de banques de données de gènes a montré une identité de 50 à 60% entre les différents SSTR bovins et humains (Moaeen-ud-Din *and* Yang, 2009). Sur nos deux modèles il est donc difficile de conclure sur l'expression prédominante d'un SSTR.

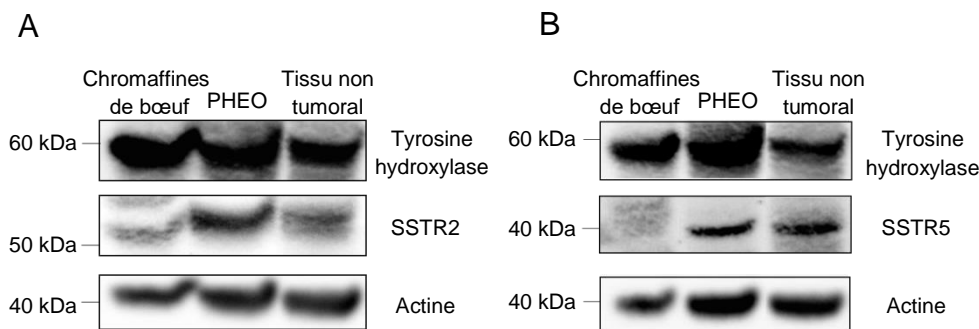


Figure 14 : Détection par Western-blot des récepteurs SSTR2 et SSTR5 dans les cellules chromaffines bovines, le phéochromocytome humain et du tissu médullosurrénalien non tumoral. A-B. Images de la révélation par chimioluminescence d'une membrane de Western-blot après marquage du SSTR2 (A) ou du SSTR5 (B) par un anticorps primaire de lapin lui-même détecté par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort. La tyrosine hydroxylase (TH), marqueur des cellules chromaffines, a également été révélée.

Dans la littérature d'autres études ont rapporté des différences d'effets entre l'OCT et le SOM230 sur la sécrétion des TNE. *In vitro*, l'analyse de la sécrétion d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) provenant d'adénomes pituitaires a donné des résultats variables en fonction des études. Dans les deux études évaluant le potentiel anti-sécrétoire de l'OCT et du SOM230, Ibáñez-Costa et collaborateurs montrent un rôle anti-sécrétoire de l'OCT uniquement tandis que Hofland et son équipe proposent un rôle frénateur du SOM230 (Hofland *et al.*, 2005; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016). En revanche, la sécrétion de prolactine (PRL) de ces adénomes est plus efficacement inhibée par le SOM230 (Hofland *et al.*, 2004a; Gatto *et al.*, 2017). *In vivo*, l'utilisation

de souris développant des adénomes pituitaires montre que la sécrétion de PRL est diminuée uniquement par une forte dose de SOM230 tandis qu'un traitement par l'OCT est sans effet (Fedele *et al.*, 2007). Ces divergences d'effets pourraient-elles être en lien avec l'expression des SSTR, notamment les SSTR2 et SSTR5, sur ces tumeurs ? L'ARNm du SSTR5 a été montré comme prédominant dans les adénomes pituitaires sécrétant de l'ACTH, pourtant une étude a montré un effet inhibiteur de l'OCT et l'autre du SOM230 (Hofland *et al.*, 2005; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016). En revanche, sur un modèle de souris porteuses d'adénomes pituitaires, l'ARNm du SSTR2 est majoritaire et 100 fois plus important que le SSTR5, et l'étude a rapporté un effet inhibiteur du SOM230 et aucun effet de l'OCT (Fedele *et al.*, 2007). Il a été montré que l'efficacité anti-sécrétoire de l'OCT et du SOM230 est corrélée positivement avec le taux d'ARNm du SSTR2, mais pas du SSTR5, sur des adénomes pituitaires humains sécrétant de l'hormone de croissance (GH) (Hofland *et al.*, 2004a; Gatto *et al.*, 2017). Néanmoins, dans ces études c'est le niveau d'ARNm qui est évalué et non l'expression de la protéine. De façon intéressante, une étude a montré que la réponse au SOM230 chez des patients atteints d'adénomes sécrétants de la GH est dépendante de l'expression du SSTR2 mais pas du SSTR5. Après 24 semaines de traitement une corrélation positive entre la réponse hormonale et la quantité de la protéine SSTR2 a été trouvée : plus le SSTR2 était exprimé dans l'échantillon tumoral plus la diminution de la sécrétion était importante. En revanche aucune corrélation n'a été montrée avec l'expression du SSTR5 (Muhammad *et al.*, 2019).

Ces corrélations sont en adéquation avec l'affinité préférentielle de l'OCT pour le SSTR2. En revanche, dans ces tumeurs, l'effet anti-sécrétoire du SOM230 ne semble pas dépendre du SSTR5 qui est pourtant son récepteur préférentiel. Dans les PHEO il n'existe pas de consensus clair sur l'expression majoritaire d'un sous-type de SSTR, néanmoins l'ARNm ou la protéine des SSTR2, SSTR3 et SSTR5 semblent retrouvés le plus fréquemment (**Tableau 9**). Le SOM230 se fixe respectivement avec 30, 5, et 40 fois plus d'affinité aux SSTR1, SSTR3 et SSTR5 que l'OCT tandis que ce dernier ne se fixe qu'avec 2,5 fois plus d'affinité au SSTR2 que le SOM230 (Schmid, 2008). On peut imaginer que l'affinité préférentielle de l'OCT pour le SSTR2 et sa moindre affinité pour les autres récepteurs ne lui permettent pas d'exercer un effet anti-sécrétoire sur les cellules chromaffines contrairement au SOM230.

3.2. Mode d'action du SOM230

Au fur et à mesure des expériences, j'ai commencé à m'interroger sur le mode d'action par lequel le SOM230 pouvait inhiber la sécrétion. En effet, le SOM230 inhibe exclusivement la sécrétion induite par une stimulation nicotinique, alors que je n'observe aucun effet quand la sécrétion est déclenchée par une solution dépolarisante de potassium. De manière intéressante, des auteurs ont fait la même constatation mais en utilisant de la SST. En effet, ils démontrent que la SST inhibe la sécrétion de cellules chromaffines bovines ou de cobaye uniquement avec une solution de nicotine ou d'acétylcholine, tandis que l'utilisation du potassium et d'autres sécrétagogues tels que la pilocarpine (agoniste muscarinique), l'histamine ou l'angiotensine n'ont pas d'effet (Mizobe *et al.*, 1979; Role *et al.*, 1981; Livett *and* Boksa, 1984; Moeller *et al.*, 1989).

Nous avons montré que le SOM230 est capable de diminuer l'amplitude des courants nicotiques. Une des hypothèses soulevées par ces données serait que l'action frénatrice du SOM230 pourrait s'exercer via le récepteur nicotinique. Certaines données de la littérature obtenues avec la SST semblent corroborer cette hypothèse. Plusieurs auteurs ont suggéré que la SST pourrait agir comme un modulateur du récepteur nicotinique notamment en impactant sa désensibilisation (Mizobe *et al.*, 1979; Ribeiro *et al.*, 2006). De façon intéressante, l'incubation de cellules chromaffines de cobaye avec de la SST a pour effet de diminuer les courants nicotiques de façon dose dépendante et réversible. Les auteurs montrent également que la SST facilite la désensibilisation du récepteur (Inoue *and* Kuriyama, 1991).

La question est maintenant de savoir par quel(s) mécanisme(s) le SOM230 agirait-il sur le récepteur nicotinique ? Une hypothèse possible est que le SOM230 pourrait être un antagoniste du récepteur nicotinique. Pour tester cette possibilité j'ai testé différentes doses de SOM230 sur les cellules chromaffines bovines. Pour chaque dose d'analogue, j'ai fait varier la concentration de nicotine lors de la stimulation avant de mesurer la sécrétion des catécholamines par dosage fluorimétrique. Les courbes doses-réponses obtenues et leurs déplacements me permettent de déterminer si le SOM230 est un antagoniste compétitif ou non compétitif du récepteur nicotinique.

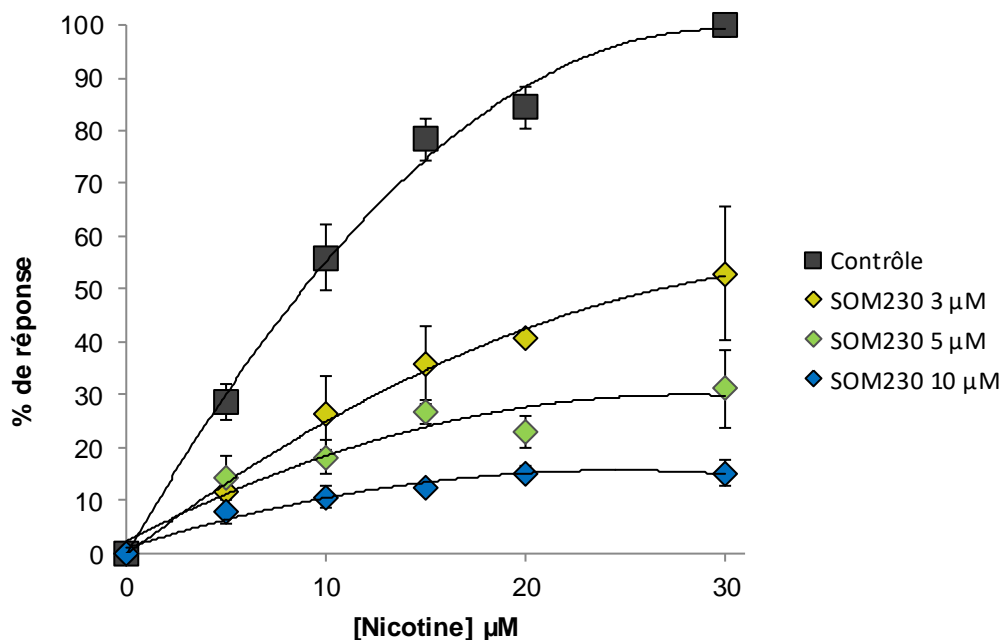


Figure 15 : Courbe dose-réponse de l'antagonisme du SOM230 sur le récepteur nicotinique.

Les cellules chromaffines bovines sont stimulées 10 min en présence de doses croissantes de nicotine et avec différentes concentrations de SOM230 afin de suivre le déplacement des courbes. La libération de catécholamines est estimée à l'aide d'un test fluorescent d'adrénolutine. La libération basale a été soustraite pour obtenir la sécrétion nette de catécholamines. Pour chaque concentration d'analogue, la sécrétion a été normalisée à son contrôle (cellules non traitées), les résultats sont présentés en % de réponse. La condition contrôle stimulée avec 30 μM de nicotine représente la réponse maximale de 100%. Les données sont données sous forme de valeurs moyennes \pm SEM.

Pour la condition contrôle on observe que plus la concentration de nicotine augmente, plus la sécrétion augmente (% de réponse) jusqu'à atteindre un plateau. Les courbes obtenues avec les doses inhibitrices de SOM230 présentent un décalage vers le bas par rapport à la courbe contrôle, et l'effet maximal n'est plus atteint malgré une augmentation des concentrations de nicotine. Ces profils se rapprochent d'un antagoniste non compétitif et m'amènent à penser que le SOM230 se fixerait sur un autre site que le site actif du récepteur nicotinique. Il pourrait alors entraîner une modification de sa structure, empêchant la nicotine de s'y fixer. Il est connu que le récepteur nicotinique possède des sites de fixations pour des antagonistes compétitifs, non compétitifs, des modulateurs allostériques ainsi que des bloqueurs de canaux. Ainsi, plusieurs drogues (mécamylamine, hexaméthonium, chlorisondamine) sont déjà connues pour être des antagonistes non compétitifs du récepteur nicotinique de type neuronal, qui est celui retrouvé dans la glande surrénale.

Quelles autres hypothèses peuvent être envisagées ? À ce stade nous ne pouvons pas exclure totalement qu'au moins une partie de l'effet du SOM230 passe par son propre récepteur à la somatostatine. Les SSTR sont des récepteurs couplés aux protéines G qui pourraient activer une cascade de signalisation aboutissant à l'inhibition du récepteur nicotinique. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de tester l'effet du SOM230 sur les courants nicotiques en présence ou en absence des récepteurs à la somatostatine en utilisant un système d'expression hétérologue tel que l'ovocyte de Xénope. De façon intéressante des auteurs ont exprimé un ou des SSTR dans ce modèle (White *and* Reisine, 1990; Kreienkamp *et al.*, 1998). Néanmoins cette expérience est complexe du fait du nombre important de sous-types de récepteurs à la somatostatine. Afin de déterminer si le SOM230 exerce son action exclusivement via le récepteur nicotinique ou en partie via ses propres récepteurs, j'ai réalisé des expériences de sécrétion en utilisant un antagoniste des SSTR (cycloSST). Je souhaitais voir si le SOM230 conservait son effet inhibiteur sur la sécrétion des catécholamines en bloquant les SSTR. Dans ce cas nous aurions montré que l'action du SOM230 passe uniquement par le récepteur nicotinique. Malheureusement l'utilisation de cette drogue s'est avérée inefficace car, à certaines doses, elle avait elle-même un effet inhibiteur sur la sécrétion, et en utilisant des doses trop faibles je n'étais pas certaine de bloquer tous les récepteurs, ni tous les sous-types. De façon intéressante cette expérience a été menée par un autre laboratoire avec la SST sur des cellules chromaffines bovines. Les auteurs ont montré que l'utilisation du cycloSST permettait de reverser l'effet inhibiteur de la SST, sous tendant que l'action inhibitrice de la SST passerait par ses propres récepteurs somatostatinerigiques (Ribeiro *et al.*, 2007). Dans cette étude la dose de cycloSST utilisée était 10 fois supérieure à celle de la SST, condition qu'il ne m'était pas possible de reproduire avec le SOM230. Néanmoins, du fait des différences structurales et d'affinité entre la SST et le SOM230, il est possible que l'effet inhibiteur observé sur la sécrétion des catécholamines ne passe pas par les mêmes récepteurs (**Tableau 8**).

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence que les SSTR sont capables de former des homo- ou des hétéro-oligomères entre les sous-types de SSTR ou avec d'autres récepteurs couplés aux protéines G. Par exemple, le SSTR5 peut former des dimères avec les SSTR1 et SSTR3, mais pas avec le SSTR4 (Rocheville *et al.*,

2000b; Pfeiffer *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2008). De façon intéressante, le SSTR5 peut former des hétéromères avec le récepteur à la dopamine D2 pour créer un nouveau récepteur avec une pharmacologie différente puisque l'affinité à la dopamine et ses agonistes est modifiée (Rocheville *et al.*, 2000a). L'interaction entre le SSTR2A et le récepteur μ opioïde 1 quant à elle modifie le trafic des récepteurs puisque la phosphorylation, l'internalisation et la désensibilisation des récepteurs sont affectés. En revanche, la fixation des ligands n'est pas affectée (Pfeiffer *et al.*, 2002). Une oligomérisation potentielle entre les SSTR et les récepteurs nicotiques n'a jamais été rapportée et serait, selon moi, très intéressante à étudier.

4. Le SOM230 : vers les prémices d'un traitement de l'hypersécrétion ?

4.1. Dose utilisée

Dans notre étude nous avons démontré pour la première fois que le SOM230 a un effet inhibiteur sur la sécrétion de catécholamines de cellules chromaffines bovines et tumorales humaines *in vitro*. Il est donc tentant d'imaginer l'utilisation du SOM230 comme un potentiel traitement anti-sécrétoire pour cette tumeur. Si l'on réfléchit en termes d'application clinique potentielle du SOM230 pour le PHEO, que révèlent nos données ?

En utilisant les cellules chromaffines bovines j'ai déterminé une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) de 2,64 μ M pour le SOM230. Dans la littérature, l'utilisation de modèles de sécrétion tels que les cellules pancréatiques et pituitaires de rats ont montré un effet inhibiteur de cette drogue à partir de concentrations de l'ordre du nM (Bruns *et al.*, 2002; Ludvigsen *et al.*, 2007). De la même façon, l'incubation de SOM230 sur des lignées ou cultures primaires tumorales a montré un effet anti-sécrétoire à partir de 1 nM voire à des doses plus faibles, avec des CI_{50} de 0,06 à 0,5 nM (Hofland *et al.*, 2004b, 2005; van der Hoek *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2006; Mariniello *et al.*, 2011; Murasawa *et al.*, 2014). La CI_{50} que nous avons déterminée est donc bien supérieure à celles retrouvées dans la littérature. Mes résultats se rapprochent en revanche de ceux obtenus avec la SST, puisqu'un effet anti-sécrétoire sur les cellules chromaffines est obtenu avec des concentrations de l'ordre du μ M (Mizobe *et al.*, 1979; Boksa *et al.*, 1982; Livett and Boksa, 1984). Une CI_{50} d'environ 2 μ M a été calculée par Role et collaborateurs (Role *et al.*, 1981). Grâce à

l'ampérométrie à fibre de carbone, nous avons ensuite montré que le SOM230 inhibe significativement la sécrétion de cellules bovines et de PHEO humains à partir de 0,1 μM , abaissant ainsi la concentration utilisée. En accord avec mes résultats, des études sur des tumeurs humaines ont montré que le SOM230 avait un effet inhibiteur à 0,1 μM (van Hoek *et al.*, 2009; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016). La seule étude menée sur le PHEO humain a montré un effet du SOM230 à partir de 0,1 μM sur l'apoptose et la quantité de catécholamines intracellulaires (Pasquali *et al.*, 2008). Dans la plupart des études, les cellules ont été incubées pendant plusieurs heures et jusqu'à 96h. L'incubation de cellules chromaffines bovines pendant 24 et 48h avec du SOM230 ne m'a pas permis de montrer un effet à de plus faibles doses (résultats non montrés).

La question centrale est maintenant de savoir si l'on peut envisager une application clinique pour le PHEO ? Actuellement le SOM230 est utilisé dans le traitement de deux TNE pituitaires : la première hypersécrète de l'ACTH, entraînant une augmentation de la sécrétion de cortisol par la glande surrénale, et ainsi un hypercortisolisme à l'origine de la maladie de Cushing (Pivonello *et al.*, 2020), tandis que la seconde libère un excès de GH à l'origine d'acromégalie (Cuevas-Ramos and Fleseriu, 2016). On peut donc envisager que l'application clinique du SOM230 soit étendue à une autre TNE. Mais est-ce compatible en termes de dose chez l'Homme ?

Deux formulations ont été évaluées en clinique pour le SOM230, une à courte durée d'action dont les injections sont requises plusieurs fois par jour en sous-cutanée (s.c), et une à longue durée d'action injectée une fois par mois en intramusculaire (i.m). Les taux circulants de SOM230 après son injection ont été mesurés dans plusieurs études. Les concentrations plasmatiques minimum (C_{\min}) et maximum (C_{\max}) de SOM230 ont été mesurées chez des patients atteints de TNE avancées, réfractaires à l'OCT et traités avec 150 à 1200 μg (s.c) de SOM230. Une C_{\min} de 1,4 ng/mL a été obtenue à la suite de l'injection de 150 μg de SOM230, tandis que la C_{\max} était de 74 ng/mL avec 1200 μg de SOM230. Chez les patients répondant au traitement, la concentration plasmatique effective médiane était de 10 ng/mL (Kvols *et al.*, 2012). Dans une seconde étude, des patients atteints de TNE gastro-entéro-pancréatiques (GEP) résistants à l'OCT ou au lanréotide ont été traités

avec le SOM230 à longue durée d'action. Les sujets ont reçu des doses de 20, 40 ou 60 mg de l'analogue en i.m une fois/mois pendant 3 mois. 24h après l'injection de 20 et 60 mg de SOM230, la C_{max} était de 4,5 et 7 ng/mL respectivement, tandis qu'après 3 mois de traitement la C_{max} était de 5,5 et 25 ng/mL pour chacune des doses (Wolin *et al.*, 2013). Enfin, l'injection de SOM230 à des volontaires sains a montré des concentrations plasmatiques circulantes proches des études précédentes, de 10 à 40 ng/mL (Dietrich *et al.*, 2012; Petersenn *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014).

Ces données montrent que les doses circulantes de SOM230 après injection sont variables en fonction des doses, des voies d'injections et des délais considérés. Mes résultats montrent un effet inhibiteur du SOM230 sur la sécrétion des PHEO à partir de 0,1 μ M soit 143 ng/mL. Dans les études les doses circulantes de SOM230 se situent entre 10 et 40 ng/mL environ. Kvols et collaborateurs ont déterminé une concentration effectrice médiane de 10 ng/mL, soit 14 fois plus faible que la dose que j'ai déterminée. Cependant, nous ne pouvons pas prévoir la dose à laquelle le SOM230 pourrait exercer son action anti-sécrétoire *in vivo* s'il était injecté à des patients atteints de PHEO. Mes résultats ont permis de montrer pour la première fois que le SOM230 pourrait être considéré comme un potentiel traitement anti-sécrétoire pour le PHEO, et permettent d'ouvrir des perspectives pour d'éventuelles études cliniques.

4.2. Effet anti-sécrétoire du SOM230 en clinique

Mes résultats démontrent un effet inhibiteur du SOM230 sur la sécrétion catécholaminergique du PHEO. Ces résultats sont en accord avec l'efficacité de cette molécule qui a été démontrée en clinique chez l'Homme. 17 études cliniques utilisant le SOM230 en diagnostic ou en thérapeutique sur des TNE sont recensées sur le site de référence « *clinical trials* » (<https://www.clinicaltrials.gov/>), dont une douzaine sont achevées.

Le SOM230 est actuellement utilisé pour traiter la maladie de Cushing, une tumeur pituitaire hypersécrétant de l'ACTH. Le SOM230 diminue le taux de cortisol, d'ACTH et la taille de la tumeur, améliorant ainsi les symptômes des patients (Pivonello *et al.*, 2020). Cette efficacité anti-tumorale a amené les scientifiques à tester le SOM230 sur d'autres TNE. Après 6 mois de traitement par le SOM230, 21%

des patients souffrant de TNE gastro-intestinales métastatiques incontrôlées par d'autres analogues de la somatostatine présentent un contrôle de leurs symptômes (Wolin *et al.*, 2015). Une proportion similaire est retrouvée par Kvols et collaborateurs. Des marqueurs de sécrétion comme la chromogranine A (CGA) ou l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA) diminuent rapidement après l'injection de SOM230, et une stabilisation de la pathologie est enregistrée chez 57% des patients (Kvols *et al.*, 2012). Une stabilisation est également enregistrée chez 60% des sujets atteints de TNE métastatiques, avec une réduction du taux de CGA pour 44% d'entre eux (Cives *et al.*, 2015). Les administrations de SOM230 à des patients porteurs de TNE de la thyroïde permettent de diminuer les taux sanguins de la calcitonine et de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) chez 26% et 10% des sujets respectivement (Faggiano *et al.*, 2018).

Plusieurs études cliniques se sont également intéressées à l'acromégalie, une TNE de la glande pituitaire, traitée également par l'OCT. Néanmoins, environ 50% des sujets sont partiellement répondeurs ou résistants aux analogues de première génération (Freda, 2002; Gola *et al.*, 2006). L'injection de SOM230 pendant 3 mois à des patients acromégales normalise le taux de GH pour 27% d'entre eux (Petersenn *et al.*, 2010). Une extension de 6 mois de l'étude montre que la proportion de patients avec un contrôle biochimique reste identique (Petersenn *et al.*, 2014b). En accord avec les données précédentes, une 3^{ème} étude a montré que 18% des patients présentent un contrôle des marqueurs biochimiques après traitement au SOM230 (Tahara *et al.*, 2017). Une étude a rapporté que 51% et 57% des patients présentent respectivement des taux normaux de GH et IGF-1 après traitement au SOM230 ; ce taux est plus élevé que celui retrouvé dans les études précédentes (Petersenn *et al.*, 2014a). Enfin, pour des patients résistants aux autres analogues, 50% d'entre eux ont une diminution des marqueurs suite au traitement avec le SOM230 (Shimon *et al.*, 2018; Colao *et al.*, 2020).

Mes résultats obtenus sur le PHEO humain sont donc en adéquation avec de nombreuses études qui ont montré un effet anti-sécrétoire du SOM230 sur plusieurs TNE. En bloquant la libération catécholaminergique du PHEO, on peut aisément imaginer que le SOM230 serait capable de réduire les symptômes liés à l'hypersécrétion. Mais l'inhibition de la sécrétion des catécholamines pourrait-elle également impacter le développement tumoral ?

4.3. Effet pro-tumoral des catécholamines et molécules sécrétées par les phéochromocytomes

Les données de la littérature suggèrent que la sécrétion tumorale pourrait influencer le développement des tumeurs par leur action autocrine et/ou paracrine. Par exemple, le carcinome pulmonaire à petites cellules, une tumeur très agressive, est capable de synthétiser et sécréter de l'acétylcholine qui se fixe sur les récepteurs cholinergiques de la tumeur, stimulant sa propre croissance tumorale (Song *et al.*, 2003). Le même mode d'action auto-stimulant a été mis en évidence pour la bombésine et ses peptides associés (Cuttitta *et al.*, 1985). En conséquence, ces cellules sécrètent divers neuropeptides et facteurs de croissance qui, par leur action locale, accélèrent dramatiquement leur propre caractère invasif. On peut ainsi se demander si la sécrétion catécholaminergique des PHEO pourrait impacter la croissance tumorale ? Au laboratoire, une doctorante a tenté de mettre en évidence l'impact potentiel de l'activité sécrétrice de cellules de PHEO sur l'initiation et le développement tumoral. Pour se faire elle a réalisé des expériences de xénogreffes de cellules de phéochromocytome de rat (PC12) sur des souris nude immunodéficientes. La croissance des tumeurs induites par la lignée originale de PC12 a été comparée à la croissance induite par les clones PC12 C-27 et A35C, deux variants spontanés caractérisés par une perte de leurs capacités sécrétrices due à la répression transcriptionnelle, par le facteur REST (*RE-1 silencing transcription factor*) de plusieurs gènes impliqués dans le processus d'exocytose régulé (Corradi *et al.*, 1996; Pance *et al.*, 1999; D'Alessandro *et al.*, 2008). De façon intéressante, les résultats ont montré que le développement et l'initiation de la tumeur dérivant des clones C-27 et A35C sont fortement ralentis par rapport à la croissance induite par les PC12 sauvages (Croisé P, thèse, Université de Strasbourg, 2015). De même, une corrélation entre l'activité sécrétrice et le

développement tumoral a été établie : plus la sécrétion des cellules greffées est élevée, plus le délai d'initiation de la tumeur est court et son développement rapide. Ces résultats suggèrent que l'hypersécrétion des PHEO pourrait accélérer leur initiation et leur développement. Cependant, le modèle des cellules PC12 exprimant REST n'est pas idéal car il a été montré que ce facteur de transcription est responsable de la variation d'une grande diversité de gènes (Grundschober *et al.*, 2002). Il serait intéressant d'utiliser un modèle de lignée de PHEO dépourvu exclusivement de la voie de sécrétion régulée par le calcium. L'équipe y réfléchit depuis de nombreuses années.

Plusieurs études ont montré que les taux de produits de dégradation des catécholamines (méтанéphrines, normétanéphrines) urinaires ou plasmatiques, étaient corrélés positivement au diamètre tumoral chez des patients atteints de PHEO (Stenström *and* Waldenström, 1985; Eisenhofer *et al.*, 2005; Amar *et al.*, 2006). La même corrélation a été établie pour l'acide vanylmandélique (VMA) urinaire, métabolite terminal de la dégradation des catécholamines (Farndon *et al.*, 1980; Stenström *and* Waldenström, 1985). Enfin, pour des patients atteints de PHEO malins, le diamètre tumoral et les taux de méтанéphrines et normétanéphrines urinaires sont plus élevés que pour des patients porteurs de PHEO bénins, et ce taux est corrélé significativement avec le temps, suggérant une augmentation exponentielle de l'activité tumorale (Amar *et al.*, 2006). Il a également été établi que l'adrénaline et la noradrénaline jouent un rôle dans l'angiogenèse tumorale en activant des facteurs pro-angiogéniques (Chakroborty *et al.*, 2009). La noradrénaline peut ainsi stimuler le potentiel agressif de cellules tumorales de mélanomes en induisant la production de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), d'interleukine 6 et d'interleukine 8 (Yang *et al.*, 2009). L'augmentation du taux sanguin d'adrénaline, quant à elle, est assimilée à une faible survie chez des patients atteints de cancer pancréatiques et promeut la migration tumorale (Pu *et al.*, 2017).

En plus des catécholamines, d'autres molécules pourraient avoir un rôle sur le développement tumoral. Par exemple, le neuropeptide Y (NPY) et son récepteur sont retrouvés en abondance chez les patients atteints de PHEO. Les données de la littérature montrent que ce peptide aurait un rôle autocrine sur la production et la sécrétion des catécholamines, néanmoins toutes les études ne s'accordent pas sur

une action stimulatrice ou inhibitrice (Thouennon *et al.*, 2010). En revanche, le NPY peut potentiellement augmenter la croissance tumorale des PHEO via son effet angiogénique (Kitlinska, 2007). Le PACAP (*pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*), un autre neuropeptide exprimé dans les PHEO exercerait des effets trophiques et anti-apoptotiques sur les cellules tumorales et augmenterait la biosynthèse et la sécrétion de catécholamines et d'autres peptides trophiques (Thouennon *et al.*, 2010). Enfin, l'adrénomodulline exerce un effet anti-apoptotique sur des cellules de PHEO, notamment via le récepteur RDC1 qui est surexprimé dans le PHEO et dans de nombreuses tumeurs (Thouennon *et al.*, 2010; Thouennon *et al.*, 2010). D'autres peptides tels que les peptides natriurétique et opioïdes semblent également impliqués dans la sécrétion et/ou la tumorigenèse des PHEO, néanmoins leurs rôles ne sont pas toujours clairement établis.

Ces molécules libérées en même temps que les catécholamines auraient donc des rôles potentiels dans le développement et le devenir tumoral des PHEO, notamment via des actions autocrines. L'inhibition de la sécrétion apparaît donc d'autant plus cruciale puisqu'en plus de stopper l'action des catécholamines, d'autres molécules verraient leur potentiel tumoral contrecarré.

4.4. Le SOM230 une molécule aux multiples actions anti-tumorale

En plus de son rôle frénateur sur la sécrétion, le SOM230 a des effets inhibiteurs sur la croissance, la prolifération et la viabilité tumorale, des propriétés très recherchées en cancérologie. Le SOM230 inhibe efficacement la prolifération et la croissance des cellules d'adénomes pituitaires à l'origine de la maladie de Cushing (Batista *et al.*, 2006; Treppiedi *et al.*, 2019), ainsi que des cellules de carcinomes médullaires de la thyroïde (Giardino *et al.*, 2021). Le SOM230 réduit également la viabilité de TNE-GEP et d'adénomes pituitaires (Mohamed *et al.*, 2014; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016). Enfin, l'utilisation de SOM230 sur des adénomes pituitaires non fonctionnels a donné des résultats variables. Une étude montre une réduction de la viabilité pour le groupe répondant à cette molécule, tandis qu'aucun effet n'est rapporté dans la seconde étude (Zatelli *et al.*, 2007; Ibáñez-Costa *et al.*, 2016). L'effet sur la viabilité cellulaire du SOM230 est dû à son potentiel pro-apoptotique. En effet, le SOM230 est connu pour augmenter l'activité des caspases 3/7 dans différentes TNE comme les TNE-GEP, les adénomes pituitaires et les carcinomes

médullaires de la thyroïde (*Ferrante et al., 2006; Mohamed et al., 2014; Treppiedi et al., 2019; Giardino et al., 2021*). *In vivo*, l'effet anti-tumoral du SOM230 a été étudié sur divers modèles animaux. Le SOM230 induit une régression de la tumeur chez des souris atteintes d'adénomes pituitaires (*Fedele et al., 2007*). De même, des souris atteintes de TNE-GEP et traitées par le SOM230 ont une tumeur environ 3 fois plus petite que les animaux non traités. Les auteurs ont également noté une amélioration de la survie des animaux malgré un faible nombre d'échantillons (*Quinn et al., 2012*). L'administration de SOM230 à des souris atteintes de TNE pancréatiques et pituitaires montre que le SOM230 augmente la survie des animaux et inhibe la croissance tumorale grâce à ses propriétés anti-prolifératives et pro-apoptotiques (*Walls et al., 2016*). En revanche, l'utilisation d'un modèle murin de carcinome neuroendocrine de la prostate n'a montré aucun effet anti-tumoral de l'analogue (*Hashimoto et al., 2013*).

Dans les études cliniques, il a été montré que le SOM230 diminue la taille de la tumeur chez des patients atteints de la maladie de Cushing (*Pivonello et al., 2020*). De la même façon l'injection de SOM230 pendant 3 mois à des patients acromégales diminue le volume tumoral pour 39% d'entre eux (*Petersenn et al., 2010*). Une extension de 6 mois de l'étude montre l'intérêt de l'utilisation à long terme du SOM230 puisqu'un plus grand nombre de patients présentaient une régression tumorale (*Petersenn et al., 2014b*). La taille de la tumeur est également diminuée pour 46% des patients atteints de TNE métastatiques (*Cives et al., 2015*). Pour des patients atteints de tumeurs carcinoïdes avancées des poumons et du thymus, l'administration de SOM230 réduit la taille de la tumeur pour 31% des patients (*Ferolla et al., 2017*). Une stabilisation de la pathologie a également été enregistrée pour plusieurs tumeurs.

Une seule étude a mis en évidence un effet du SOM230 sur des cellules chromaffines tumorales. Dans cette étude, les auteurs montrent *in vitro* qu'un traitement prolongé (24h) des cellules de PHEO humains par le SOM230 engendre une diminution significative de la prolifération et une augmentation de l'apoptose (*Pasquali et al., 2008*).

Le SOM230 possède donc, en plus d'une propriété anti-sécrétoire, des capacités anti-tumorales qui permettent d'envisager d'inhiber l'hypersécrétion, mais également de ralentir le développement tumoral du PHEO. Cette perspective semble prometteuse et est appuyée par les résultats de Pasquali et collaborateurs.

4.5. Quelles sont les limites de l'utilisation du SOM230 ?

4.5.1. Le récepteur nicotinique

Nos résultats posent la question de l'utilisation du récepteur nicotinique comme cible pharmacologique. En effet, nous avons vu que le mode d'action du SOM230 passe probablement par le récepteur nicotinique. Ce dernier est étudié depuis plusieurs années en cancérologie. Par exemple, des niveaux élevés de l'expression de la sous-unité $\alpha 7$ de récepteur nicotinique favorise la prolifération tumorale et les métastases pour plusieurs tumeurs (Wu *et al.*, 2011). Les sous-unités prédominantes du récepteur nicotinique dans les cellules chromaffines humaines sont de type $\alpha 3\beta 4$ (Hone *et al.*, 2015). De façon intéressante, le cribble protéomique réalisé sur 5 échantillons de PHEO humains montre une surexpression d'environ 6 fois de la sous-unité $\alpha 3$ du récepteur nicotinique en comparaison au tissu non tumoral (résultats non montrés). De même, les gènes des sous-unités $\alpha 3$ et $\beta 4$ du récepteur nicotinique sont surexprimés dans le carcinome pulmonaire à petites cellules, une TNE agressive (Improgo *et al.*, 2010). Il est connu que les récepteurs nicotiniques jouent un rôle important dans la pathogenèse des cancers notamment pulmonaires (Dang *et al.*, 2016).

Mes résultats suggèrent plus précisément que le SOM230 agirait comme un antagoniste non compétitif des récepteurs nicotiniques. De fait, des antagonistes ont été étudiés en cancérologie notamment pour leur action anti-proliférative. Par exemple, la mécamylamine, un antagoniste non compétitif des récepteurs nicotiniques avec une affinité préférentielle pour les sous-unités $\alpha 3\beta 4$ (Jensen *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2011), diminue l'angiogenèse et la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer du poumon (Zhu *et al.*, 2003). Une diminution de la tumeur est également observée après l'injection de cette drogue à un modèle murin de cancer du sein (Jimenez *et al.*, 2020). Le récepteur nicotinique apparaît ainsi comme une cible de choix en cancérologie. La mécamylamine étant un antagoniste des

récepteurs nicotiques, on peut tout à fait imaginer qu'elle exerce une action anti-sécrétoire sur les cellules chromaffines. Ainsi, l'incubation d'une lignée de PHEO de rat (PC12) ou de neuroblastome humain (une tumeur avec la même origine embryologique que le PHEO) avec de la mécamylamine entraîne effectivement une inhibition de la sécrétion des catécholamines (Greene *and* Rein, 1977; Vaughan *et al.*, 1993).

Si on établit un parallèle avec la mécamylamine, on peut imaginer qu'en se fixant sur le récepteur nicotinique le SOM230 pourrait exercer les mêmes effets anti-tumoraux. Le SOM230 pourrait ainsi avoir un double effet anti-tumoral via ses propres récepteurs somatostatinerigiques et via le récepteur nicotinique, augmentant ainsi son potentiel en cancérologie. De plus, les doses d'antagonistes des récepteurs nicotiques utilisées *in vitro* sont de l'ordre de 1 à 10 voire 100 μM (Wonnacott *and* Barik, 2007), ce qui est en adéquation avec les doses que nous avons utilisées dans notre étude avec le SOM230. Le principal problème de mes résultats viendrait des effets secondaires provoqués par la fixation du SOM230 sur le récepteur nicotinique. Les évènements indésirables des antagonistes nicotiques viennent de leur non spécificité pour un sous-type de récepteur. Par exemple, la mécamylamine entraîne constipation, rétention urinaire, sécheresse buccale et cutanée, dilatation des pupilles et perte d'accommodation visuelle chez certains patients. Actuellement cette molécule est approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour la prise en charge de l'hypertension modérément sévère à sévère et dans les cas non compliqués d'hypertension maligne (Young *et al.*, 2001; Nickell *et al.*, 2013). On peut imaginer qu'en agissant sur le récepteur nicotinique le SOM230 pourrait avoir des effets secondaires semblables. Néanmoins, nous ne savons pas si le SOM230 se fixe préférentiellement sur une ou plusieurs sous-unités des récepteurs nicotiques, même si le sous-type $\alpha 3\beta 4$ est majoritaire dans nos modèles.

4.5.2. Les effets secondaires du SOM230

Le SOM230 comme la plupart des molécules pharmaceutiques provoque des effets secondaires. L'injection de SOM230 à des patients engendre des problèmes digestifs tels que des diarrhées, des nausées, des maux de ventre, et une malabsorption des graisses les jours suivants le début du traitement (Chen *et al.*, 2014). Le SOM230 modifie fortement l'homéostasie glucidique. Des patients atteints

de la maladie de Cushing ou d'acromégalie présentent une hyperglycémie avec une incidence de 58 à 76% à la suite d'un traitement par le SOM230. De même, du diabète est retrouvé chez 19 à 52% des malades. Ce déséquilibre métabolique peut s'expliquer par l'affinité préférentielle du SOM230 pour le SSTR5 qui est retrouvé majoritairement sur les cellules β pancréatiques produisant l'insuline, tandis que les cellules α pancréatiques produisant le glucagon expriment majoritairement le SSTR2. La sécrétion d'insuline est donc inhibée plus fortement que celle du glucagon, provoquant une augmentation du taux de glucose sanguin. Néanmoins, l'hyperglycémie induite par le SOM230 peut être traitée efficacement grâce à d'autres molécules pharmacologiques (Silverstein, 2016; Vergès, 2017).

Malgré ces effets secondaires, le SOM230 semble être une piste thérapeutique prometteuse pour le PHEO. Cette drogue a démontré une action anti-sécrétoire efficace sur les PHEO en inhibant le nombre d'évènements d'exocytose, réduisant ainsi la quantité de catécholamines libérées par la tumeur. De plus, son potentiel anti-tumoral sur la croissance, la prolifération et l'apoptose constitue un atout majeur en cancérologie.

4.6. Les drogues anti-sécrétoire pour le traitement du phéochromocytome

En clinique le traitement chirurgical du PHEO inclut l'administration d'antagonistes adrénergiques α et β en préopératoire afin de traiter les conséquences de l'hypersécrétion (Jain *et al.*, 2020) (Voir chapitre 2.5.8.1 de l'introduction). Mais existe-il des molécules pharmacologiques avec un potentiel anti-sécrétoire pour le PHEO ?

En deuxième intention, des inhibiteurs calciques dihydropyridiniques sont utilisés pour contrôler la tension artérielle, mais ils sont moins efficaces que les bloquants adrénergiques α et β . Les inhibiteurs calciques (amlodipine, nifédipine, nicardipine) sont utilisés lorsque la pression artérielle n'est pas contrôlée par les antagonistes adrénergiques α et β et/ou lorsque les effets secondaires des bloquants de type α empêchent leur utilisation (Pacak, 2007; Jain *et al.*, 2020). Ces inhibiteurs bloquent les canaux calciques dépendants du voltage de type L, et ainsi l'afflux de calcium induit par les catécholamines dans les cellules musculaires lisses

vasculaires. Ces drogues entraînent ainsi une relaxation des artères coronaires et périphériques neutralisant l'hypertension, la tachyarythmie et éventuellement le vasospasme coronarien. Elles peuvent être associées à des antagonistes adrénergiques α (Bravo, 2002). Dans les cellules chromaffines et le PHEO humain différents canaux calciques dépendants du voltage (L, N, P/Q, R et T) participent à l'exocytose (Hernández-Guijo *et al.*, 2000; Mahapatra *et al.*, 2012). Les bloqueurs calciques dihydropyridiniques n'ont pas été classés comme des drogues interférantes sur les taux de métanéphrines et normétanéphrines plasmatiques et urinaires dans le cadre du diagnostic du PHEO (Mañas-Martínez *et al.*, 2016). Ces molécules ne semblent donc pas capables de bloquer l'hypersécrétion tumorale.

La metyrosine (DEMSER®), une autre molécule pharmaceutique, est utilisée dans le traitement de PHEO aux Etats-Unis (approuvée par la FDA). Cette drogue est un inhibiteur compétitif de la tyrosine hydroxylase (TH) et bloque la synthèse des catécholamines. La metyrosine est utilisée en préopératoire pour traiter une hypertension persistante et incontrôlée par les bloquants adrénergiques α ou β , pour des patients intolérants aux antagonistes adrénergiques α , ou encore pour certaines résections difficiles ou des grandes tumeurs à forte décharge de catécholamines (Gruber *et al.*, 2021). L'administration de metyrosine (en moyenne 1 028 mg/jour) à des patients atteints de PPGL montre qu'environ 30% des patients ont une réduction d'au moins 50% des taux de métabolites urinaires des catécholamines (métanéphrines et normétanéphrines). De plus, 62% des patients ont une amélioration de leurs symptômes (Naruse *et al.*, 2018). Dans une seconde étude la prise de cette molécule (600-4 000 mg/jour) réduit le taux de métanéphrines et normétanéphrines urinaires de 20 à 79%, et 68% des patients présentent une diminution d'au moins 50%. Enfin, 82% des patients rapportent une amélioration de leurs symptômes (Engelman *et al.*, 1968). La metyrosine apparaît donc comme un traitement anti-sécrétoire intéressant pour le PHEO puisqu'elle permet de diminuer les taux de catécholamines ainsi que les symptômes. Cependant, cette molécule engendre des effets secondaires importants tels que de la fatigue et de la somnolence, de l'anxiété et de la dépression, des diarrhées, des tremblements et une prise de poids. Un autre point très limitant pour l'utilisation de cette molécule est son coût qui varie de 118 \$ à 328 \$ par comprimé de 250 mg. Un traitement préopératoire dont la durée est de 4 jours coûte ainsi de 5 700 \$ à 14 000 \$. Ce

médicament est plus compliqué à obtenir, nécessite d'être commandé auprès de pharmacies spécialisées, et n'est pas disponible partout (Gruber *et al.*, 2021). À titre de comparaison un traitement avec le SOM230 en sous-cutanée (plusieurs injections/jour) ou en intramusculaire (1 injection/mois) valent respectivement 15 300 et 15 500 \$ pour 1 mois, soit environ 2 000 \$ pour 4 jours (Drugs.com). Le coût, la disponibilité limitée, les effets secondaires et l'absence d'autorisation de mise sur le marché notamment en Europe pour la metyrosine constituent des barrières importantes pour un usage courant. D'autant que dans la plupart des études elle est combinée à d'autres drogues, notamment des bloquants adrénérgiques α et β , et son utilisation seule est peu courante (Gruber *et al.*, 2021).

Le sunitinib, un inhibiteur des récepteurs tyrosine kinase, est également capable d'agir sur la TH en diminuant son activité et son expression dans une lignée cellulaire de PHEO de rat (PC12). Cette molécule est capable d'inhiber significativement la sécrétion de catécholamines d'environ 60% en diminuant la quantité de catécholamines intracellulaire (Aita *et al.*, 2012). De façon intéressante, le sunitinib permet également d'inhiber la croissance tumorale et la néo-angiogenèse notamment en promouvant l'apoptose sur un modèle de souris porteuses de xénogreffes de cellules de PHEO (Denorme *et al.*, 2014). Plusieurs cas rapportés dans la littérature ont également mis en évidence un effet bénéfique du sunitinib chez des patients atteints de PHEO ou PGL métastatiques (Joshua *et al.*, 2009; Ayala-Ramirez *et al.*, 2012; Bourcier *and* Vinik, 2013; Hata *et al.*, 2014; Leibowitz-Amit *et al.*, 2014). Néanmoins ces études ont porté sur peu de patients, l'action de cette molécule mérite donc d'être étudiée sur une cohorte plus importante.

Enfin, les analogues de la somatostatine semblent être une piste prometteuse, puisqu'un essai clinique est en cours aux Etats-Unis (NCT03946527) et s'intéresse à l'effet du lanréotide, un autre analogue de la somatostatine sur les PHEO et PGL métastatiques (LANreotide in Metastatic Pheochromocytoma / PARAganglioma (LAMPARA)). L'étude évaluera le taux de croissance tumorale, la survie globale, le taux de réponse global, la survie sans progression et la réponse biochimique (catécholamines et méthanéphrines urinaires et la CGA plasmatique).

5. Vers une amélioration du diagnostic du phéochromocytome humain ?

5.1. Problématique

Même si des traitements prometteurs pour le PHEO se développent, une autre limitation est le diagnostic souvent tardif. Le diagnostic actuel du PHEO repose essentiellement sur la mise en évidence de l'excès de catécholamines en dosant leurs produits de dégradation (méтанéphrines et normétanéphrines) dans les urines des patients récoltées pendant 24h, une procédure assez lourde. Les méтанéphrines et normétanéphrines peuvent également être dosées dans le sang mais cette mesure ne reflète que la concentration circulante à un temps donné et est donc moins fiable que le taux urinaire sur 24h. Enfin, la CGA (protéine co-sécrétée avec les catécholamines) plasmatique peut également être recherchée. Des études ont mis en évidence que les paramètres mesurés dans ces tests biochimiques peuvent être influencés par divers éléments. De plus, ces tests présentent une sensibilité et une spécificité limitées.

Ainsi les taux de catécholamines sont impactés par des facteurs tels que le régime alimentaire, les médicaments, le stress. De nombreux produits alimentaires comme les fruits et les noix contiennent des quantités importantes d'amines biogènes. Des molécules pharmacologiques telles que la cocaïne et certains antidépresseurs augmentent la libération d'adrénaline et de noradrénaline. Enfin, un stress émotionnel est également connu pour stimuler la libération des catécholamines. En revanche, des patients avec des tumeurs peu ou pas sécrétrices et asymptomatiques ne seront pas détectés, entraînant des faux négatifs. L'ensemble de ces facteurs vont impacter les taux de catécholamines et donc le taux de leurs produits de dégradation. De plus, la mesure des métabolites des catécholamines offre une spécificité et une sensibilité qui varient entre 80 et 100% selon les études (Lenders *et al.*, 2002; van Berkel *et al.*, 2014). Les concentrations de catécholamines et de leurs métabolites sont également soumises aux variations saisonnières, avec des taux plus élevés en hiver qu'en été. Il y a donc une augmentation des cas de faux positifs en hiver, associée à une spécificité réduite. Néanmoins, aucune variation saisonnière des concentrations plasmatiques de normétanéphrine n'a été observée chez des patients atteints de PHEO (Radke *and* Izzo, 2010; Pamporaki *et al.*, 2014).

La concentration de CGA, le second marqueur couramment utilisé pour le dépistage du PHEO peut également être modifiée par différents facteurs. À noter que la CGA est utilisée pour le diagnostic de diverses TNE et n'est pas spécifique du PHEO (Kaltsas *et al.*, 2004). De plus, d'autres pathologies telles que l'insuffisance rénale et l'hypergastrinémie, vont augmenter le taux de CGA, imitant les niveaux observés pour les TNE. Les maladies inflammatoires et certaines pathologies cardiaques impactent également la libération de ce marqueur (d'Herbomez *et al.*, 2010; Corti *et al.*, 2018). De même, des sujets atteints de septicémie sévère, de traumatisme, ou de la maladie d'Addison peuvent présenter une augmentation de la concentration plasmatique de CGA (El Ali *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2018). L'utilisation de molécules pharmacologiques telles que les inhibiteurs de la pompe à protons engendrent également des augmentations anormales des taux de CGA (Korse *et al.*, 2011). Enfin, la comparaison de 3 kits de diagnostic couramment utilisés sur le marché pour le dosage de la CGA montre une sensibilité et une spécificité variables entre 67 et 96% (Stridsberg *et al.*, 2003). L'amélioration du diagnostic du PHEO semble donc essentielle, et passe inexorablement par la mise en évidence de nouveaux biomarqueurs plus fiables.

5.2. Découverte de nouveaux biomarqueurs

Au démarrage de mon doctorat, l'entreprise Caprion (Montréal, Canada), en collaboration avec l'équipe, a analysé par spectrométrie de masse le profil protéique d'échantillons de plasma d'une cohorte de 40 patients atteints de PHEO et l'a comparé au profil protéique d'une cohorte de volontaires sains. À partir de ce crible protéomique, une vingtaine de protéines ont été sélectionnées selon différents critères (niveau de surexpression par rapport aux échantillons de la cohorte saine, implication connue en cancérologie, localisation intra-granulaire...). De façon intéressante, deux combinaisons de biomarqueurs potentiels ont été mises en évidence ; et permettent de distinguer les patients des sujets contrôles avec une sensibilité et une spécificité supérieures à celles obtenues en dosant la CGA (**Figure 16**). La sensibilité est définie comme la probabilité que le biomarqueur soit présent chez le patient malade (atteints de PHEO), tandis que la spécificité représente la probabilité que le biomarqueur soit négatif chez un sujet sain (Simon, 2015).

D'après nos données la CGA possède une sensibilité de 95% et une spécificité de 78,9% pour différencier les patients des volontaires sains. Tandis que nos combinaisons, comprenant 2 ou 3 biomarqueurs ont une sensibilité de 100% et une spécificité de 94,7%. Ces 5 protéines semblent être de bonnes cibles pour développer un test diagnostique sanguin plus fiable du PHEO. Pour des raisons de confidentialité, le nom des protéines ne peut pas être révélé.

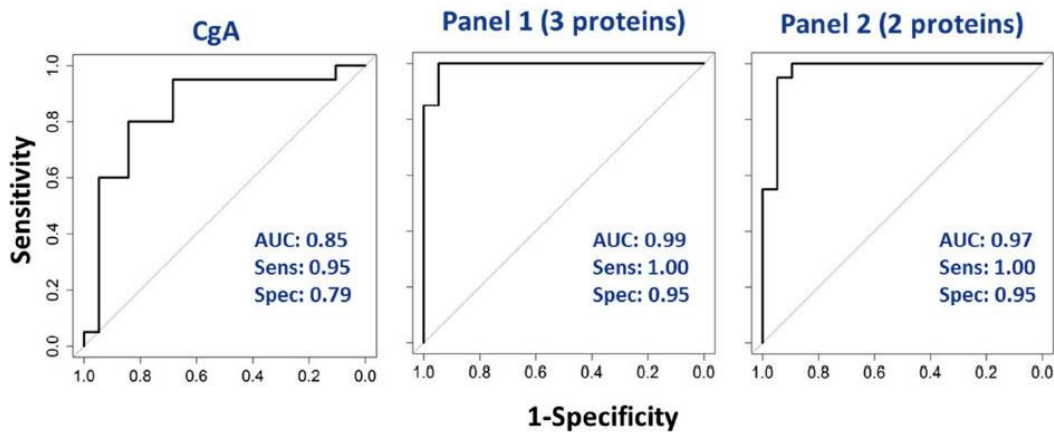


Figure 16 : Crible protéomique visant à déterminer des combinaisons de biomarqueurs pour distinguer les patients atteints de phéochromocytomes des contrôles sains. Le crible est réalisé par l'entreprise Caprion. Les échantillons de plasma de patients atteints de la tumeur sont fournis par le Dr Stéphane Gasman, n=38. Les sujets contrôles proviennent à 50% de Caprion et 50% de la société Biomnis, n=38. Les courbes présentent la capacité du panel à distinguer les patients atteints de phéochromocytomes (bénins n=36, malins n=2) des patients sains.

J'ai ainsi passé la première partie de ma thèse au sein de la société de biotechnologies Firalis SA (Huningue, France), spécialisée dans le développement de kits de diagnostic basés sur des biomarqueurs. Mon projet avait pour but de développer des outils afin de mettre au point un nouveau test de diagnostic du PHEO humain. Au cours de cette expérience, j'ai donc commencé le développement de tests immunologiques de type ELISA sandwich. Je me suis focalisée sur le développement d'anticorps dirigés contre les biomarqueurs. J'ai également produit des protéines recombinantes pour chaque cible afin d'obtenir un standard permettant de réaliser la gamme étalon du kit.

Notre combinaison de trois biomarqueurs comprend une molécule connue en cancérologie, dont l'expression est augmentée dans différents cancers. Le second marqueur a été peu impliqué en cancérologie, néanmoins il semblerait favoriser

l'invasion dans le cancer du sein. Enfin le dernier marqueur de ce panel est une enzyme qui n'a pas d'implication connue en cancérologie, ni dans d'autres pathologies. De façon intéressante, notre panel de deux biomarqueurs comprend un peptide dérivé d'une granine, tandis que le second marqueur est très connu en cancérologie et a été montré comme augmenté dans le sérum de patients atteints de diverses tumeurs dont le PHEO. Ce panel de deux biomarqueurs me semble très prometteur puisque les deux molécules ont une forte implication en cancérologie. Pour le développement d'un nouveau test de diagnostic du PHEO nous avons donc décidé de nous focaliser sur la combinaison de deux biomarqueurs, étant donné leur implication en cancérologie.

Dans la littérature les seules avancées sur des biomarqueurs plasmatiques ont été réalisées sur la sécrétion de dérivés des chromogranines et sécrétogranines par les PHEO. Il a ainsi été montré que le peptide EM66, dérivé de la sécrétogranine est augmenté de 10 fois dans le plasma de patients atteints de PHEO par rapport à des volontaires sains. La quantité urinaire d'EM66 n'est en revanche pas modifiée. L'étude suggère que ce peptide pourrait être dosé en complémentarité des autres marqueurs déjà utilisés en clinique (Guillemot *et al.*, 2006). De même, le peptide WE14 dérivé de la CGA est augmenté de 5,4 fois chez les patients porteurs de PHEO par rapports aux sujets contrôles. La combinaison de la CGA, et d'un ou deux de ces peptides permet d'augmenter la sensibilité de la détection de la tumeur à environ 90% (Guillemot *et al.*, 2014). Ces résultats restent en dessous de la sensibilité obtenue avec nos biomarqueurs (de 100%), d'autant plus qu'aucune indication n'est donnée pour la spécificité.

Ces dernières années les recherches se sont plus focalisées sur des marqueurs moléculaires qui permettraient de distinguer les PHEO bénins et malins tels que des ARN long non codants ou les miRNA (Meyer-Rochow *et al.*, 2010; Ruff *et al.*, 2019; Ghosal *et al.*, 2020; Job *et al.*, 2020).

CONCLUSION

CONCLUSION

Mes travaux de thèse permettent de mieux comprendre pourquoi et comment les phéochromocytomes présentent une hypersécrétion de catécholamines. J'ai montré pour la première fois que les cellules tumorales ont une sécrétion accrue à l'échelle unicellulaire, invalidant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'hypersécrétion proviendrait uniquement d'un effet de masse de la tumeur. Une analyse protéomique de tissus tumoraux a également permis de mettre en évidence des dérégulations de nombreuses protéines impliquées dans l'exocytose régulée par le calcium. L'altération de divers acteurs du processus d'exocytose pourrait ainsi expliquer l'augmentation du nombre d'évènements d'exocytose, ainsi qu'une cinétique de libération plus rapide dans les cellules tumorales. Il serait à présent intéressant de faire le lien entre l'hypersécrétion de la tumeur et les protéines de l'exocytose dont l'expression varie. Découvrir les origines et les mécanismes de la sécrétion incontrôlée des phéochromocytomes pourrait conduire à développer des stratégies thérapeutiques visant à prévenir l'hypersécrétion et à diminuer ainsi les risques cliniques. Mes résultats permettent également d'envisager que des mécanismes similaires puissent être à l'origine de l'hypersécrétion d'autres tumeurs neuroendocrines et ouvrent ainsi la voie à de nouvelles études.

Dans une seconde partie, mes recherches se sont focalisées sur les analogues de la somatostatine grâce auxquels j'espérais inhiber directement l'hypersécrétion des phéochromocytomes. Ces molécules sont déjà utilisées en clinique pour leur effet anti-sécrétoire sur plusieurs tumeurs neuroendocrines. Mes résultats montrent pour la première fois que le pasiréotide (SOM230), un analogue de dernière génération, bloque efficacement la sécrétion de cellules tumorales provenant d'exérèses de phéochromocytomes humains. L'ensemble de mes données suggèrent également une nouvelle piste de recherche, puisque l'effet anti-sécrétoire du SOM230 serait lié à une inhibition du récepteur nicotinique, une action dont les mécanismes exacts restent à élucider. Mes résultats très prometteurs obtenus avec le SOM230 permettent d'envisager à plus long terme des essais pré-cliniques et cliniques pour valider une utilisation thérapeutique sur des patients atteints de phéochromocytomes.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Réactifs

Les analogues de la somatostatine : octréotide et pasiréotide (SOM230) ont été fournis par Novartis (Basel, Switzerland). Ces drogues sont dissoutes dans du DMSO, puis des solutions stocks à 10^{-2} ou 10^{-3} M sont conservées à -20°C , à l'abri de la lumière.

2. Échantillons de phéochromocytomes humains

Les prélèvements de phéochromocytomes humains sont récupérés après exérèse réalisée par le Pr Laurent Brunaud au CHRU de Nancy Brabois, par le Dr Michel Vix ou Pr Didier Mutter à l'Institut de chirurgie guidée par l'image (IHU) de Strasbourg, tous les trois sont chirurgiens viscéral et digestif. L'accord des patients a été recueilli pour qu'une partie de la tumeur soit prélevée et utilisée en recherche. Différentes données cliniques et biologiques ont été recueillies, notamment les niveaux de métanéphrines et normétanéphrines urinaires et plasmatiques, et quand la donnée était disponible, le niveau de chromogranine A plasmatique.

3. Culture cellulaire

3.1. Culture primaire de cellules chromaffines bovines

La culture primaire de cellules chromaffines obtenues à partir de glandes surrénales bovines a été décrite par Thahouly *et al.*, 2021.

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, les glandes surrénales sont prélevées et placées dans une solution de Krebs (154 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 3,6 mM NaHCO_3 , 5,6 mM glucose, 5 mM d'HEPES, pH 7,4) contenant de la primocine à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les prélèvements sont maintenus à 4°C pendant le transport. Les glandes sont dégraissées puis perfusées pendant 10 min avec la solution de Krebs (50 mL/glande) afin d'éliminer le plasma et les érythrocytes des vaisseaux. Les glandes sont ensuite digérées par perfusion d'une solution de Krebs contenant 0,4% de collagénase A et 0,5% de *bovine serum albumin* (BSA). Les parties médullaires et corticales sont séparées par dissection, puis les cellules de la médullosurrénale sont

dissociées par passage sur un tamis de 217 μm . Après 10 min de centrifugation à 100 g et à température ambiante, le culot est repris dans la solution de Krebs puis passé sur un tamis de 70 μm afin de dissocier les cellules plus finement. S'en suit une centrifugation de 20 min à 20 000 g sans frein, à température ambiante, sur un gradient continu de densité de Percoll à 47,5% (GE Healthcare), afin d'isoler les cellules chromaffines des érythrocytes et des débris cellulaires. Les cellules chromaffines sont ensuite collectées et lavées, avant d'être centrifugées 10 min à 100 g dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant 4 mM de glutamine et de la primocine à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après comptage avec une cellule de Neubauer, 250 000 cellules/puits sontensemencées dans des plaques 96 puits pour le dosage fluorimérique ou dans des boîtes de Petri de 35 mm pour l'ampérométrie à fibre de carbone, dans du milieu complet DMEM contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de primocine et des antimétabolites (cytosine arabinoside à 10^{-5} M et fluorodéoxyuridine à 10^{-5} M). Les cellules sont maintenues à 37°C, avec 5% de CO_2 , 95% d'air saturé en vapeur d'eau, pendant au moins 2 jours avant utilisation.

3.2. Culture primaire de cellules chromaffines humaines issues de phéochromocytome

Les cellules chromaffines tumorales sont obtenues à partir de phéochromocytomes humains récupérés après opération chirurgicale. Immédiatement après résection, un morceau de la tumeur (1 cm^3 environ) est prélevé puis plongé dans un milieu de transport à 4°C : *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) sans calcium ni magnésium (HBSS CMF) (Sigma) supplémenté par 0,2% de SVF (Gibco) et 1% de pénicilline/streptomycine (Sigma), ou *Medium Tissue Storage Solution* (MACS) (Miltenyibiotec). La biopsie est maintenue à 4°C pendant le transport. 1 à 3h après la résection, la tumeur est découpée en petits fragments d'environ 1 mm^3 dans une boîte contenant de l'HBSS CMF, avant d'être centrifugés 5 min à 250 g à température ambiante. Le culot est resuspendu dans 15 mL de milieu complet (*Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI) 1640 GlutaMAX™ (Gibco) supplémenté de 15% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine), et les fragments laissés sédimenter 15 min à température ambiante afin d'éliminer les cellules sanguines et le gras. Le surnageant est éliminé puis 15 mL de milieu complet sont utilisés pour resuspendre le culot avant centrifugation 5 min à 250 g à température

ambiante. Les fragments sont ensuite digérés dans du HBSS contenant du Ca^{2+} et du Mg^{2+} et les enzymes de digestion : 1,5 mg/mL de collagénase B (Roche) et 1 mg/mL de dispase 2 (Gibco), pendant 45 min à 37°C sous agitation modérée. Le volume de la solution de digestion est d'environ 10 fois le volume de tissu. 5 min avant la fin de la digestion, 0,1 mg/mL de DNase I (Roche) est ajoutée afin d'éviter les agglomérats d'ADN. Après sédimentation à température ambiante, le surnageant est récupéré (fraction P1). Le culot est ensuite trituré dans 5 mL de HBSS CMF. Après sédimentation, le surnageant est conservé (fraction P2). Les deux fractions sont centrifugées 5 min à 800 g à température ambiante. Les culots sont resuspendus dans 2 mL de HBSS CMF et les hématies restantes lysées en ajoutant 4 mL de *Red Blood Cell Lysis Buffer* (Roche), le mélange est placé 10 min sous agitation modérée à température ambiante. Les fractions sont centrifugées 5 min à 500 g, puis resuspendues dans du milieu complet. La viabilité et la densité cellulaire sont évaluées au microscope optique puis le volume final pour chaque fraction est ajusté. 300 μL de suspension cellulaire sontensemencées dans des boîtes de Petri de 35 mm contenant une lamelle de verre (MatTek) couverte de collagène I (Corning) pour les expériences d'ampérométrie ou couverte de polylysine (Sigma) pour les expériences d'imagerie calcique et d'électrophysiologie. Les cellules sont maintenues à 37°C, avec 5% de CO_2 , 95% d'air saturé en vapeur d'eau. Le lendemain 2 mL de milieu complet sont ajoutés. Les cellules sont utilisées 2 à 3 jours après la culture.

4. Techniques biochimiques

4.1. Détection des récepteurs à la somatostatine par Western-blot

L'extraction des protéines de biopsies humaines (phéochromocytome et tissu non tumoral adjacent) a été réalisée sur glace, en broyant avec un mini Potter les fragments de tissu dans un tampon de lyse (10 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 2 mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100, 10% glycérol, 0,1% SDS, 0,5% deoxycholate, cocktail d'anti-protéases). 20 μL de tampon de lyse est utilisé pour 10 mg de tissu. Lorsque la solution est homogène, le lysat est incubé 15 min supplémentaire sur glace en vortexant à intervalle régulier. Les cellules chromaffines de bœuf sont lysées dans du Triton à 1%, 15 min à 4°C, en vortexant plusieurs fois. Les lysats sont clarifiés par centrifugation à 20 000 g, pendant 10 min, à 4°C, et les surnageants sont récupérés.

La concentration en protéines des échantillons est déterminée grâce à la technique de Bradford (Bio-Rad protein assay). Les échantillons sont repris dans du tampon de charge (10 mM Tris HCl pH 7, 1 mM EDTA, 20 mM DTT, 3% SDS (m/v), 10 % glycérol (v/v), 0,01% bromophénol (m/v)) de façon à avoir 30 µg de protéines par échantillon puis dénaturés pendant 5 min à 95°C. Les échantillons sont déposés sur un gel de polyacrylamide en gradient continu de 4 à 12% Bis-Tris (Invitrogen) et les protéines séparées par migration pendant 45 min à 180 V dans un tampon MES SDS (Invitrogen). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (MES *transfer buffer*, Invitrogen supplémenté de 20% d'éthanol) à 30 V pendant 1h. L'efficacité de transfert est vérifiée par coloration de la membrane au rouge de Ponceau. Les sites non spécifiques sont saturés en incubant la membrane dans un tampon de blocage (*Tris Buffered Saline* (Euromedex), 0,1% Tween20 (TBS-T), 3% BSA) à température ambiante, sous agitation pendant 1h. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage, sur la nuit, à 4°C, sous agitation. Après lavages dans le TBS-T, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué dans la solution de blocage pendant 30 min, à température ambiante, sous agitation. La membrane est lavée, puis l'activité de la HRP révélée par chimiluminescence (SuperSignal™, Invitrogen) et détectée grâce au système d'acquisition d'images *Chemi-smart 5000* (Vilbert Lourmat). Dilution des anticorps primaires : polyclonaux de lapin anti-SSTR2 (ASR-006, Alomone labs) et anti-SSTR5 (ASR-005, Alomone labs) : 1/300, monoclonal de souris anti-tyrosine hydroxylase (TH) (MAB31, Millipore) : 1/5 000. Les anticorps secondaires polyclonaux de chèvre contre les Ig de lapin (31460, Thermo scientific) ou contre les Ig de souris (31430, Thermo scientific) couplés à la HRP sont dilués au 1/50 000.

4.2. Dosage des catécholamines par méthode fluorimétrique

Le dosage fluorimétrique des catécholamines a été décrit par Thahouly *et al.*, 2021. Les cellules chromaffines bovines sont préalablementensemencées dans une plaque 96 puits (Thermo Fisher Scientific) à 250 000 cellules/puits et maintenues environ 48 h en culture avant la mesure de sécrétion. Le test est réalisé sur plaque chauffante à 37°C. Les cellules sont lavées 3 fois 7 min avec 200 µL d'une solution de *Locke Normal* (LN) (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM KH₂PO₄,

1,2 mM MgSO₄, 0,01 mM EDTA, 15 mM HEPES, 11 mM glucose, 0,56 mM acide ascorbique, pH 7,5) puis stimulées pendant 10 min avec 50 µL d'une solution dépolarisante de potassium (LN contenant du KCl à 59 mM pH 7,2) ou de nicotine à 10 µM (Sigma) en présence ou absence de SOM230 ou d'octréotide. Pour réaliser les courbes dose-réponse de l'antagoniste du SOM230 sur le récepteur nicotinique, des doses croissantes de nicotine sont utilisées pour stimuler les cellules de 5 à 30 µM. Pour évaluer la sécrétion basale des cellules sont maintenues dans du LN pendant les 10 min. La plaque est ensuite transférée sur glace pour stopper la sécrétion puis les surnageants sont prélevés. Les cellules sont lysées par addition de 200 µL de LN contenant 1% de Triton X-100 (Sigma) pendant 3 min. Les cellules sont ensuite resuspendues puis laissées à nouveau 3 min en contact avec le triton. La plaque est ensuite centrifugée 10 min à 3 000 g à température ambiante.

Le dosage est réalisé sur 20 µL d'échantillon déposés dans une plaque 96 puits noire (Thermo Fisher Scientific). 150 µL de CH₃COOH (1 M, pH 6) et 15 µL de K₃Fe(CN)₆ (0,25%) sont ajoutés pour oxyder la noradrénaline et l'adrénaline en noradrénochrome et adrénochrome respectivement. Les dérivés aminochromes sont rapidement transformés en noradrénolutine et en adrénolutine, molécules fluorescentes et stables suite à l'addition de 50 µL de NaOH (5 M) contenant de l'acide ascorbique (0,3 mg/mL). La mesure de fluorescence est réalisée par excitation à 430 nm et lecture de l'émission de fluorescence à 520 nm au spectrofluorimètre (Mithras LB 940, Berthold). Les résultats sont exprimés en pourcentage de sécrétion qui est calculé grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ de sécrétion} = \frac{(S - B) \times 2,5}{(L - B) \times 10 + (S - B) \times 2,5} \times 100$$

S = fluorescence du surnageant, L = fluorescence du lysat, B = fluorescence du blanc correspondant à l'échantillon

La sécrétion nette des cellules correspond à la différence entre le % de sécrétion des cellules ayant subi une stimulation et le % de sécrétion des cellules non stimulées. Les résultats sont ensuite normalisés au contrôle. Chaque condition est réalisée en triplicat et les expériences sont réalisées sur au moins 3 cultures indépendantes.

5. Mesure de la sécrétion des catécholamines par ampérométrie à fibre de carbone

L'ampérométrie à fibre de carbone est une technique électrochimique permettant d'enregistrer des événements d'exocytose sur cellule unique. Elle est basée sur l'oxydation des catécholamines libérées par la cellule à la surface de l'électrode.

Les cellules sont maintenues en culture pendant 48 à 72 h avant l'expérience. Les cellules sont lavées dans 2 mL de LN sans acide ascorbique à 37°C. Les enregistrements ampérométriques sont réalisés à l'aide d'une fibre en carbone commerciale de 5 µm de diamètre (CFE-1, ALA Scientific instruments), placée au contact de la cellule et maintenue au potentiel d'oxydation des catécholamines de +650 mV. Une électrode de référence Ag/AgCl est également positionnée dans la boîte. Une micropipette (Femtotips, Eppendorf) placée à environ 10 µm de la cellule permet de stimuler les cellules avec une solution de nicotine à 100 µM (Sigma), pendant 10 s. En fonction des expériences, l'analogue de la somatostatine (octréotide ou SOM230) est présent dans la pipette de stimulation ou dans le milieu d'incubation, au contact direct des cellules. Les signaux sont enregistrés pendant 60 s grâce à un amplificateur AMU130 (Radiometer Analytical), calibré à 5 kHz et au logiciel WinEDR. Les signaux sont ensuite filtrés à 1000 Hz et analysés à l'aide du logiciel Igor Pro (Wavemetrics). L'analyse automatique des pics ainsi que l'extraction des différents paramètres sont réalisés grâce à une macro développée par l'équipe du Dr R. Borges (<http://webpages.ull.es/users/rborges/>) (Segura *et al.*, 2000; Brioso *et al.*). L'ensemble des pics est vérifié manuellement et seuls ceux dépassant 5 pA sont considérés comme des événements d'exocytose. Les pics superposés et aberrants sont comptabilisés pour l'analyse du nombre de pics totaux, puis retirés pour l'analyse des paramètres ampérométriques. La charge Q représente l'aire sous le pic et indique la quantité de catécholamines libérées. L'amplitude du pic est représentée par l' I_{max} qui est le flux maximal de catécholamines libérées par granule. Enfin, le $T_{1/2}$ et le T_{peak} sont représentatifs de la cinétique de libération des catécholamines.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adams MS, Bronner-Fraser M (2009) Review: the role of neural crest cells in the endocrine system. *Endocr Pathol* 20:92–100.

Adler JT, Meyer-Rochow GY, Chen H, Benn DE, Robinson BG, Sippel RS, Sidhu SB (2008) Pheochromocytoma: current approaches and future directions. *The Oncologist* 13:779–793.

Aita Y, Ishii K, Saito Y, Ikeda T, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K (2012) Sunitinib inhibits catecholamine synthesis and secretion in pheochromocytoma tumor cells by blocking VEGF receptor 2 via PLC- γ -related pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E1006-1014.

Ajallé R, Plouin PF, Pacak K, Lehnert H (2009) Treatment of Malignant Pheochromocytoma. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab* 41:687–696.

Algeciras-Schimnich A, Preissner CM, Young WF, Singh RJ, Grebe SKG (2008) Plasma chromogranin A or urine fractionated metanephrines follow-up testing improves the diagnostic accuracy of plasma fractionated metanephrines for pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 93:91–95.

Amar L, Baudin E, Burnichon N, Peyrard S, Silvera S, Bertherat J, Bertagna X, Schlumberger M, Jeunemaitre X, Gimenez-Roqueplo A-P, Plouin P-F (2007) Succinate dehydrogenase B gene mutations predict survival in patients with malignant pheochromocytomas or paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3822–3828.

Amar L, Peyrard S, Rossignol P, Zinzindohoue F, Gimenez-Roqueplo A-P, Plouin P-F (2006) Changes in urinary total metanephrine excretion in recurrent and malignant pheochromocytomas and secreting paragangliomas. *Ann N Y Acad Sci* 1073:383–391.

Amatore C, Arbault S, Bouret Y, Guille M, Lemaître F (2010) Prediction of local pH variations during amperometric monitoring of vesicular exocytotic events at chromaffin cells. *Chemphyschem Eur J Chem Phys Phys Chem* 11:2931–2941.

Andreis DT, Singer M (2016) Catecholamines for inflammatory shock: a Jekyll-and-Hyde conundrum. *Intensive Care Med* 42:1387–1397.

Andrew A, Kramer B, Rawdon BB (1998) The origin of gut and pancreatic neuroendocrine (APUD) cells--the last word? *J Pathol* 186:117–118.

Annamalai AK, Dean AF, Kandasamy N, Kovacs K, Burton H, Halsall DJ, Shaw AS, Antoun NM, Cheow HK, Kirollos RW, Pickard JD, Simpson HL, Jefferies SJ,

Burnet NG, Gurnell M (2012) Temozolomide responsiveness in aggressive corticotroph tumours: a case report and review of the literature. *Pituitary* 15:276–287.

Aunis D, Langley K (1999) Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand* 167:89–97.

Ayala-Ramirez M, Chougnet CN, Habra MA, Palmer JL, Leboulleux S, Cabanillas ME, Caramella C, Anderson P, Al Ghuzlan A, Waguespack SG, Deandreis D, Baudin E, Jimenez C (2012) Treatment with sunitinib for patients with progressive metastatic pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 97:4040–4050.

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.

Bai S, Yao Z, Zhu X, Li Z, Jiang Y, Wang R, Wu B (2018) Risk factors for postoperative severe morbidity after pheochromocytoma surgery: A single center retrospective analysis of 262 patients. *Int J Surg Lond Engl* 60:188–193.

Barbarin A, Frade R (2011) Procathepsin L secretion, which triggers tumour progression, is regulated by Rab4a in human melanoma cells. *Biochem J* 437:97–107.

Barnett P (2003) Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* 20:255–264.

Bartolomucci A, Possenti R, Mahata SK, Fischer-Colbrie R, Loh YP, Salton SRJ (2011) The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* 32:755–797.

Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou Y, Johnson SA, Swearingen B, Hedley-Whyte ET, Stratakis CA, Klibanski A (2006) The effects of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4482–4488.

Bauer W, Briner U, Doepfner W, Haller R, Huguenin R, Marbach P, Petcher TJ, Pless null (1982) SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 31:1133–1140.

Bechmann N, Ehrlich H, Eisenhofer G, Ehrlich A, Meschke S, Ziegler CG, Bornstein SR (2018) Anti-Tumorigenic and Anti-Metastatic Activity of the Sponge-Derived Marine Drugs Aerophysinin-1 and Isofistularin-3 against Pheochromocytoma In Vitro. *Mar Drugs* 16.

- Béglé A, Tryoen-Tóth P, de Barry J, Bader M-F, Vitale N (2009) ARF6 regulates the synthesis of fusogenic lipids for calcium-regulated exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 284:4836–4845.
- Berends AMA, Buitenwerf E, de Krijger RR, Veeger NJGM, van der Horst-Schrivers ANA, Links TP, Kerstens MN (2018) Incidence of pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma in the Netherlands: A nationwide study and systematic review. *Eur J Intern Med* 51:68–73.
- Bernhardt EB, Jalal SI (2016) Small Cell Lung Cancer. *Cancer Treat Res* 170:301–322.
- Bertherat J, Tenenbaum F, Perlemoine K, Videau C, Alberini JL, Richard B, Dousset B, Bertagna X, Epelbaum J (2003) Somatostatin receptors 2 and 5 are the major somatostatin receptors in insulinomas: an in vivo and in vitro study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5353–5360.
- Beuret N, Stettler H, Renold A, Rutishauser J, Spiess M (2004) Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem* 279:20242–20249.
- Bílek R, Viček P, Šafařík L, Michalský D, Novák K, Dušková J, Václavíková E, Widimský J, Zelinka T (2019) Chromogranin A in the Laboratory Diagnosis of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers* 11.
- Bishop AE, Power RF, Polak JM (1988) Markers for neuroendocrine differentiation. *Pathol Res Pract* 183:119–128.
- Bodei L, Kwekkeboom DJ, Kidd M, Modlin IM, Krenning EP (2016) Radiolabeled Somatostatin Analogue Therapy Of Gastroenteropancreatic Cancer. *Semin Nucl Med* 46:225–238.
- Boksa P, St-Pierre S, Livett BG (1982) Characterization of substance P and somatostatin receptors on adrenal chromaffin cells using structural analogues. *Brain Res* 245:275–283.
- Bourcier ME, Vinik AI (2013) Sunitinib for the treatment of metastatic paraganglioma and vasoactive intestinal polypeptide-producing tumor (VIPoma). *Pancreas* 42:348–352.
- Brabander T, Kwekkeboom DJ, Feelders RA, Brouwers AH, Teunissen JJM (2015) Nuclear Medicine Imaging of Neuroendocrine Tumors. *Front Horm Res* 44:73–87.
- Bravo EL (2002) Pheochromocytoma: an approach to antihypertensive management. *Ann N Y Acad Sci* 970:1–10.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179:77–79.

- Brioso MA, Segura F, Gómez JF, Machado JD, Borges R (n.d.) Program on Igor Pro for the Automatical Analysis of Amperometric Spikes. :21.
- Brown RL, Muzzafar T, Wollman R, Weiss RE (2006) A pituitary carcinoma secreting TSH and prolactin: a non-secreting adenoma gone awry. *Eur J Endocrinol* 154:639–643.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G (2002) SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol* 146:707–716.
- Buchan AMJ, Lin C-Y, Choi J, Barber DL (2002) Somatostatin, acting at receptor subtype 1, inhibits Rho activity, the assembly of actin stress fibers, and cell migration. *J Biol Chem* 277:28431–28438.
- Buffet A, Burnichon N, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P (2020) An overview of 20 years of genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 34:101416.

C

- Carmon O et al. (2020) Chromogranin A preferential interaction with Golgi phosphatidic acid induces membrane deformation and contributes to secretory granule biogenesis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 34:6769–6790.
- Casarini APM, Jallad RS, Pinto EM, Soares IC, Nonogaki S, Giannella-Neto D, Musolino NR, Alves VAF, Bronstein MD (2009) Acromegaly: correlation between expression of somatostatin receptor subtypes and response to octreotide-lar treatment. *Pituitary* 12:297–303.
- Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S (2009) Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res* 69:3727–3730.
- Chan MM, Chan MM, Mengshol JA, Fish DN, Chan ED (2013) Octreotide: a drug often used in the critical care setting but not well understood. *Chest* 144:1937–1945.
- Chasserot-Golaz S, Vitale N, Umbrecht-Jenck E, Knight D, Gerke V, Bader M-F (2005) Annexin 2 promotes the formation of lipid microdomains required for calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Mol Biol Cell* 16:1108–1119.
- Chen X, Shen G, Jiang J, Liu H, Hu K, Darstein C, Lasher J, Hu P (2014) Pharmacokinetics and safety of subcutaneous pasireotide and intramuscular pasireotide long-acting release in Chinese male healthy volunteers: a phase I, single-center, open-label, randomized study. *Clin Ther* 36:1196–1210.

- Cheung NW, Boyages SC (1995) Somatostatin-14 and its analog octreotide exert a cytostatic effect on GH3 rat pituitary tumor cell proliferation via a transient G0/G1 cell cycle block. *Endocrinology* 136:4174–4181.
- Cives M, Kunz PL, Morse B, Coppola D, Schell MJ, Campos T, Nguyen PT, Nandoskar P, Khandelwal V, Strosberg JR (2015) Phase II clinical trial of pasireotide long-acting repeatable in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 22:1–9.
- Colao A, Bronstein MD, Brue T, De Marinis L, Fleseriu M, Guitelman M, Raverot G, Shimon I, Fleck J, Gupta P, Pedroncelli AM, Gadelha MR (2020) Pasireotide for acromegaly: long-term outcomes from an extension to the Phase III PAOLA study. *Eur J Endocrinol* 182:583.
- Cornu E, Belmihoub I, Burnichon N, Grataloup C, Zinzindohoué F, Baron S, Billaud E, Azizi M, Gimenez-Roqueplo A-P, Amar L (2019) [Pheochromocytoma and paraganglioma]. *Rev Med Interne* 40:733–741.
- 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, Marcucci F, Bachetti T (2018) Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch* 470:199–210.
- 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.
- Criado M (2018) Acetylcholine nicotinic receptor subtypes in chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470:13–20.
- Crivellato E, Nico B, Ribatti D (2008) The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *Anat Rec Hoboken NJ* 2007 291:1587–1602.
- Crona J, Backman S, Maharjan R, Mayrhofer M, Ståhlberg P, Isaksson A, Hellman P, Björklund P (2015) Spatiotemporal Heterogeneity Characterizes the Genetic Landscape of Pheochromocytoma and Defines Early Events in Tumorigenesis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 21:4451–4460.
- Croisé P (2015) Sécrétion des phéochromocytomes : impact sur le développement tumoral et rôle des GTPases Rho. Thèse de l'Université de Strasbourg.
- Cuevas-Ramos D, Fleseriu M (2016) Pasireotide: a novel treatment for patients with acromegaly. *Drug Des Devel Ther* 10:227–239.
- Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD (1985) Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small-cell lung cancer. *Nature* 316:823–826.

D

- d'Herbomez M, Do Cao C, Vezzosi D, Borzon-Chasot F, Baudin E, groupe des tumeurs endocrines (GTE France) (2010) Chromogranin A assay in clinical practice. *Ann Endocrinol* 71:274–280.
- Daems T, Verhelst J, Michotte A, Abrams P, De Ridder D, Abs R (2009) Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas. *Pituitary* 12:80–86.
- Dahia PLM (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer* 14:108–119.
- 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.
- Dalm SU, Nonnekens J, Doeswijk GN, de Blois E, van Gent DC, Konijnenberg MW, de Jong M (2016) Comparison of the Therapeutic Response to Treatment with a ¹⁷⁷Lu-Labeled Somatostatin Receptor Agonist and Antagonist in Preclinical Models. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 57:260–265.
- Dang N, Meng X, Song H (2016) Nicotinic acetylcholine receptors and cancer. *Biomed Rep* 4:515–518.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC (2017) Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol* 3:1335–1342.
- de Bruin C, Feelders RA, Lamberts SWJ, Hofland LJ (2009) Somatostatin and dopamine receptors as targets for medical treatment of Cushing's Syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* 10:91–102.
- de Herder WW, Rehfeld JF, Kidd M, Modlin IM (2016) A short history of neuroendocrine tumours and their peptide hormones. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 30:3–17.
- 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.
- Desnos C, Schonn J-S, Huet S, Tran VS, El-Amraoui A, Raposo G, Fanget I, Chapuis C, Ménasché G, de Saint Basile G, Petit C, Cribier S, Henry J-P, Darchen F (2003) Rab27A and its effector MyRIP link secretory granules to F-actin and control their motion towards release sites. *J Cell Biol* 163:559–570.
- Désy L, Pelletier G (1977) Immunohistochemical localization of somatostatin in the human hypothalamus. *Cell Tissue Res* 184:491–497.

- Dhara M, Mohrmann R, Bruns D (2018) v-SNARE function in chromaffin cells. *Pflugers Arch* 470:169–180.
- Dietrich H, Hu K, Ruffin M, Song D, Bouillaud E, Wang Y, Hasskarl J (2012) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of a single dose of pasireotide long-acting release in healthy volunteers: a single-center Phase I study. *Eur J Endocrinol* 166:821–828.
- Dineen R, Stewart PM, Sherlock M (2017) Acromegaly. *QJM Mon J Assoc Physicians* 110:411–420.
- Drugs.com. Signifor Prices, Coupons and Patient Assistance Programs. Accessed May 12, 2021
<https://www.drugs.com/price-guide/signifor>
- Drugs.com. Signifor LAR Prices, Coupons and Patient Assistance Programs. Accessed May 12, 2021
<https://www.drugs.com/price-guide/signifor-lar>
- Dupont A, Alvarado-Urbina G, Côté J, Labrie F (1978) Enzymatic degradation of somatostatin by rat plasma and hypothalamus. *Can J Physiol Pharmacol* 56:840–843.

E

- Eigler T, Ben-Shlomo A (2014) Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *J Mol Endocrinol* 53:R1-19.
- 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:E1223-1233.
- Eisenhofer G, Lenders JWM, Goldstein DS, Mannelli M, Csako G, Walther MM, Brouwers FM, Pacak K (2005) 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, Timmers H, Mannelli M, Grebe SK, Hofbauer LC, Bornstein SR, Tiebel O, Adams K, Bratslavsky G, Linehan WM, Pacak K (2011) Measurements of plasma methoxytyramine, normetanephrine, and metanephrine as discriminators of different hereditary forms of pheochromocytoma. *Clin Chem* 57:411–420.
- El Ali Z, Fichna M, Piniewska J, Kosowicz J, Grzymisławski M (2010) Chromogranin A as a useful neuroendocrine marker in patients with autoimmune Addison's disease. *J Endocrinol Invest* 33:186–191.

- Elder EE, Elder G, Larsson C (2005) Pheochromocytoma and functional paraganglioma syndrome: no longer the 10% tumor. *J Surg Oncol* 89:193–201.
- Elhamdani A, Azizi F, Artalejo CR (2006) Double Patch Clamp Reveals That Transient Fusion (Kiss-and-Run) Is a Major Mechanism of Secretion in Calf Adrenal Chromaffin Cells: High Calcium Shifts the Mechanism from Kiss-and-Run to Complete Fusion. *J Neurosci* 26:3030–3036.
- Elshafie O, Al Badaai Y, Alwahaibi K, Qureshi A, Hussein S, Al Azzri F, Almamari A, Woodhouse N (2014) Catecholamine-secreting carotid body paraganglioma: successful preoperative control of hypertension and clinical symptoms using high-dose long-acting octreotide. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2014:140051.
- Engelman K, Horwitz D, Jéquier E, Sjoerdsma A (1968) Biochemical and pharmacologic effects of alpha-methyltyrosine in man. *J Clin Invest* 47:577–594.
- Estévez-Herrera J, González-Santana A, Baz-Dávila R, Machado JD, Borges R (2016) The intravesicular cocktail and its role in the regulation of exocytosis. *J Neurochem* 137:897–903.
- Evenepoel L, Helaers R, Vroonen L, Aydin S, Hamoir M, Maiter D, Vikkula M, Persu A (2017) KIF1B and NF1 are the most frequently mutated genes in paraganglioma and pheochromocytoma tumors. *Endocr Relat Cancer* 24:L57–L61.

F

- Faggiano A, Modica R, Severino R, Camera L, Fonti R, Del Prete M, Chiofalo MG, Aria M, Ferolla P, Vitale G, Pezzullo L, Colao A (2018) The antiproliferative effect of pasireotide LAR alone and in combination with everolimus in patients with medullary thyroid cancer: a single-center, open-label, phase II, proof-of-concept study. *Endocrine* 62:46–56.
- Fall CA, Dupuy O, Garcia C, Giraud L, Almhrezi Y, Bordier L, Mayaudon H (2013) [Asymptomatic secretory phaeochromocytoma: the interest of a systematic evaluation of adrenal incidentalomas]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983 42:1145–1147.
- Farndon JR, Davidson HA, Johnston ID, Wells SA (1980) VMA excretion in patients with pheochromocytoma. *Ann Surg* 191:259–263.
- Farrugia F-A, Charalampopoulos A (2019) Pheochromocytoma. *Endocr Regul* 53:191–212.
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15781–15786.

- Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, Tabarin A, Terzolo M, Tsagarakis S, Dekkers OM (2016) Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* 175:G1–G34.
- Favier J (2010) Hypoxie et pseudo-hypoxie dans les tumeurs endocrines : l'exemple du phéochromocytome – Hypoxia and pseudo-hypoxia in endocrine tumors: the pheochromocytoma example. *Corresp En Métabolismes Horm Diabète Nutr*:7.
- Fedele M, De Martino I, Pivonello R, Ciarmiello A, Del Basso De Caro ML, Visone R, Palmieri D, Pierantoni GM, Arra C, Schmid HA, Hofland L, Lombardi G, Colao A, Fusco A (2007) SOM230, a new somatostatin analogue, is highly effective in the therapy of growth hormone/prolactin-secreting pituitary adenomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 13:2738–2744.
- Ferolla P et al. (2017) Efficacy and safety of long-acting pasireotide or everolimus alone or in combination in patients with advanced carcinoids of the lung and thymus (LUNA): an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18:1652–1664.
- Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, Luciani P, Peri A, Mantovani G, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania A (2006) Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer* 13:955–962.
- Filevich O, Salierno M, Etchenique R (2010) A caged nicotine with nanosecond range kinetics and visible light sensitivity. *J Inorg Biochem* 104:1248–1251.
- Finnegan JM, Pihel K, Cahill PS, Huang L, Zerby SE, Ewing AG, Kennedy RT, Wightman RM (1996) Vesicular quantal size measured by amperometry at chromaffin, mast, pheochromocytoma, and pancreatic beta-cells. *J Neurochem* 66:1914–1923.
- Fishbein L et al. (2017) Comprehensive Molecular Characterization of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancer Cell* 31:181–193.
- Flávio Rocha M, Faramarzi-Roques R, Tazuin-Fin P, Vallee V, Leitao de Vasconcelos PR, Ballanger P (2004) Laparoscopic surgery for pheochromocytoma. *Eur Urol* 45:226–232.
- Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, Culler MD, Pfeffer U, Noonan DM, Schettini G, Albini A (2003) Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology* 144:1574–1584.
- Flynn A, Benn D, Clifton-Bligh R, Robinson B, Trainer AH, James P, Hogg A, Waldeck K, George J, Li J, Fox SB, Gill AJ, McArthur G, Hicks RJ, Tothill RW (2015) The genomic landscape of phaeochromocytoma. *J Pathol* 236:78–89.

Freda PU (2002) Somatostatin analogs in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3013–3018.

Fulop T, Radabaugh S, Smith C (2005) Activity-dependent differential transmitter release in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 25:7324–7332.

G

Gabel M, Delavoie F, Demais V, Royer C, Bailly Y, Vitale N, Bader M-F, Chasserot-Golaz S (2015) Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J Cell Biol* 210:785–800.

Garg A, Sui P, Verheyden JM, Young LR, Sun X (2019) Consider the lung as a sensory organ: A tip from pulmonary neuroendocrine cells. *Curr Top Dev Biol* 132:67–89.

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-F (2004) Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: a role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol Biol Cell* 15:520–531.

Gasman S, Vitale N (2017) Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biol Cell* 109:381–390.

Gatto F, Feelders RA, Franck SE, van Koetsveld PM, Dogan F, Kros JM, Neggers SJCMM, van der Lely A-J, Lamberts SWJ, Ferone D, Hofland LJ (2017) In vitro head-to-head comparison between octreotide and pasireotide in GH-secreting pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*.

Germain A, Klein M, Brunaud L (2011) Surgical management of adrenal tumors. *J Visc Surg* 148:e250-261.

Ghosal S, Das S, Pang Y, Gonzales MK, Huynh T-T, Yang Y, Taieb D, Crona J, Shankavaram UT, Pacak K (2020) Long intergenic noncoding RNA profiles of pheochromocytoma and paraganglioma: A novel prognostic biomarker. *Int J Cancer* 146:2326–2335.

Giardino E, Catalano R, Mangili F, Barbieri AM, Treppiedi D, Elli FM, Dolci A, Contarino A, Spada A, Arosio M, Mantovani G, Peverelli E (2021) Octreotide and pasireotide effects on medullary thyroid carcinoma (MTC) cells growth, migration and invasion. *Mol Cell Endocrinol* 520:111092.

Gill AJ (2018) Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient neoplasia. *Histopathology* 72:106–116.

- Gladychева SE, Ho CS, Lee YYF, Stuenkel EL (2004) Regulation of syntaxin1A-munc18 complex for SNARE pairing in HEK293 cells. *J Physiol* 558:857–871.
- Gola M, Bonadonna S, Mazziotti G, Amato G, Giustina A (2006) Resistance to somatostatin analogs in acromegaly: an evolving concept? *J Endocrinol Invest* 29:86–93.
- 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.
- Graham MM, Gu X, Ginader T, Breheny P, Sunderland JJ (2017) 68Ga-DOTATOC Imaging of Neuroendocrine Tumors: A Systematic Review and Metaanalysis. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med* 58:1452–1458.
- Grant M, Alturaihi H, Jaquet P, Collier B, Kumar U (2008) Cell growth inhibition and functioning of human somatostatin receptor type 2 are modulated by receptor heterodimerization. *Mol Endocrinol Baltim Md* 22:2278–2292.
- Gratzl M, Breckner M, Prinz C (2004) Mechanisms of storage and exocytosis in neuroendocrine tumors. *Endocr Pathol* 15:1–16.
- Greene LA, Rein G (1977) Release of (3H)norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation. *Brain Res* 138:521–528.
- Grossrubatscher E, Dalino P, Vignati F, Gambacorta M, Pugliese R, Boniardi M, Rossetti O, Marocchi A, Bertuzzi M, Loli P (2006) The role of chromogranin A in the management of patients with phaeochromocytoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65:287–293.
- Gruber LM, Jasim S, Ducharme-Smith A, Weingarten T, Young WF, Bancos I (2021) The Role for Metyrosine in the Treatment of Patients With Pheochromocytoma and Paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 106:e2393–e2401.
- Gruber M, Simon MC (2006) Hypoxia-inducible factors, hypoxia, and tumor angiogenesis. *Curr Opin Hematol* 13:169–174.
- Grundschober C, Malosio ML, Astolfi L, Giordano T, Nef P, Meldolesi J (2002) Neurosecretion competence. A comprehensive gene expression program identified in PC12 cells. *J Biol Chem* 277:36715–36724.
- Guérineau NC (2020) Cholinergic and peptidergic neurotransmission in the adrenal medulla: A dynamic control of stimulus-secretion coupling. *IUBMB Life* 72:553–567.
- Guillemot J, Anouar Y, Montero-Hadjadje M, Grouzmann E, Grumolato L, Roshmaninho-Salgado J, Turquier V, Duparc C, Lefebvre H, Plouin P-F, Klein M, Muresan M, Chow BKC, Vaudry H, Yon L (2006) Circulating EM66 is a

highly sensitive marker for the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. *Int J Cancer* 118:2003–2012.

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.

Gumbs AA, Gagner M (2006) Laparoscopic adrenalectomy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:483–499.

Günther T, Tulipano G, Dournaud P, Bousquet C, Csaba Z, Kreienkamp H-J, Lupp A, Korbonits M, Castaño JP, Wester H-J, Culler M, Melmed S, Schulz S (2018) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev* 70:763–835.

Gupta G, Pacak K, AACE Adrenal Scientific Committee (2017) PRECISION MEDICINE: AN UPDATE ON GENOTYPE/BIOCHEMICAL PHENOTYPE RELATIONSHIPS IN PHEOCHROMOCYTOMA/PARAGANGLIOMA PATIENTS. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* 23:690–704.

H

Harris M, Chung F (2013) Complications of general anesthesia. *Clin Plast Surg* 40:503–513.

Hashimoto K, Masumori N, Tanaka T, Maeda T, Kobayashi K, Kitamura H, Hirata K, Tsukamoto T (2013) Zoledronic acid but not somatostatin analogs exerts anti-tumor effects in a model of murine prostatic neuroendocrine carcinoma of the development of castration-resistant prostate cancer. *The Prostate* 73:500–511.

Hata J, Haga N, Ishibashi K, Takahashi N, Ogawa S, Kataoka M, Akaihata H, Satoh Y, Koguchi T, Kojima Y (2014) Sunitinib for refractory malignant pheochromocytoma: two case reports. *Int Urol Nephrol* 46:1309–1312.

Helle KB (2004) The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc* 79:769–794.

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 Baltim Md* 20:1935–1947.

Hernández-Guijo JM, Gandía L, Cuchillo-Ibáñez I, Albillos A, Novalbos J, Gilsanz F, Larrañaga E, de Pascual R, Abad F, García AG (2000) Altered regulation of

- calcium channels and exocytosis in single human pheochromocytoma cells. *Pflugers Arch* 440:253–263.
- Herrera-Martínez AD, van den Dungen R, Dogan-Oruc F, van Koetsveld PM, Culler MD, de Herder WW, Luque RM, Feelders RA, Hofland LJ (2019) Effects of novel somatostatin-dopamine chimeric drugs in 2D and 3D cell culture models of neuroendocrine tumors. *Endocr Relat Cancer* 26:585–599.
- Hofland LJ, van der Hoek J, Feelders R, van Aken MO, van Koetsveld PM, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckbecker G, de Herder WW, Beckers A, Lamberts SWJ (2005) The multi-ligand somatostatin analogue SOM230 inhibits ACTH secretion by cultured human corticotroph adenomas via somatostatin receptor type 5. *Eur J Endocrinol* 152:645–654.
- Hofland LJ, van der Hoek J, van Koetsveld PM, de Herder WW, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckbecker G, Feelders R, van der Lely A-J, Beckers A, Lamberts SWJ (2004a) The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1577–1585.
- Hofland LJ, van der Hoek J, van Koetsveld PM, de Herder WW, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckbecker G, Feelders R, van der Lely A-J, Beckers A, Lamberts SWJ (2004b) The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1577–1585.
- Holthouse DJ, Robbins PD, Kahler R, Knuckey N, Pullan P (2001) Corticotroph pituitary carcinoma: case report and literature review. *Endocr Pathol* 12:329–341.
- Hone AJ, McIntosh JM, Azam L, Lindstrom J, Lucero L, Whiteaker P, Passas J, Blázquez J, Albillos A (2015) α -Conotoxins Identify the $\alpha 3\beta 4^*$ Subtype as the Predominant Nicotinic Acetylcholine Receptor Expressed in Human Adrenal Chromaffin Cells. *Mol Pharmacol* 88:881–893.
- Hone AJ, Michael McIntosh J, Rueda-Ruzafa L, Passas J, de Castro-Guerín C, Blázquez J, González-Enguita C, Albillos A (2017) Therapeutic concentrations of varenicline in the presence of nicotine increase action potential firing in human adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 140:37–52.
- Hsu C-H et al. (2015) Chromogranin A levels and mortality in patients with severe sepsis. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem* 20:171–176.
- Huh YH, Jeon SH, Yoo SH (2003) Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem* 278:40581–40589.

I

- Ibáñez-Costa A, Rivero-Cortés E, Vázquez-Borrego MC, Gahete MD, Jiménez-Reina L, Venegas-Moreno E, de la Riva A, Arráez MÁ, González-Molero I, Schmid HA, Maraver-Selfa S, Gavilán-Villarejo I, García-Arnés JA, Japón MA, Soto-Moreno A, Gálvez MA, Luque RM, Castaño JP (2016) Octreotide and pasireotide (dis)similarly inhibit pituitary tumor cells in vitro. *J Endocrinol* 231:135–145.
- Improgo MRD, Schlichting NA, Cortes RY, Zhao-Shea R, Tapper AR, Gardner PD (2010) ASCL1 regulates the expression of the CHRNA5/A3/B4 lung cancer susceptibility locus. *Mol Cancer Res MCR* 8:194–203.
- Inoue M, Kuriyama H (1991) Somatostatin inhibits the nicotinic receptor-activated inward current in guinea pig chromaffin cells. *Biochem Biophys Res Commun* 174:750–757.
- Invitti C, De Martin I, Bolla GB, Pecori G, Giraldi F, Maestri E, Leonetti G, Cavagnini F (1993) Effect of octreotide on catecholamine plasma levels in patients with chromaffin cell tumors. *Horm Res* 40:156–160.
- Ivanidze J, Roytman M, Sasson A, Skafida M, Fahey TJ, Osborne JR, Dutruel SP (2019) Molecular imaging and therapy of somatostatin receptor positive tumors. *Clin Imaging* 56:146–154.

J

- Jain A, Baracco R, Kapur G (2020) Pheochromocytoma and paraganglioma-an update on diagnosis, evaluation, and management. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 35:581–594.
- Jaques S, Tobes MC (1986) Morphologic and biochemical variability of tissue and cultured cells from human pheochromocytoma. *J Cell Physiol* 128:261–270.
- Jensen AA, Frølund B, Liljefors T, Krogsgaard-Larsen P (2005) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *J Med Chem* 48:4705–4745.
- Jiang J et al. (2020) Sino-European Differences in the Genetic Landscape and Clinical Presentation of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab* 105.
- Jimenez C, Rohren E, Habra MA, Rich T, Jimenez P, Ayala-Ramirez M, Baudin E (2013) Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Curr Oncol Rep* 15:356–371.
- Jimenez T, Friedman T, Vadgama J, Singh V, Tucker A, Collazo J, Sinha S, Hikim AS, Singh R, Pervin S (2020) Nicotine Synergizes with High-Fat Diet to Induce

an Anti-Inflammatory Microenvironment to Promote Breast Tumor Growth. *Mediators Inflamm* 2020:5239419.

- Job S, Georges A, Burnichon N, Buffet A, Amar L, Bertherat J, Bouatia-Naji N, de Reyniès A, Drui D, Lussey-Lepoutre C, Favier J, Gimenez-Roqueplo A-P, Castro-Vega LJ (2020) Transcriptome Analysis of lncRNAs in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab* 105.
- Jochmanova I, Pacak K (2018) Genomic Landscape of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Trends Cancer* 4:6–9.
- Johnson JL, Ellis BA, Noack D, Seabra MC, Catz SD (2005) The Rab27a-binding protein, JFC1, regulates androgen-dependent secretion of prostate-specific antigen and prostatic-specific acid phosphatase. *Biochem J* 391:699–710.
- Johnson RG (1988) Accumulation of biological amines into chromaffin granules: a model for hormone and neurotransmitter transport. *Physiol Rev* 68:232–307.
- Joshua AM, Ezzat S, Asa SL, Evans A, Broom R, Freeman M, Knox JJ (2009) Rationale and evidence for sunitinib in the treatment of malignant paraganglioma/pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 94:5–9.
- Juhlin CC, Skoglund S, Juntti-Berggren L, Karlberg M, Calissendorff J (2019) Non-functioning neuroendocrine pancreatic tumors transforming to malignant insulinomas - four cases and review of the literature. *Neuro Endocrinol Lett* 40:175–183.

K

- Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB (2004) The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocr Rev* 25:458–511.
- Kanakakis G, Grimelius L, Spathis A, Tringidou R, Rassidakis GZ, Öberg K, Kaltsas G, Tsolakis AV (2015) Expression of Somatostatin Receptors 1-5 and Dopamine Receptor 2 in Lung Carcinoids: Implications for a Therapeutic Role. *Neuroendocrinology* 101:211–222.
- Kemppainen RJ, Behrend EN (1997) Adrenal physiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27:173–186.
- 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 Off J Soc Neurosci* 25:6958–6961.
- Kitlinska J (2007) Neuropeptide Y in neural crest-derived tumors: effect on growth and vascularization. *Cancer Lett* 245:293–302.

- Kögel T, Gerdes H-H (2010) Maturation of secretory granules. *Results Probl Cell Differ* 50:1–20.
- Kopf D, Bockisch A, Steinert H, Hahn K, Beyer J, Neumann HP, Hensen J, Lehnert H (1997) Octreotide scintigraphy and catecholamine response to an octreotide challenge in malignant pheochromocytoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 46:39–44.
- Koriyama N, Kakei M, Yaekura K, Okui H, Yamashita T, Nishimura H, Matsushita S, Tei C (2000) Control of catecholamine release and blood pressure with octreotide in a patient with pheochromocytoma: a case report with in vitro studies. *Horm Res* 53:46–50.
- Korse CM, Muller M, Taal BG (2011) Discontinuation of proton pump inhibitors during assessment of chromogranin A levels in patients with neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 105:1173–1175.
- Kreienkamp HJ, Roth A, Richter D (1998) Rat somatostatin receptor subtype 4 can be made sensitive to agonist-induced internalization by mutation of a single threonine (residue 331). *DNA Cell Biol* 17:869–878.
- Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM (1968) Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* 83:783–790.
- Kudva YC, Sawka AM, Young WF (2003) Clinical review 164: The laboratory diagnosis of adrenal pheochromocytoma: the Mayo Clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4533–4539.
- Kvols LK, Oberg KE, O'Dorisio TM, Mohideen P, de Herder WW, Arnold R, Hu K, Zhang Y, Hughes G, Anthony L, Wiedenmann B (2012) Pasireotide (SOM230) shows efficacy and tolerability in the treatment of patients with advanced neuroendocrine tumors refractory or resistant to octreotide LAR: results from a phase II study. *Endocr Relat Cancer* 19:657–666.

L

- Lamarre-Cliche M, Gimenez-Roqueplo A-P, Billaud E, Baudin E, Luton J-P, Plouin P-F (2002) Effects of slow-release octreotide on urinary metanephrine excretion and plasma chromogranin A and catecholamine levels in patients with malignant or recurrent pheochromocytoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57:629–634.
- Lamberts SWJ, Hofland LJ (2019) ANNIVERSARY REVIEW: Octreotide, 40 years later. *Eur J Endocrinol* 181:R173–R183.
- Leibowitz-Amit R, Lebowitz-Amit R, Mete O, Asa SL, Ezzat S, Joshua AM (2014) Malignant pheochromocytoma secreting vasoactive intestinal peptide and response to sunitinib: a case report and literature review. *Endocr Pract Off J Am Coll Endocrinol Am Assoc Clin Endocrinol* 20:e145-150.

- Leijon H, Remes S, Hagström J, Louhimo J, Mäenpää H, Schalin-Jäntti C, Miettinen M, Haglund C, Arola J (2019) Variable somatostatin receptor subtype expression in 151 primary pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Pathol* 86:66–75.
- Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, Gimenez-Roqueplo A-P, Grebe SKG, Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF, Endocrine Society (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 Lond Engl* 366:665–675.
- Lenders JWM, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, Keiser HR, Goldstein DS, Eisenhofer G (2002) Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA* 287:1427–1434.
- Leoncini E, Carioli G, La Vecchia C, Boccia S, Rindi G (2016) Risk factors for neuroendocrine neoplasms: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 27:68–81.
- Letouzé E, Martinelli C, Lorient 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.
- Liu D, Martino G, Thangaraju M, Sharma M, Halwani F, Shen SH, Patel YC, Srikant CB (2000) Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275:9244–9250.
- Livett BG, Boksa P (1984) Receptors and receptor modulation in cultured chromaffin cells. *Can J Physiol Pharmacol* 62:467–476.
- Lo CY, Lam KY, Wat MS, Lam KS (2000) Adrenal pheochromocytoma remains a frequently overlooked diagnosis. *Am J Surg* 179:212–215.
- Loh YP, Kim T, Rodriguez YM, Cawley NX (2004) Secretory granule biogenesis and neuropeptide sorting to the regulated secretory pathway in neuroendocrine cells. *J Mol Neurosci* 22:63–71.
- Low MJ (2004) The somatostatin neuroendocrine system: physiology and clinical relevance in gastrointestinal and pancreatic disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18:607–622.
- Ludvigsen E, Stridsberg M, Taylor JE, Culler MD, Oberg K, Janson ET, Sandler S (2007) Regulation of insulin and glucagon secretion from rat pancreatic islets in vitro by somatostatin analogues. *Regul Pept* 138:1–9.

M

- Ma C, Li W, Xu Y, Rizo J (2011) Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat Struct Mol Biol* 18:542–549.
- Ma X, Li M, Tong A, Wang F, Cui Y, Zhang X, Zhang Y, Chen S, Li Y (2020) Genetic and Clinical Profiles of Pheochromocytoma and Paraganglioma: A Single Center Study. *Front Endocrinol* 11:574662.
- Mahapatra S, Calorio C, Vandael DHF, Marcantoni A, Carabelli V, Carbone E (2012) Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. *Cell Calcium* 51:321–330.
- Malacombe M, Bader M-F, Gasman S (2006) Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin. *Biochim Biophys Acta* 1763:1175–1183.
- Malcolm (2016) *Neuroendocrinology*. :109–175.
- Mamilla D, Araque KA, Brofferio A, Gonzales MK, Sullivan JN, Nilubol N, Pacak K (2019) Postoperative Management in Patients with Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers* 11.
- Mañas-Martínez AB, Aragonese-Calvo A, Matei A, Ojeda-Rodríguez S, García-Durruti P (2016) Venlafaxine drug interaction in the diagnosis of pheochromocytoma. *Endocrinol Nutr Organo Soc Espanola Endocrinol Nutr* 63:569–570.
- Mariniello B, Finco I, Sartorato P, Patalano A, Iacobone M, Guzzardo V, Fassina A, Mantero F (2011) Somatostatin receptor expression in adrenocortical tumors and effect of a new somatostatin analog SOM230 on hormone secretion in vitro and in ex vivo adrenal cells. *J Endocrinol Invest* 34:e131-138.
- Mazziotti G, Floriani I, Bonadonna S, Torri V, Chanson P, Giustina A (2009) Effects of somatostatin analogs on glucose homeostasis: a metaanalysis of acromegaly studies. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1500–1508.
- Mazziotti G, Mosca A, Frara S, Vitale G, Giustina A (2017) Somatostatin analogs in the treatment of neuroendocrine tumors: current and emerging aspects. *Expert Opin Pharmacother* 18:1679–1689.
- McNeil AR, Blok BH, Koelmeyer TD, Burke MP, Hilton JM (2000) Pheochromocytomas discovered during coronial autopsies in Sydney, Melbourne and Auckland. *Aust N Z J Med* 30:648–652.
- Melcescu E, Gannon AW, Parent AD, Fratkin JF, Nicholas WC, Koch CA, Galhom A (2013) Silent or Subclinical Corticotroph Pituitary Macroadenoma Transforming Into Cushing Disease: 11-Year Follow-up. *Neurosurgery* 72:E144-146.

- Meyer-Rochow GY, Jackson NE, Conaglen JV, Whittle DE, Kunnimalaiyaan M, Chen H, Westin G, Sandgren J, Stålborg P, Khanafshar E, Shibru D, Duh Q-Y, Clark OH, Kebebew E, Gill AJ, Clifton-Bligh R, Robinson BG, Benn DE, Sidhu SB (2010) MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets. *Endocr Relat Cancer* 17:835–846.
- Miller GM, Alexander JM, Bikkal HA, Katznelson L, Zervas NT, Klibanski A (1995) Somatostatin receptor subtype gene expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 80:1386–1392.
- Mitty HA (1988) Embryology, anatomy, and anomalies of the adrenal gland. *Semin Roentgenol* 23:271–279.
- Mizobe F, Kozousek V, Dean DM, Livett BG (1979) Pharmacological characterization of adrenal paraneurons: substance P and somatostatin as inhibitory modulators of the nicotinic response. *Brain Res* 178:555–566.
- Moaeen-ud-Din M, Yang LG (2009) Evolutionary history of the somatostatin and somatostatin receptors. *J Genet* 88:41–53.
- Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI (2010a) Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 31:169–188.
- Modlin IM, Pavel M, Kidd M, Gustafsson BI (2010b) Review article: somatostatin analogues in the treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine (carcinoid) tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 31:169–188.
- Moeller I, Bunn SJ, Marley PD (1989) Actions of somatostatin on perfused bovine adrenal glands and cultured bovine adrenal medullary cells. *Brain Res* 484:192–202.
- Mohamed A, Blanchard M-P, Albertelli M, Barbieri F, Brue T, Niccoli P, Delpero J-R, Monges G, Garcia S, Ferone D, Florio T, Enjalbert A, Moutardier V, Schonbrunn A, Gerard C, Barlier A, Saveanu A (2014) Pasireotide and octreotide antiproliferative effects and sst2 trafficking in human pancreatic neuroendocrine tumor cultures. *Endocr Relat Cancer* 21:691–704.
- Momboisse F, Lonchamp E, Calco V, Ceridono M, Vitale N, Bader M-F, Gasman S (2009) betaPIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *J Cell Sci* 122:798–806.
- 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.

- 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.
- Moog S, Houy S, Chevalier E, Ory S, Weryha G, Rame M, Klein M, Brunaud L, Gasman S, Cuny T (2018) 18F-FDOPA PET/CT Uptake Parameters Correlate with Catecholamine Secretion in Human Pheochromocytomas. *Neuroendocrinology* 107:228–236.
- Morgan A, Burgoyne RD (2004) Membrane traffic: controlling membrane fusion by modifying NSF. *Curr Biol* CB 14:R968-970.
- Mosharov EV, Sulzer D (2005) Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat Methods* 2:651–658.
- Muhammad A, Coopmans EC, Gatto F, Franck SE, Janssen JAMJL, van der Lely AJ, Hoffland LJ, Neggers SJCMM (2019) Pasireotide Responsiveness in Acromegaly Is Mainly Driven by Somatostatin Receptor Subtype 2 Expression. *J Clin Endocrinol Metab* 104:915–924.
- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Höllt V, Schulz S, Steinke R, Lehnert H (2003) Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab* 88:5150–5157.
- Murasawa S, Kageyama K, Sugiyama A, Ishigame N, Niioka K, Suda T, Daimon M (2014) Inhibitory effects of SOM230 on adrenocorticotrophic hormone production and corticotroph tumor cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol* 394:37–46.
- Myklejord DJ (2004) Undiagnosed pheochromocytoma: the anesthesiologist nightmare. *Clin Med Res* 2:59–62.

N

- Naranjo J, Dodd S, Martin YN (2017) Perioperative Management of Pheochromocytoma. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 31:1427–1439.
- Naruse M, Satoh F, Tanabe A, Okamoto T, Ichihara A, Tsuiki M, Katabami T, Nomura M, Tanaka T, Matsuda T, Imai T, Yamada M, Harada T, Kawata N, Takekoshi K (2018) Efficacy and safety of metyrosine in pheochromocytoma/paraganglioma: a multi-center trial in Japan. *Endocr J* 65:359–371.
- Neto LV, Machado E de O, Luque RM, Taboada GF, Marcondes JB, Chimelli LMC, Quintella LP, Niemeyer P, de Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR (2009) Expression analysis of dopamine receptor subtypes in normal human pituitaries, nonfunctioning pituitary adenomas and somatotropinomas, and the association between dopamine and somatostatin receptors with clinical

- response to octreotide-LAR in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1931–1937.
- Neumann HPH, Young WF, Eng C (2019) Pheochromocytoma and Paraganglioma. *N Engl J Med* 381:552–565.
- Nickell JR, Grinevich VP, Siripurapu KB, Smith AM, Dwoskin LP (2013) Potential therapeutic uses of mecamylamine and its stereoisomers. *Pharmacol Biochem Behav* 108:28–43.
- Nölting S, Ullrich M, Pietzsch J, Ziegler CG, Eisenhofer G, Grossman A, Pacak K (2019) Current Management of Pheochromocytoma/Paraganglioma: A Guide for the Practicing Clinician in the Era of Precision Medicine. *Cancers* 11.
- Nomine-Criqui C, Germain A, Ayav A, Bresler L, Brunaud L (2017) Robot-assisted adrenalectomy: indications and drawbacks. *Updat Surg* 69:127–133.
- Novartis Pharmaceuticals. Sandostatin LAR (Octreotide Acetate) Prescribing Information. 2012. Available from: https://www.novartis.us/sites/www.novartis.us/files/sandostatin_lar.pdf Accessed May 05, 2021.
- Novartis Pharmaceuticals. Signifor LAR Prescribing Information. 2014. Available from: https://www.novartis.us/sites/www.novartis.us/files/signifor_lar.pdf Accessed May 05, 2021.

P

- Pacak K (2007) Preoperative management of the pheochromocytoma patient. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4069–4079.
- Pamporaki C, Bursztyn M, Reimann M, Ziemssen T, Bornstein SR, Sweep FCGJ, Timmers H, Lenders JWM, Eisenhofer G (2014) Seasonal variation in plasma free normetanephrine concentrations: implications for biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol* 170:349–357.
- 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.
- Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL, Bussolati G (2002) Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. *Virchows Arch Int J Pathol* 440:461–475.
- Park JJ, Koshimizu H, Loh YP (2009) Biogenesis and transport of secretory granules to release site in neuroendocrine cells. *J Mol Neurosci* 37:151–159.

- Pasquali D, Rossi V, Conzo G, Pannone G, Bufo P, De Bellis A, Renzullo A, Bellastella G, Colao A, Vallone G, Bellastella A, Sinisi AA (2008) Effects of somatostatin analog SOM230 on cell proliferation, apoptosis, and catecholamine levels in cultured pheochromocytoma cells. *J Mol Endocrinol* 40:263–271.
- Patel M, Santos P, Jong I, Nandurkar D, McKay J (2010) Malignant pheochromocytoma metastasis to the breast shown on I-123 MIBG scan. *Clin Nucl Med* 35:816–817.
- Patel YC (1999) Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol* 20:157–198.
- Patel YC, Greenwood MT, Panetta R, Demchyshyn L, Niznik H, Srikant CB (1995) The somatostatin receptor family. *Life Sci* 57:1249–1265.
- Patel YC, Liu J-L, Galanopoulou A, Papachristou DN (2001) Production, Action, and Degradation of Somatostatin. In: *Handbook of Physiology - Section 7: The Endocrine System - Volume II: The Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism* (Terjung R, ed), pp 267–302. Oxford University Press.
- Pawlu C, Bausch B, Reisch N, Neumann HPH (2005) Genetic testing for pheochromocytoma-associated syndromes. *Ann Endocrinol* 66:178–185.
- Pearse AG, Takor TT (1976) Neuroendocrine embryology and the APUD concept. *Clin Endocrinol (Oxf)* 5 Suppl:229S-244S.
- Pelletier G, Dubé D, Puviani R (1977) Somatostatin: electron microscope immunohistochemical localization in secretory neurons of rat hypothalamus. *Science* 196:1469–1470.
- Pérez-Alvarez A, Albillos A (2007) Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *J Neurochem* 103:2281–2290.
- Pérez-Alvarez A, Hernández-Vivanco A, Albillos A (2010) Past, present and future of human chromaffin cells: role in physiology and therapeutics. *Cell Mol Neurobiol* 30:1407–1415.
- Petersenn S, Bollerslev J, Arafat AM, Schopohl J, Serri O, Katznelson L, Lasher J, Hughes G, Hu K, Shen G, Reséndiz KH, Giannone V, Beckers A (2014a) Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of pasireotide LAR in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, open-label, phase I study. *J Clin Pharmacol* 54:1308–1317.
- Petersenn S, Farrall AJ, De Block C, Block C, Melmed S, Schopohl J, Caron P, Cuneo R, Kleinberg D, Colao A, Ruffin M, Hermosillo Reséndiz K, Hughes G, Hu K, Barkan A (2014b) Long-term efficacy and safety of subcutaneous pasireotide in acromegaly: results from an open-ended, multicenter, Phase II extension study. *Pituitary* 17:132–140.

- Petersenn S, Schopohl J, Barkan A, Mohideen P, Colao A, Abs R, Buchelt A, Ho Y-Y, Hu K, Farrall AJ, Melmed S, Biller BMK, Pasireotide Acromegaly Study Group (2010) Pasireotide (SOM230) demonstrates efficacy and safety in patients with acromegaly: a randomized, multicenter, phase II trial. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2781–2789.
- Petersenn S, Unger N, Hu K, Weisshaar B, Zhang Y, Bouillaud E, Reséndiz KH, Wang Y, Mann K (2012) Pasireotide (SOM230), a novel multireceptor-targeted somatostatin analogue, is well tolerated when administered as a continuous 7-day subcutaneous infusion in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 52:1017–1027.
- Pfeiffer M, Koch T, Schröder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Höllt V, Schulz S (2001) Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). *J Biol Chem* 276:14027–14036.
- Pfeiffer M, Koch T, Schröder H, Laugsch M, Höllt V, Schulz S (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 277:19762–19772.
- Pillai S, Gopalan V, Smith RA, Lam AK-Y (2016) Updates on the genetics and the clinical impacts on pheochromocytoma and paraganglioma in the new era. *Crit Rev Oncol Hematol* 100:190–208.
- Pinheiro PS, Houy S, Sørensen JB (2016) C2-domain containing calcium sensors in neuroendocrine secretion. *J Neurochem* 139:943–958.
- Pivonello R, Ferrigno R, De Martino MC, Simeoli C, Di Paola N, Pivonello C, Barba L, Negri M, De Angelis C, Colao A (2020) Medical Treatment of Cushing's Disease: An Overview of the Current and Recent Clinical Trials. *Front Endocrinol* 11:648.
- Plattner H, Artalejo AR, Neher E (1997) Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol* 139:1709–1717.
- Plouin PF, Amar L, Dekkers OM, Fassnacht M, Gimenez-Roqueplo AP, Lenders JWM, Lussey-Lepoutre C, Steichen O, Guideline Working Group (2016) European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for long-term follow-up of patients operated on for a pheochromocytoma or a paraganglioma. *Eur J Endocrinol* 174:G1–G10.
- Plouin PF, Bertherat J, Chatellier G, Billaud E, Azizi M, Grouzmann E, Epelbaum J (1995) Short-term effects of octreotide on blood pressure and plasma catecholamines and neuropeptide Y levels in patients with pheochromocytoma: a placebo-controlled trial. *Clin Endocrinol (Oxf)* 42:289–294.

Press D, Akyuz M, Dural C, Aliyev S, Monteiro R, Mino J, Mitchell J, Hamrahian A, Siperstein A, Berber E (2014) Predictors of recurrence in pheochromocytoma. *Surgery* 156:1523–1527; discussion 1527-1528.

Prunier C, Hocevar BA, Howe PH (2004) Wnt Signaling: Physiology and Pathology. *Growth Factors* 22:141–150.

Pu J, Zhang X, Luo H, Xu L, Lu X, Lu J (2017) Adrenaline promotes epithelial-to-mesenchymal transition via HuR-TGF β regulatory axis in pancreatic cancer cells and the implication in cancer prognosis. *Biochem Biophys Res Commun* 493:1273–1279.

Q

Quinn TJ, Yuan Z, Adem A, Geha R, Vrikshajanani C, Koba W, Fine E, Hughes DT, Schmid HA, Libutti SK (2012) Pasireotide (SOM230) is effective for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) in a multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) conditional knockout mouse model. *Surgery* 152:1068–1077.

R

Radke KJ, Izzo JL (2010) Seasonal variation in haemodynamics and blood pressure-regulating hormones. *J Hum Hypertens* 24:410–416.

Rai U, Thrimawithana TR, Valery C, Young SA (2015) Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacol Ther* 152:98–110.

Reubi JC, Waser B (2003) Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 30:781–793.

Ribeiro L, Martel F, Azevedo I (2006) The release of 3H-1-methyl-4-phenylpyridinium from bovine adrenal chromaffin cells is modulated by somatostatin. *Regul Pept* 137:107–113.

Ribeiro L, Martel F, Azevedo I (2007) Short-term exposure to somatostatin or muscarinic agonists reduce acetylcholine-induced 3H-MPP⁺ release from bovine adrenal medullary cells. *J Biomed Sci* 14:347–355.

Righi L, Volante M, Tavaglione V, Billè A, Daniele L, Angusti T, Inzani F, Pelosi G, Rindi G, Papotti M (2010) Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 “clinically aggressive” cases. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 21:548–555.

- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000a) Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* 288:154–157.
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Sasi R, Patel RC, Patel YC (2000b) Subtypes of the somatostatin receptor assemble as functional homo- and heterodimers. *J Biol Chem* 275:7862–7869.
- Role LW, Leeman SE, Perlman RL (1981) Somatostatin and substance P inhibit catecholamine secretion from isolated cells of guinea-pig adrenal medulla. *Neuroscience* 6:1813–1821.
- Roman-Gonzalez A, Jimenez C (2017) Malignant pheochromocytoma-paraganglioma: pathogenesis, TNM staging, and current clinical trials. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 24:174–183.
- Roosterman D, Kempkes C, Cottrell GS, Padilla BE, Bunnett NW, Turck CW, Steinhoff M (2008) Endothelin-converting enzyme-1 degrades internalized somatostatin-14. *Endocrinology* 149:2200–2207.
- Rubin de Celis Ferrari AC, Glasberg J, Riechelmann RP (2018) Carcinoid syndrome: update on the pathophysiology and treatment. *Clin Sao Paulo Braz* 73:e490s.
- 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.
- Ruff SM, Ayabe RI, Malekzadeh P, Good ML, Wach MM, Gonzales MK, Tirosh A, Nilubol N, Pacak K, Kebebew E, Patel D (2019) MicroRNA-210 May Be a Preoperative Biomarker of Malignant Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Surg Res* 243:1–7.

S

- Sanli Y, Garg I, Kandathil A, Kendi T, Zanetti MJB, Kuyumcu S, Subramaniam RM (2018) Neuroendocrine Tumor Diagnosis and Management: 68Ga-DOTATATE PET/CT. *AJR Am J Roentgenol* 211:267–277.
- Saveanu A, Muresan M, De Micco C, Taieb D, Germanetti A-L, Sebag F, Henry J-F, Brunaud L, Enjalbert A, Weryha G, Barlier A (2011) Expression of somatostatin receptors, dopamine D₂ receptors, noradrenaline transporters, and vesicular monoamine transporters in 52 pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer* 18:287–300.
- Schmid HA (2008) Pasireotide (SOM230): development, mechanism of action and potential applications. *Mol Cell Endocrinol* 286:69–74.
- Schneider F, Marban C, Ajob G, Helle S, Guillot M, Launoy A, Maestraggi Q, Scavello F, Rohr O, Metz-Boutigue M-H (2018) In Trauma Patients, the Occurrence of Early-Onset Nosocomial Infections is Associated With

- Increased Plasma Concentrations of Chromogranin A. *Shock Augusta Ga* 49:522–528.
- Schubert ML (2015) Functional anatomy and physiology of gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 31:479–485.
- Segura F, Brioso MA, Gómez JF, Machado JD, Borges R (2000) Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *J Neurosci Methods* 103:151–156.
- Sharma K, Patel YC, Srikant CB (1996) Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol Baltim Md* 10:1688–1696.
- Shen C, Gu D, Zhou S, Xu Y, Sarshekeh AM, Halperin D, Shih Y-CT, Yao JC, Dasari A (2019) Racial Differences in the Incidence and Survival of Patients With Neuroendocrine Tumors. *Pancreas* 48:1373–1379.
- Shimon I, Adnan Z, Gorshtein A, Baraf L, Saba Khazen N, Gershinsky M, Pauker Y, Abid A, Niven MJ, Shechner C, Greenman Y (2018) Efficacy and safety of long-acting pasireotide in patients with somatostatin-resistant acromegaly: a multicenter study. *Endocrine* 62:448–455.
- Silverstein JM (2016) Hyperglycemia induced by pasireotide in patients with Cushing's disease or acromegaly. *Pituitary* 19:536–543.
- Simon R (2015) Sensitivity, Specificity, PPV, and NPV for Predictive Biomarkers. *J Natl Cancer Inst* 107.
- Smalley KS, Feniuk W, Sellers LA, Humphrey PP (1999) The pivotal role of phosphoinositide-3 kinase in the human somatostatin sst(4) receptor-mediated stimulation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase and extracellular acidification. *Biochem Biophys Res Commun* 263:239–243.
- Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER (2003) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63:214–221.
- Sonntagbauer M, Koch A, Strouhal U, Zacharowski K, Weber CF (2018) Catecholamine crisis during induction of general anesthesia: A case report. *Anaesthesist* 67:209–215.
- Srikant CB (1995) Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 209:400–406.
- Srinivasan R, Kini U, Babu MK, Jayaseelan E, Pradeep R (2002) Malignant pheochromocytoma with cutaneous metastases presenting with hemolytic anemia and pyrexia of unknown origin. *J Assoc Physicians India* 50:731–733.

- Stenström G, Waldenström J (1985) Positive correlation between urinary excretion of catecholamine metabolites and tumour mass in pheochromocytoma. Results in patients with sustained and paroxysmal hypertension and multiple endocrine neoplasia. *Acta Med Scand* 217:73–77.
- Streit L, Brunaud L, Vitale N, Ory S, Gasman S (2020) Hormones Secretion and Rho GTPases in Neuroendocrine Tumors. *Cancers* 12.
- Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET (2003) A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *J Endocrinol* 177:337–341.
- Stridsberg M, Husebye ES (1997) Chromogranin A and chromogranin B are sensitive circulating markers for phaeochromocytoma. *Eur J Endocrinol* 136:67–73.
- Strong VE, Kennedy T, Al-Ahmadie H, Tang L, Coleman J, Fong Y, Brennan M, Ghossein RA (2008) Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis. *Surgery* 143:759–768.
- Strosberg J et al. (2017) Phase 3 Trial of 177Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *N Engl J Med* 376:125–135.
- Stueven AK, Kayser A, Wetz C, Amthauer H, Wree A, Tacke F, Wiedenmann B, Roderburg C, Jann H (2019) Somatostatin Analogues in the Treatment of Neuroendocrine Tumors: Past, Present and Future. *Int J Mol Sci* 20.
- Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474–477.
- Susini C, Buscail L (2006) Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 17:1733–1742.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R, Brunger AT (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395:347–353.

T

- Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Guimarães RFC, Marcondes JB, Chimelli LMC, Fontes R, Mata PJP, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR (2007) Quantitative analysis of somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* 156:65–74.
- Tahara S, Murakami M, Kaneko T, Shimatsu A (2017) Efficacy and safety of long-acting pasireotide in Japanese patients with acromegaly or pituitary gigantism: results from a multicenter, open-label, randomized, phase 2 study. *Endocr J* 64:735–747.

- Takeuchi T, Hosaka M (2008) Sorting mechanism of peptide hormones and biogenesis mechanism of secretory granules by secretogranin III, a cholesterol-binding protein, in endocrine cells. *Curr Diabetes Rev* 4:31–38.
- Tanguy E, Carmon O, Wang Q, Jeandel L, Chasserot-Golaz S, Montero-Hadjadje M, Vitale N (2016) Lipids implicated in the journey of a secretory granule: from biogenesis to fusion. *J Neurochem* 137:904–912.
- Tanguy E, Costé de Bagneaux P, Kassas N, Ammar M-R, Wang Q, Haeberlé A-M, Raherindratsara J, Fouillen L, Renard P-Y, Montero-Hadjadje M, Chasserot-Golaz S, Ory S, Gasman S, Bader M-F, Vitale N (2020) Mono- and Polyunsaturated Phosphatidic Acid Regulate Distinct Steps of Regulated Exocytosis in Neuroendocrine Cells. *Cell Rep* 32:108026.
- Tank AW, Lee Wong D (2015) Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol* 5:1–15.
- Tauzin-Fin P, Barrucand K, Sesay M, Rouillet S, Gosse P, Bernhard J-C, Robert G, Sztark F (2020) Peri-operative management of pheochromocytoma with intravenous urapidil to prevent hemodynamic instability: A 17-year experience. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol* 36:49–54.
- Thahouly T, Tanguy E, Raherindratsara J, Bader M-F, Chasserot-Golaz S, Gasman S, Vitale N (2021) Bovine Chromaffin Cells: Culture and Fluorescence Assay for Secretion. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2233:169–179.
- Theodoropoulou M, Stalla GK (2013) Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol* 34:228–252.
- Thouënnon E, Pierre A, Tanguy Y, Guillemot J, Manecka D-L, Guérin M, Ouafik L, Muresan M, Klein M, Bertherat J, Lefebvre H, Plouin P-F, Yon L, Anouar Y (2010) Expression of trophic amidated peptides and their receptors in benign and malignant pheochromocytomas: high expression of adrenomedullin RDC1 receptor and implication in tumoral cell survival. *Endocr Relat Cancer* 17:637–651.
- Thouënnon E, Pierre A, Yon L, Anouar Y (2010) Expression of trophic peptides and their receptors in chromaffin cells and pheochromocytoma. *Cell Mol Neurobiol* 30:1383–1389.
- Tischler AS, Lee YC, Perlman RL, Costopoulos D, Slayton VW, Bloom SR (1984) Production of “ectopic” vasoactive intestinal peptide-like and neurotensin-like immunoreactivity in human pheochromocytoma cell cultures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 4:1398–1404.
- Toonen RFG, Verhage M (2007) Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends Neurosci* 30:564–572.
- Tooze J (1991) Secretory granule formation. The morphologist’s view. *Cell Biophys* 19:117–130.

- Tooze SA, Martens GJ, Huttner WB (2001) Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol* 11:116–122.
- Treppiedi D, Giardino E, Catalano R, Mangili F, Vercesi P, Sala E, Locatelli M, Arosio M, Spada A, Mantovani G, Peverelli E (2019) Somatostatin analogs regulate tumor corticotrophs growth by reducing ERK1/2 activity. *Mol Cell Endocrinol* 483:31–38.
- Trifaró J-M, Gasman S, Gutiérrez LM (2008) Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol Oxf Engl* 192:165–172.
- Tsirlin A, Oo Y, Sharma R, Kansara A, Gliwa A, Banerji MA (2014) Pheochromocytoma: a review. *Maturitas* 77:229–238.
- Tsuta K, Wistuba II, Moran CA (2012) Differential expression of somatostatin receptors 1-5 in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract* 208:470–474.

U

- Umbrecht-Jenck E, Demais V, Calco V, Bailly Y, Bader M-F, Chasserot-Golaz S (2010) S100A10-mediated translocation of annexin-A2 to SNARE proteins in adrenergic chromaffin cells undergoing exocytosis. *Traffic Cph Den* 11:958–971.
- Unger N, Serdiuk I, Sheu S-Y, Walz MK, Schulz S, Saeger W, Schmid KW, Mann K, Petersenn S (2008) Immunohistochemical localization of somatostatin receptor subtypes in benign and malignant adrenal tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:850–857.
- 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.

V

- Vale W, Brazeau P, Rivier C, Brown M, Boss B, Rivier J, Burgus R, Ling N, Guillemin R (1975) Somatostatin. *Recent Prog Horm Res* 31:365–397.
- van Berkel A, Lenders JWM, Timmers HJLM (2014) Diagnosis of endocrine disease: Biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Endocrinol* 170:R109-119.
- van der Hoek J, Waaijers M, van Koetsveld PM, Sprij-Mooij D, Feelders RA, Schmid HA, Schoeffter P, Hoyer D, Cervia D, Taylor JE, Culler MD, Lamberts SWJ, Hofland LJ (2005) Distinct functional properties of native somatostatin receptor subtype 5 compared with subtype 2 in the regulation of ACTH release by corticotroph tumor cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E278-287.

- van Hoek M, Hofland LJ, de Rijke YB, van Nederveen FH, de Krijger RR, van Koetsveld PM, Lamberts SWJ, van der Lely AJ, de Herder WW, Feelders RA (2009) Effects of somatostatin analogs on a growth hormone-releasing hormone secreting bronchial carcinoid, in vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab* 94:428–433.
- van Hulsteijn LT, van Duinen N, Verbist BM, Jansen JC, van der Klaauw AA, Smit JWA, Corssmit EPM (2013) Effects of octreotide therapy in progressive head and neck paragangliomas: case series. *Head Neck* 35:E391–396.
- Vardjan N, Jorgacevski J, Zorec R (2013) Fusion pores, SNAREs, and exocytosis. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 19:160–174.
- Vaughan PF, Kaye DF, Reeve HL, Ball SG, Peers C (1993) Nicotinic receptor-mediated release of noradrenaline in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem* 60:2159–2166.
- Vergès B (2017) Effects of anti-somatostatin agents on glucose metabolism. *Diabetes Metab* 43:411–415.
- Vitale G, Dicitore A, Sciammarella C, Di Molfetta S, Rubino M, Faggiano A, Colao A (2018) Pasireotide in the treatment of neuroendocrine tumors: a review of the literature. *Endocr Relat Cancer* 25:R351–R364.
- 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.
- Vitale N, Caumont AS, Chasserot-Golaz S, Du G, Wu S, Sciorra VA, Morris AJ, Frohman MA, Bader MF (2001) Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J* 20:2424–2434.
- Vitale N, Mawet J, Camonis J, Regazzi R, Bader M-F, Chasserot-Golaz S (2005) The Small GTPase RalA controls exocytosis of large dense core secretory granules by interacting with ARF6-dependent phospholipase D1. *J Biol Chem* 280:29921–29928.

W

- Walls GV, Stevenson M, Soukup BS, Lines KE, Grossman AB, Schmid HA, Thakker RV (2016) Pasireotide Therapy of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1–Associated Neuroendocrine Tumors in Female Mice Deleted for an Men1 Allele Improves Survival and Reduces Tumor Progression. *Endocrinology* 157:1789–1798.
- Wang J, Wei G, Wang Z, Huang H (2019) Detection of severe hypertension in a patient with neurofibromatosis type 1 during anesthesia induction: a case report. *J Med Case Reports* 13:349.

- Wang J-S, Wang F-B, Zhang Q-G, Shen Z-Z, Shao Z-M (2008) Enhanced expression of Rab27A gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II. *Mol Cancer Res MCR* 6:372–382.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C (2003) Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2:999–1017.
- Werle M, Bernkop-Schnürch A (2006) Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 30:351–367.
- White MM, Reisine T (1990) Expression of functional pituitary somatostatin receptors in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:133–136.
- Wolin EM, Hu K, Hughes G, Bouillaud E, Giannone V, Resendiz KH (2013) Safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a long-acting release (LAR) formulation of pasireotide (SOM230) in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: results from a randomized, multicenter, open-label, phase I study. *Cancer Chemother Pharmacol* 72:387–395.
- Wolin EM, Jarzab B, Eriksson B, Walter T, Toumpanakis C, Morse MA, Tomassetti P, Weber MM, Fogelman DR, Ramage J, Poon D, Gadbow B, Li J, Pasiaka JL, Mahamat A, Swahn F, Newell-Price J, Mansoor W, Öberg K (2015) Phase III study of pasireotide long-acting release in patients with metastatic neuroendocrine tumors and carcinoid symptoms refractory to available somatostatin analogues. *Drug Des Devel Ther* 9:5075–5086.
- Wonnacott S, Barik J 2007 Nicotinic Ach receptors, *Toris biosciences*, Reviews No.28.
- Wu C-H, Lee C-H, Ho Y-S (2011) Nicotinic acetylcholine receptor-based blockade: applications of molecular targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17:3533–3541.

Y

- Yang EV, Kim S, Donovan EL, Chen M, Gross AC, Webster Marketon JI, Barsky SH, Glaser R (2009) Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain Behav Immun* 23:267–275.
- Yang S-K, Parkington HC, Blake AD, Keating DJ, Chen C (2005) Somatostatin increases voltage-gated K⁺ currents in GH3 cells through activation of multiple somatostatin receptors. *Endocrinology* 146:4975–4984.
- Y-Hassan S, Falhammar H (2020) Cardiovascular Manifestations and Complications of Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Med* 9 Available at:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7465968/> [Accessed May 3, 2021].

Young JM, Shytle RD, Sanberg PR, George TP (2001) Mecamylamine: new therapeutic uses and toxicity/risk profile. *Clin Ther* 23:532–565.

Z

Zatelli MC, Piccin D, Vignali C, Tagliati F, Ambrosio MR, Bondanelli M, Cimino V, Bianchi A, Schmid HA, Scanarini M, Pontecorvi A, De Marinis L, Maira G, degli Uberti EC (2007) Pasireotide, a multiple somatostatin receptor subtypes ligand, reduces cell viability in non-functioning pituitary adenomas by inhibiting vascular endothelial growth factor secretion. *Endocr Relat Cancer* 14:91–102.

Zeniou-Meyer M, Zabari N, Ashery U, Chasserot-Golaz S, Haeberlé A-M, Demais V, Bailly Y, Gottfried I, Nakanishi H, Neiman AM, Du G, Frohman MA, Bader M-F, Vitale N (2007) Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J Biol Chem* 282:21746–21757.

Zhang R, Gupta D, Albert SG (2017) Pheochromocytoma as a reversible cause of cardiomyopathy: Analysis and review of the literature. *Int J Cardiol* 249:319–323.

Zhao S, Torii S, Yokota-Hashimoto H, Takeuchi T, Izumi T (2002) Involvement of Rab27b in the regulated secretion of pituitary hormones. *Endocrinology* 143:1817–1824.

Zhu B, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP (2003) Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell* 4:191–196.

ANNEXES

ANNEXES

Listes des communications scientifiques

Streit L, Rame M, Houy S, Moog S, Brunaud L, Ory S, Vitale N, Gasman S
[Molecular mechanisms of hypersecretion and treatment of human pheochromocytoma.](#)

20^{ème} Journée scientifique régionale de la Ligue contre le cancer (France), novembre 2019

Streit L, Houy S, Moog S, Rame M, Hugel S, Brunaud L, Lomazzi S, Vix M, Mutter D, Lanoix J, Paramithiotis E, Vitale N, Ory S, Gasman S
[Analysis of uncontrolled calcium-regulated exocytosis in human pheochromocytoma cells.](#)

*23^{ème} Congrès annuel du Club Exocytose-Endocytose (en virtuel), juin 2021
(Obtention du prix de la meilleure présentation flash)*

Publication annexe

Revue

Streit L, Brunaud L, Vitale N, Ory S, Gasman S
[Hormones Secretion and Rho GTPases in Neuroendocrine Tumors \(2020\)](#)
Cancers (Basel), 10;12(7):1859.

Review

Hormones Secretion and Rho GTPases in Neuroendocrine Tumors

Laura Streit ¹, Laurent Brunaud ², Nicolas Vitale ¹ , Stéphane Ory ¹  and Stéphane Gasman ^{1,*} 

¹ Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France; laura.streit@inci-cnrs.unistra.fr (L.S.); vitalen@inci-cnrs.unistra.fr (N.V.); ory@inci-cnrs.unistra.fr (S.O.)

² Département de Chirurgie Viscérale, Métabolique et Cancérologique (CVMC), Unité Médico-chirurgicale de Chirurgie Métabolique, Endocrinienne et Thyroïdienne (UMET), Unité Médico-chirurgicale de Chirurgie de L'obésité (UMCO), Université de Lorraine, CHRU NANCY, Hôpital Brabois Adultes, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France; l.brunaud@chru-nancy.fr

* Correspondence: gasman@unistra.fr or sgasman@inci-cnrs.unistra.fr

Received: 5 June 2020; Accepted: 6 July 2020; Published: 10 July 2020



Abstract: Neuroendocrine tumors (NETs) belong to a heterogeneous group of neoplasms arising from hormone secreting cells. These tumors are often associated with a dysfunction of their secretory activity. Neuroendocrine secretion occurs through calcium-regulated exocytosis, a process that is tightly controlled by Rho GTPases family members. In this review, we compiled the numerous mutations and modification of expression levels of Rho GTPases or their regulators (Rho guanine nucleotide-exchange factors and Rho GTPase-activating proteins) that have been identified in NETs. We discussed how they might regulate neuroendocrine secretion.

Keywords: neuroendocrine tumors; Rho GTPases; hormone secretion; vesicular trafficking; mutations; expression changes

1. Introduction

Neuroendocrine tumors (NETs) constitute a group of neoplasms that arise from cells secreting hormones, amines, or peptides. This family of tumors is highly heterogeneous in terms of morphology and function mainly because neuroendocrine cells are spread all over the body (Figure 1). The diffuse neuroendocrine system includes the neuroendocrine cells dispersed in various organs such as the thyroid (C cells), gastrointestinal tract, gallbladder, pancreas (islet cells), the respiratory tract, lungs, thymus, kidneys, liver, prostate, skin, cervix, ovaries, and the testicles. Few types of neuroendocrine cells actually constitute full organs such as the pituitary, paraganglia, parathyroid, and adrenal gland. From a cell biology perspective, the main common features of all these specialized cells are their ability to synthesize, stock in vesicles, and secrete, through calcium-regulated exocytosis, hormones, peptides, or amines. NETs are often associated with a deregulation of hormones secretion mainly leading to hypersecretion [1,2]. NETs with initial low secretory activity can evolve to high secreting lesions having a negative impact on prognosis simply by progressively becoming hormonally active [3–8]. Hence, cellular secretory activity appears to be a key controller of tumor behavior. However, how secretion becomes uncontrolled in NETs remains poorly understood.

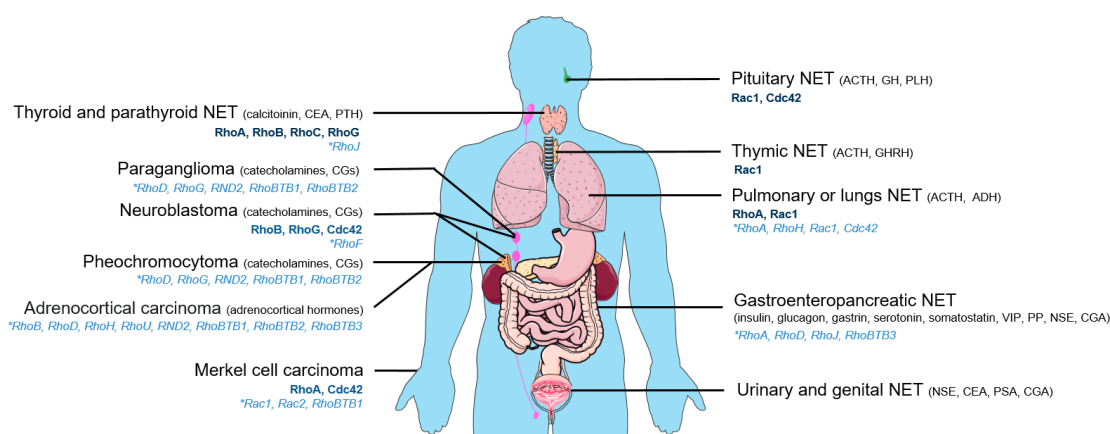


Figure 1. Main types of neuroendocrine tumors (NETs). Mutated Rho GTPases (light blue) or Rho GTPases for which expression level varies (dark blue) are indicated for each NET along with main secreted hormones. Hormone abbreviations: ACTH: adrenocorticotrophic hormone, ADH: antidiuretic hormone, CEA: carcinoembryonic antigen, CGA: chromogranin A, CGs: chromogranins, GH: growth hormone, GHRH: growth hormone releasing-hormone, NSE: neuron specific enolase, PLH: prolactin luteinizing hormone, PP: pancreatic polypeptide, PSA: prostate specific antigen, PTH: parathyroid hormone, VIP: vasoactive intestinal peptide.

Belonging to the Ras GTPase superfamily, the monomeric Rho (Ras homologous) GTPase family contains 20 highly conserved members divided into eight subfamilies (Rho, Rac, Cdc42, RhoD/F, Rnd, RhoU/V, RhoH, and RhoBTB) classified into two major groups. These include the canonical (Rho, Rac, Cdc42, and RhoD/F) and the atypical members (Rnd, RhoU/V, RhoH, and RhoBTB) [9,10]. In the last 10 years, many comprehensive reviews described Rho GTPases signaling as affecting a large array of cancer biology aspects through the control of important cellular processes including polarity, cell cycle progression, cytoskeleton organization, motility, and intracellular membrane trafficking [11–19]. Dysfunction of these crucial processes through aberrant Rho GTPases signaling can favor distinct steps of cancer progression from tumor initiation to tumor cell proliferation, invasion, and metastasis. Although such altered Rho GTPase signaling is linked to many types of cancer, to what extent pathways controlled by Rho GTPases are involved in NETs is still an open question. Seminal works from our team and others demonstrated that monomeric G proteins, including members of the Rho GTPases family, tightly control neuroendocrine secretion. However, the link between Rho GTPases and the NETs-associated deregulation of secretion remains largely unexplored. Here, we review the literature supporting the implication of Rho GTPases in NETs and discuss the possible links between Rho GTPases signaling and the regulation of neuroendocrine secretion.

2. Neuroendocrine Tumors and Rho GTPases

The first idea that usually comes to mind regarding the origin of tumors is genetic mutations. In contrast to other members of the Ras superfamily, Rho sub-family members were initially thought to be rarely mutated in cancer [20]. However, progress in advanced sequencing and better access to human samples allowed, in the last decade, the uncovering of many mutations in Rho GTPases (for review, see [12,17,20–25]). By searching the literature, we inventoried about 30 mutations or polymorphisms directly affecting Rho GTPases in NETs essentially in pheochromocytoma, paraganglioma, adrenocortical adenoma, small cell lung cancer, and Merkel cell carcinoma (Table 1, Figure 1, and Table S1). Surprisingly, besides the mutants Y42C-RhoA and P29S-Rac1, the impact of the other mutations on Rho activity and function remains unknown. P29S-Rac1 is a fast cycling mutant with spontaneous activation and therefore acts as a gain-of-function mutation [26,27]. The Y42C mutation reduces both intrinsic- and GAP-stimulated GTP hydrolysis of RhoA, thereby enhancing the

active GTP-bound form [28]. On the contrary, Wang et al. proposed that the Y42C mutation decreased the level of the activated GTP-associated form of RhoA [29].

Table 1. Mutations and polymorphisms of Rho GTPases in NETs.

Gene/Tumor	ACC	GCC-AC	MCC (–)	NBL	PLCNEC	PNET	PPGL	PTC	SCLC	SINET	References
RHOA		Y42C D49H							E40K		[30,31]
RHOB	D28H										[32]
RHOD	R174Q A165T					R110Q	E149K A173P				[32–35]
RHOF				K112 (fs)							[32]
RHOG							P139L				[32,34]
RHOH	A76E				P110A				S90 *		[30,32,36]
RHOJ								D8N		V25V	[32,37]
RHOV	S249Y										[32]
RND2	E168K						R169S R137T				[32]
RAC1			P29S		P92P						[36,38]
RAC2			R68W								[38]
CDC42									K184N		[30]
RHOBTB1	R670 *		P366S				A575C (fs)				[32,38,39]
RHOBTB2	Q12H						D461G				[32,39]
RHOBTB3	R607H					S50T					[32,35]

Note: fs: frameshift, * STOP codon. Tumor abbreviations: ACC: adrenocortical carcinoma, GCC-AC: goblet cell carcinoid—adenocarcinoma, MCC (–) Merkel cell carcinoma-MCPyV negative, NBL: neuroblastoma, PLCNEC: pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma, PNET: pancreatic neuroendocrine tumor, PPGL: pheochromocytoma and paraganglioma, PTC: parathyroid carcinoma, SCLC: small cell lung cancer, SINET: small intestine neuroendocrine tumor.

Beside mutations, variation in the expression levels of Rho GTPases has been described in many different types of tumors and at various stages of tumorigenesis (for previous key review articles, see [12,13,15,20,40–43]). However, only a few studies were performed in NETs, mainly in pituitary adenoma and neuroblastoma, as well as in tumors from the thyroid, parathyroid, and small cell lung. For instance, in pituitary adenoma, Rac1 overexpression and Cdc42 down-regulation may affect pathways controlling tumorigenesis such as mTOR- and Wnt-signalling pathways [44]. Arising from primitive cells of the sympathetic nervous systems, neuroblastoma is a common childhood extracranial solid tumor with neuroendocrine properties [45]. Although a large amount of molecular data were obtained from neuroblastoma, the situation appears complex as this tumor displays heterogeneous clinical behavior depending on multiple factors including tumor stage, patient age, and MYCN oncogene amplification. When these stratification parameters were used in these common childhood malignant tumors, different studies revealed modifications in the expression of proteins involved in Rho GTPases pathways (Cdc42, RhoG, RhoB, etc.) [46–48]. Most of these studies reported that deregulation of Rho GTPases pathways contributes to disease progression. Conversely, the most aggressive neuroblastoma presenting MYCN amplification also displayed down-regulation of Cdc42 expression through the control of N-myc, indicating that Rho GTPases overexpression is not always correlated with poor prognosis. Regarding thyroid or parathyroid tumors, elevated RhoA activity was correlated to the loss of proto-oncogene N-Ras and malignancy progression using the Rb1-deficient mice model of medullary thyroid (C-cell) adenomas [49]. A comprehensive proteomic study revealed differences in the expression levels of various Rho GTPases (mainly RhoA, B, C, and G) between medullary, anaplastic, and epithelium-derived differentiated thyroid cancers (for details see Supplementary Data in [50]). NETs represent around 25% of lung neoplasms with small cell lung cancer (SCLC), the most common and aggressive cancer [51]. In high-grade SCLC, RhoA is highly expressed [52,53], whereas

Rac1 seems to be more abundantly expressed in low-grade pulmonary carcinoid tumors [54]. Finally, few studies reported the involvement of Rho GTPases in cervical, thymic, or skin (Merkel cells) tumors, most likely due to their low frequency. To the best of our knowledge, only one study performed on thymic carcinoid tissue reported Rac1 overexpression [55]. As Merkel cell carcinoma can be the consequence of oncogenic polyomavirus infection, the implication of RhoA and Cdc42 in the pathway by which virus small T antigen controls Merkel cells motility was proposed [56].

Overall, only few studies reported significant expression level modifications for Rho GTPases family members in NETs. It is, however, important to remember that Rho GTPases expression levels are not necessarily correlated with their activation levels. This balance has been largely overlooked.

3. Control of Rho Activity in NETs: Important Role of Rho GEFs and GAPs

The activity of most Rho GTPases is under the control of their regulators. Modulating the expression of guanine nucleotide-exchange factors (GEFs), which stimulate the exchange of GDP for GTP, as well as that of GTPases-activating proteins (GAPs) that catalyze GTP hydrolysis, are expected to alter Rho GTPases activity. For example, in pheochromocytoma, a NET arising from chromaffin cells of the adrenal medulla, we observed that the activity of Rac1 and Cdc42 was inhibited while their relative expression remained unchanged compared to non-tumor tissue [57]. In this study, we further showed that the inhibition of Rac1 and Cdc42 activities in human pheochromocytomas was directly correlated to reduced expression of the GEFs ARHGEF1 and FARP1, respectively [57,58]. In the very aggressive SDHB-pheochromocytoma, microRNAs controlling the Rho GAP ARHGAP18 expression are specifically overexpressed [59]. Expression level changes of Rho GEFs and Rho GAPs were reported in other different NETs from pancreas, lung, thyroid, prostate, and the pituitary gland (Table 2). For example, expression of Frabin (FGD4), a GEF specific for Cdc42, positively correlates with the aggressive phenotype of prostate cancer and the tumor grade of pancreatic neuroendocrine neoplasms, most likely by maintaining abnormal activation of Cdc42 [60,61]. Knock-down of FGD4 in PC-3 and LNCaP-104S prostate cell lines inhibited cell proliferation, cell cycle progression, and cell migration [60]. In pituitary adenoma, ARHGAP18 and ARHGEF17 are both upregulated, suggesting a modulation of the activity of the target Rho GTPases, most likely RhoA [44]. Variation in VAV isoforms (GEFs for Rho and Rac GTPases) expression levels was reported in small cell lung carcinoma [62,63].

Table 2. Expression level changes of Rho GEFs and Rho GAPs in NETs.

GEFs/GAPs	Protein/Gene	Expression Variation	Tumors with Expression Modifications	Preferential Targets of the GEFs and GAPs	References
GEFs	ARHGEF1	↓	PCC vs. non-tumor	RhoA	[57,58]
	ARHGEF10L	↑	NBL MYCN- vs. MYCN+ short survivors (gene)	RhoA, B, C	[48]
	ARHGEF17	↑	NFPA vs. non-tumor	RhoA	[44]
	FARP1	↓	PCC vs. non-tumor	Rac1	[57,58]
	FGD4	↑	PNET grade 2, 3 vs. 1	Cdc42	[61]
	RCC2	↑	NEPC (gene)	Rac1	[60]
	VAV1	↓	SCLC	RhoA, Rac1	[62]
	VAV3	↑	SCLC cell lines vs. non-SCLC cell lines	RhoA, Rac1	[63]
	VAV3	↓	CRPC-NEPC	RhoA, RhoG, Rac1	[64]
GAPs	ARHGAP6	↑	PHPT vs. non-tumor	RhoA	[65]
	ARHGAP11A	↓	NEPC (gene)	RhoA	[66]
	ARHGAP11A	↑	NEPC (gene)	RhoA	[66]
	ARHGAP11B	↑	NEPC (gene)	RhoA, Cdc42	[66]
	ARHGAP18	↑	NFPA vs. non-tumor	RhoA, B, C	[44]
	ARHGAP18	↑	PCC (miRNA)	RhoA, B, C	[59]

Up (↑) or down (↓) expression variations concerning proteins except when indicated (gene, miRNA). When available, the control (vs.) is indicated, as well as the main targeted-Rho GTPases. Tumor abbreviations: CRPC-NEPC: castrate-resistant prostate cancer-neuroendocrine prostate cancer, NBL: neuroblastoma, NEPC: neuroendocrine prostate cancer, NFPA: non-functional pituitary adenoma, PCC: pheochromocytoma, PHPT: primary hyperparathyroidism parathyroid adenoma, PNET: pancreatic neuroendocrine tumor, SCLC: small cell lung carcinoma, uSCLC: undifferentiated small cell lung carcinoma.

By searching the literature, we found that Rho GEFs and Rho GAPs seem to be more affected than the Rho GTPases in another aspect. Strikingly, we found a tremendous amount of mutations and polymorphisms for Rho GEFs and GAPs in NETs, which seem to exceed those found for Rho GTPase genes by far (Table S2). However, most of the time, how these mutations and polymorphisms affect Rho GTPases activity, their consequences on Rho GTPases signaling, and their impact on tumorigenesis remain completely unknown and will require further investigations.

4. Rho GTPases and Hormones Secretion

One common aspect of NETs is the perturbation of hormone secretion, a cellular process regulated by Rho GTPases pathways [11,67–71]. Regulation of hormone secretion in neuroendocrine cells has been mainly studied in two in vitro models: the chromaffin cells from the adrenal medulla (primary culture of mice and bovine chromaffin cells or the rat pheochromocytoma cell line PC12) and the pancreatic beta cells (primary culture or the mouse insulinoma cell line MIN6) [72–74]. These two models are particularly relevant to further understanding the mechanisms of NET-associated hypersecretion. Human pheochromocytoma is characterized by catecholamine hypersecretion, leading to severe hypertension, cardiopathy, and high risk of stroke. In the pancreatic islet cells adenoma (insulinoma), insulin secretion is dysregulated with a persistent hypersecretion that may lead to severe hypoglycemia with associated-neuroglycopenic symptoms [75,76].

4.1. Control of Secretion through Actin Remodeling

In all kinds of tumors, Rho GTPases dysfunction is often linked to their role on actin cytoskeleton organization. Both in adrenal chromaffin and pancreatic beta cells, Rho GTPases were shown to play a key role in secretion by controlling actin remodeling. We demonstrated that the GTPases RhoA and Cdc42 play negative and positive roles on exocytosis, respectively, by differentially affecting actin organization [69,70,77]. Firstly, upon exocytosis, Cdc42 is activated at the plasma membrane of PC12 cells where RhoA is inhibited [67,78]. Following these early studies, RhoA was proposed to actively maintain the organization of the cortical actin network that controls granule positioning and likely limits their access to the plasma membrane in resting condition [77,79,80]. Consequently, inhibition of RhoA during exocytosis was postulated to be an essential step in promoting depolymerization of the cortical actin fence [78]. Conversely, once activated, Cdc42 recruits the neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) at the exocytotic sites of the plasma membrane [78]. Subsequently, our observations allowed us to propose a model in which secretory granules tethering to the exocytotic sites allows the granule bound-actin-related protein-2/3 (Arp2/3) complex to interact with N-WASP and trigger actin nucleation and de novo polymerization of filaments that optimize the efficiency of the exocytotic process [69,78]. Accordingly, Rho GTPases-mediated actin organization tightly regulates insulin secretion in pancreatic cells islets according to a similar dual mechanism controlling actin polymerization: (i) F-actin network organized as a cortical negative barrier that restricts insulin-containing granule accumulation at the plasma membrane hence limiting basal insulin release and (ii) F-actin remodeling leading to a coordinated depolymerization of cortical actin and de novo polymerization or actin fiber assembly leading to positive effects on stimulus-induced insulin granule exocytosis [81]. Glucose-induced activation of Cdc42 was also shown to control insulin secretion in MIN6 pancreatic beta cells through the N-WASP-Arp2/3 or the PAK1-Rac1 signaling pathways, both leading to actin cytoskeleton remodeling [82–84].

How actin remodeling at the exocytotic sites controls hormone release is a key question that has attracted considerable attention, but that is not yet fully resolved. In BON cells, a pancreatic neuroendocrine cell line secreting serotonin, Cdc42, was shown to regulate fusion pore expansion through modulation of membrane tension [85]. As actin cytoskeleton is a known regulator of membrane tension, novel actin filaments generated by active Cdc42 may provide forces at the exocytotic sites to tense membrane and enhance fusion pore expansion and granule cargo release. The exact orientation of these novel actin filaments toward plasma and granule membranes has not been clearly established.

Recently in bovine chromaffin cells, electron microscopy coupled to tomography revealed that actin bundles connected plasma and granule membranes of docked granules after exocytosis stimulation [78]. Accordingly, links between hormone secretion and coating of secretory granules with actin filaments or actin filaments anchoring secretory granules to the plasma membrane were described in chromaffin and insulinoma cells [86,87]. Usually, actin filaments need motors to provide forces to membranes. Rho GTPases were shown to regulate the activity of various myosins [88–91]. The involvement of myosin II and VI in endocrine secretion was described in adrenal chromaffin and PC12 cells, as well as in pancreatic BON and beta cells [85,92–96]. Together, these findings show that Rho GTPases may tightly regulate the polymerization status of F-actin in secreting cells, allowing for the close interplay of the negative control played by cortical actin and the positive action on exocytosis by de novo actin polymerization or bundling.

4.2. Control of Secretion through Lipids Action

Rho GTPases were also shown to control lipids metabolism pathways that are critical for neuroendocrine secretion [11,97]. In rat pheochromocytoma cells, we demonstrated that short interfering RNA (siRNA)-based knockdown of Rac1 inhibits hormone secretion by preventing the secretagogue-induced activation of phospholipase D1 (PLD1) [98]. PLD1 produces phosphatidic acid (PA), a coned-shape fusogenic lipid pivotal for efficient secretion in neuroendocrine cells including adrenal medulla and pancreatic islet cells [97,99–101]. Notably, PLD upregulation was shown to play various cellular and physiological roles in cancer [102,103]. Among the possible contributions of excessive PA synthesis in tumorigenesis, we mention the activation of the mTor pathway by PA that directly binds to mTor in a rapamycine-competitive manner and the increase in metalloprotease secretion triggered by PA [102,103].

A recent study highlighted the importance of the lipid transporter ABCA12 in insulin secretion. ABCA12 silencing in pancreatic β cells impaired secretory granule maturation and fusion, most likely through an altered cellular distribution of cholesterol between insulin granules and the plasma membrane lipid rafts required for secretion [104]. Remarkably, loss of ABCA12 expression also prevents Cdc42 activation and the associated actin remodeling [104].

Actin cytoskeleton remodeling and lipid organization are intimately linked during the process of hormone secretion [11]. For example, work from our laboratory demonstrated that formation of actin bundles connecting docked secretory granules to the plasma membrane contributes to the formation of GM1-enriched lipid microdomains at the exocytotic sites in chromaffin cells [86]. We showed that RhoA, which controls the organization of the cortical actin network at rest, can be recruited to the secretory granule membrane to regulate the phosphatidylinositol-4 kinase (PI 4-kinase) activity, hence modulating phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) level [79]. How the level of PI4P on secretory granule membrane can impact secretion is currently unknown. One possible explanation is that PI4P is the precursor for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2), a phosphoinositide that has been largely implicated in regulated secretion of hormones [105,106]. Coping with levels of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PI4P-5kinase), the enzyme that generates PIP2 from PI4P, dramatically affected exocytosis in chromaffin and beta pancreatic cells [105–107]. As RhoA activation diminished catecholamine secretion in chromaffin cells and since PIP2 controls many actin binding proteins, PIP2 might contribute to stabilizing secretory granules within the peripheral actin mesh.

4.3. Rho GEFs and Rho GAPs at the Commands

As mentioned above, one crucial checkpoint to insure physiological functioning of Rho GTPases is the tight regulation of their activation/inactivation cycle through the action of GEFs and GAPs proteins. Given uncovering the comprehensive mechanisms by which Rho GTPases regulate hormones secretion, we identified a set of different Rho regulators. In the chromaffin/PC12 cell models, stimulation of exocytosis triggers activation of Cdc42 and Rac1, associated with the inactivation of RhoA. We previously showed that the activation of Cdc42 is mediated by intersectin-1L, a member of the Dbl family of

GEFs that also interacts with N-WASP and participates in actin organization [108–110]. In parallel, Rac1 is activated by β -PIX, a member of the Cool/Pix Rho GEFs family, which is recruited to the plasma membrane of stimulated-PC12 cells through its interaction with Scrib, the mammalian homologue of the *Drosophila* neoplastic tumor suppressor Scribble [98,111,112].

In pituitary and pancreatic cells, different GEFs have also been proposed to control hormone secretion. The transient activation of Rac1 required for glucose-induced insulin secretion was proposed to be under the control of VAV2, Tiam1, and Trio/Kalirin in pancreatic cells [113–116]. How these three GEFs coordinate spatially and temporally Rac activation needs further investigation. In the pituitary gland, the GEF trio has been also proposed to control hormone release [117].

Regarding RhoA, we proposed that Oligophrenin-1, a multi-domains GAP protein involved in various membrane trafficking events linked to synaptic functions (plasticity, post-synaptic receptor trafficking, and synaptic vesicle recycling [118–122]), might be responsible for the secretagogue-induced inactivation of RhoA [123]. Along the same line, inhibition of the RhoA/Rock pathway reduced neurotensin secretion in BON cells [124].

5. Conclusions

In comparison to other types of tumors, the role of Rho GTPases in NETs is not well documented. However, the high amount of genetic mutations and polymorphisms discovered in Rho GEFs and GAPs indicates that pathways controlled by Rho GTPases are likely affected in NETs. Today, a clear effort has to be directed toward understanding how mutations or variations in expression levels of Rho GTPases, GEFs, and GAPs identified in NETs favor tumorigenesis. Comparative genomic and proteomic analyses of human tumor samples remain among the most suitable general strategies to uncover new actors involved in Rho GTPases signaling.

Besides being a predictive factor for tumor occurrence or for its progression, whether Rho GTPases pathways could be used as therapeutic targets is clearly an aspect that needs to be developed in the near future. Several drugs directly targeting Rho GTPases have been recently designed and different strategies such as preventing Rho GEF interaction or inhibiting effectors have been proposed [125–141]. However, based on the complex involvement of Rho GTPases and their regulators in NETs hypersecretion, as reviewed here, the development of proper strategies to target each specific tumor will be critical and will require a perfect knowledge of the mechanisms leading to the deregulation of the Rho pathways, as well as their consequences on tumorigenesis.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1859/s1>, Table S1: Mutations and polymorphisms of Rho GTPases in NETs, Table S2: Mutations and polymorphisms of Rho GTPases GEFs and GAPs in NETs.

Funding: Part of the author's work discussed here was supported by grants from Ligue Contre le Cancer (CCIRGE) and from the ANR (SecretoNET) to SG.

Acknowledgments: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) is providing a salary to S.G. and N.V.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kulke, M.H.; Shah, M.H.; Benson, A.B., 3rd; Bergsland, E.; Berlin, J.D.; Blaszkowsky, L.S.; Emerson, L.; Engstrom, P.F.; Fanta, P.; Giordano, T.; et al. Neuroendocrine tumors, version 1.2015. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **2015**, *13*, 78–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Zandee, W.T.; Kamp, K.; van Adrichem, R.C.; Feelders, R.A.; de Herder, W.W. Effect of hormone secretory syndromes on neuroendocrine tumor prognosis. *Endocr. Relat. Cancer* **2017**, *24*, R261–R274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Juhlin, C.C.; Skoglund, S.; Juntti-Berggren, L.; Karlberg, M.; Calissendorff, J. Non-functioning neuroendocrine pancreatic tumors transforming to malignant insulinomas - four cases and review of the literature. *Neuro. Endocrinol. Lett.* **2019**, *40*, 175–183. [[PubMed](#)]

4. Song, P.; Sekhon, H.S.; Jia, Y.; Keller, J.A.; Blusztajn, J.K.; Mark, G.P.; Spindel, E.R. Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 214–221.
5. Brown, R.L.; Muzzafar, T.; Wollman, R.; Weiss, R.E. A pituitary carcinoma secreting TSH and prolactin: A non-secreting adenoma gone awry. *Eur. J. Endocrinol.* **2006**, *154*, 639–643. [[CrossRef](#)]
6. Daems, T.; Verhelst, J.; Michotte, A.; Abrams, P.; De Ridder, D.; Abs, R. Modification of hormonal secretion in clinically silent pituitary adenomas. *Pituitary* **2009**, *12*, 80–86. [[CrossRef](#)]
7. Lenders, N.; McCormack, A. Malignant transformation in non-functioning pituitary adenomas (pituitary carcinoma). *Pituitary* **2018**, *21*, 217–229. [[CrossRef](#)]
8. Neumann, H.P.H.; Young, W.F., Jr.; Eng, C. Pheochromocytoma and Paraganglioma. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 552–565. [[CrossRef](#)]
9. Aspenstrom, P.; Ruusala, A.; Pacholsky, D. Taking Rho GTPases to the next level: The cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 3673–3679. [[CrossRef](#)]
10. Boureux, A.; Vignal, E.; Faure, S.; Fort, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 203–216. [[CrossRef](#)]
11. Croise, P.; Estay-Ahumada, C.; Gasman, S.; Ory, S. Rho GTPases, phosphoinositides, and actin: A tripartite framework for efficient vesicular trafficking. *Small GTPases* **2014**, *5*, e29469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Haga, R.B.; Ridley, A.J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **2016**, *7*, 207–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Li, H.; Peyrollier, K.; Kilic, G.; Brakebusch, C. Rho GTPases and cancer. *Biofactors* **2014**, *40*, 226–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Olayioye, M.A.; Noll, B.; Hausser, A. Spatiotemporal Control of Intracellular Membrane Trafficking by Rho GTPases. *Cells* **2019**, *8*, 1478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Orgaz, J.L.; Herraiz, C.; Sanz-Moreno, V. Rho GTPases modulate malignant transformation of tumor cells. *Small GTPases* **2014**, *5*, e29019. [[CrossRef](#)]
16. Phuyal, S.; Farhan, H. Multifaceted Rho GTPase Signaling at the Endomembranes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 127. [[CrossRef](#)]
17. Porter, A.P.; Papaioannou, A.; Malliri, A. Deregulation of Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* **2016**, *7*, 123–138. [[CrossRef](#)]
18. Warner, H.; Wilson, B.J.; Caswell, P.T. Control of adhesion and protrusion in cell migration by Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2019**, *56*, 64–70. [[CrossRef](#)]
19. Wilson, K.F.; Erickson, J.W.; Antonyak, M.A.; Cerione, R.A. Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 74–82. [[CrossRef](#)]
20. Alan, J.K.; Lundquist, E.A. Mutationally activated Rho GTPases in cancer. *Small GTPases* **2013**, *4*, 159–163. [[CrossRef](#)]
21. Bustelo, X.R. RHO GTPases in cancer: Known facts, open questions, and therapeutic challenges. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *46*, 741–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kataoka, K.; Ogawa, S. Variegated RHOA mutations in human cancers. *Exp. Hematol.* **2016**, *44*, 1123–1129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Olson, M.F. Rho GTPases, their post-translational modifications, disease-associated mutations and pharmacological inhibitors. *Small GTPases* **2018**, *9*, 203–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Svensmark, J.H.; Brakebusch, C. Rho GTPases in cancer: Friend or foe? *Oncogene* **2019**, *38*, 7447–7456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zandvakili, I.; Lin, Y.; Morris, J.C.; Zheng, Y. Rho GTPases: Anti- or pro-neoplastic targets? *Oncogene* **2017**, *36*, 3213–3222. [[CrossRef](#)]
26. Davis, M.J.; Ha, B.H.; Holman, E.C.; Halaban, R.; Schlessinger, J.; Boggon, T.J. RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 912–917. [[CrossRef](#)]
27. Kawazu, M.; Ueno, T.; Kontani, K.; Ogita, Y.; Ando, M.; Fukumura, K.; Yamato, A.; Soda, M.; Takeuchi, K.; Miki, Y.; et al. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 3029–3034. [[CrossRef](#)]
28. Zhang, H.; Schaefer, A.; Wang, Y.; Hodge, R.G.; Blake, D.R.; Diehl, J.N.; Papageorge, A.G.; Stachler, M.D.; Liao, J.; Zhou, J.; et al. Gain-of-Function RHOA Mutations Promote Focal Adhesion Kinase Activation and Dependency in Diffuse Gastric Cancer. *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 288–305. [[CrossRef](#)]

29. Wang, K.; Yuen, S.T.; Xu, J.; Lee, S.P.; Yan, H.H.; Shi, S.T.; Siu, H.C.; Deng, S.; Chu, K.M.; Law, S.; et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 573–582. [[CrossRef](#)]
30. Augert, A.; Zhang, Q.; Bates, B.; Cui, M.; Wang, X.; Wildey, G.; Dowlati, A.; MacPherson, D. Small Cell Lung Cancer Exhibits Frequent Inactivating Mutations in the Histone Methyltransferase KMT2D/MLL2: CALGB 151111 (Alliance). *J. Thorac. Oncol.* **2017**, *12*, 704–713. [[CrossRef](#)]
31. Wen, K.W.; Grenert, J.P.; Joseph, N.M.; Shafizadeh, N.; Huang, A.; Hosseini, M.; Kakar, S. Genomic profile of appendiceal goblet cell carcinoid is distinct compared to appendiceal neuroendocrine tumor and conventional adenocarcinoma. *Hum. Pathol.* **2018**, *77*, 166–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cao, Y.; Zhou, W.; Li, L.; Wang, J.; Gao, Z.; Jiang, Y.; Jiang, X.; Shan, A.; Bailey, M.H.; Huang, K.L.; et al. Pan-cancer analysis of somatic mutations across 21 neuroendocrine tumor types. *Cell Res.* **2018**, *28*, 601–604. [[CrossRef](#)]
33. Wilzen, A.; Rehammar, A.; Muth, A.; Nilsson, O.; Tesan Tomic, T.; Wangberg, B.; Kristiansson, E.; Abel, F. Malignant pheochromocytomas/paragangliomas harbor mutations in transport and cell adhesion genes. *Int. J. Cancer* **2016**, *138*, 2201–2211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Flynn, A.; Benn, D.; Clifton-Bligh, R.; Robinson, B.; Trainer, A.H.; James, P.; Hogg, A.; Waldeck, K.; George, J.; Li, J.; et al. The genomic landscape of pheochromocytoma. *J. Pathol.* **2015**, *236*, 78–89. [[CrossRef](#)]
35. Scarpa, A.; Chang, D.K.; Nones, K.; Corbo, V.; Patch, A.M.; Bailey, P.; Lawlor, R.T.; Johns, A.L.; Miller, D.K.; Mafficini, A.; et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* **2017**, *543*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. George, J.; Walter, V.; Peifer, M.; Alexandrov, L.B.; Seidel, D.; Leenders, F.; Maas, L.; Muller, C.; Dahmen, I.; Delhomme, T.M.; et al. Integrative genomic profiling of large-cell neuroendocrine carcinomas reveals distinct subtypes of high-grade neuroendocrine lung tumors. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1048. [[CrossRef](#)]
37. Francis, J.M.; Kiezun, A.; Ramos, A.H.; Serra, S.; Peadarallu, C.S.; Qian, Z.R.; Banck, M.S.; Kanwar, R.; Kulkarni, A.A.; Karpathakis, A.; et al. Somatic mutation of CDKN1B in small intestine neuroendocrine tumors. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1483–1486. [[CrossRef](#)]
38. Harms, P.W.; Vats, P.; Verhaegen, M.E.; Robinson, D.R.; Wu, Y.M.; Dhanasekaran, S.M.; Palanisamy, N.; Siddiqui, J.; Cao, X.; Su, F.; et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3720–3727. [[CrossRef](#)]
39. Castro-Vega, L.J.; Letouze, E.; Burnichon, N.; Buffet, A.; Disderot, P.H.; Khalifa, E.; Loriot, C.; Elarouci, N.; Morin, A.; Menara, M.; et al. Multi-omics analysis defines core genomic alterations in pheochromocytomas and paragangliomas. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6044. [[CrossRef](#)]
40. Ellenbroek, S.I.; Collard, J.G. Rho GTPases: Functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **2007**, *24*, 657–672. [[CrossRef](#)]
41. Karlsson, R.; Pedersen, E.D.; Wang, Z.; Brakebusch, C. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1796*, 91–98. [[CrossRef](#)]
42. Gomez del Pulgar, T.; Benitah, S.A.; Valeron, P.F.; Espina, C.; Lacal, J.C. Rho GTPase expression in tumourigenesis: Evidence for a significant link. *Bioessays* **2005**, *27*, 602–613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sahai, E.; Marshall, C.J. RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 133–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Long, Y.; Lu, M.; Cheng, T.; Zhan, X.; Zhan, X. Multiomics-Based Signaling Pathway Network Alterations in Human Non-functional Pituitary Adenomas. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Veschi, V.; Verona, F.; Thiele, C.J. Cancer Stem Cells and Neuroblastoma: Characteristics and Therapeutic Targeting Options. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Chen, Q.R.; Song, Y.K.; Yu, L.R.; Wei, J.S.; Chung, J.Y.; Hewitt, S.M.; Veenstra, T.D.; Khan, J. Global genomic and proteomic analysis identifies biological pathways related to high-risk neuroblastoma. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 373–382. [[CrossRef](#)]
47. Coco, S.; Theissen, J.; Scaruffi, P.; Stigliani, S.; Moretti, S.; Oberthuer, A.; Valdora, F.; Fischer, M.; Gallo, F.; Hero, B.; et al. Age-dependent accumulation of genomic aberrations and deregulation of cell cycle and telomerase genes in metastatic neuroblastoma. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 1591–1600. [[CrossRef](#)]
48. Stigliani, S.; Coco, S.; Moretti, S.; Oberthuer, A.; Fischer, M.; Theissen, J.; Gallo, F.; Garavento, A.; Berthold, F.; Bonassi, S.; et al. High genomic instability predicts survival in metastatic high-risk neuroblastoma. *Neoplasia* **2012**, *14*, 823–832. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Takahashi, C.; Contreras, B.; Iwanaga, T.; Takegami, Y.; Bakker, A.; Bronson, R.T.; Noda, M.; Loda, M.; Hunt, J.L.; Ewen, M.E. Nras loss induces metastatic conversion of Rb1-deficient neuroendocrine thyroid tumor. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 118–123. [[CrossRef](#)]
50. Gawin, M.; Wojakowska, A.; Pietrowska, M.; Marczak, L.; Chekan, M.; Jelonek, K.; Lange, D.; Jaksik, R.; Gruca, A.; Widlak, P. Proteome profiles of different types of thyroid cancers. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2018**, *472*, 68–79. [[CrossRef](#)]
51. Rekhtman, N. Neuroendocrine tumors of the lung: An update. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2010**, *134*, 1628–1638. [[CrossRef](#)]
52. Touge, H.; Chikumi, H.; Igishi, T.; Kurai, J.; Makino, H.; Tamura, Y.; Takata, M.; Yoneda, K.; Nakamoto, M.; Suyama, H.; et al. Diverse activation states of RhoA in human lung cancer cells: Contribution of G protein coupled receptors. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 709–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Varker, K.A.; Phelps, S.H.; King, M.M.; Williams, C.L. The small GTPase RhoA has greater expression in small cell lung carcinoma than in non-small cell lung carcinoma and contributes to their unique morphologies. *Int. J. Oncol.* **2003**, *22*, 671–681. [[PubMed](#)]
54. Fujii, K.; Miyata, Y.; Takahashi, I.; Koizumi, H.; Saji, H.; Hoshikawa, M.; Takagi, M.; Nishimura, T.; Nakamura, H. Differential Proteomic Analysis between Small Cell Lung Carcinoma (SCLC) and Pulmonary Carcinoid Tumors Reveals Molecular Signatures for Malignancy in Lung Cancer. *Proteom. Clin. Appl.* **2018**, *12*, e1800015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Liu, R.X.; Wang, W.Q.; Ye, L.; Bi, Y.F.; Fang, H.; Cui, B.; Zhou, W.W.; Dai, M.; Zhang, J.; Li, X.Y.; et al. p21-activated kinase 3 is overexpressed in thymic neuroendocrine tumors (carcinoids) with ectopic ACTH syndrome and participates in cell migration. *Endocrine* **2010**, *38*, 38–47. [[CrossRef](#)]
56. Stakaityte, G.; Nwogu, N.; Dobson, S.J.; Knight, L.M.; Wasson, C.W.; Salguero, F.J.; Blackburn, D.J.; Blair, G.E.; Mankouri, J.; Macdonald, A.; et al. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Drives Cell Motility via Rho-GTPase-Induced Filopodium Formation. *J. Virol.* **2018**, *92*. [[CrossRef](#)]
57. Croise, P.; Houy, S.; Gand, M.; Lanoix, J.; Calco, V.; Toth, P.; Brunaud, L.; Lomazzi, S.; Paramithiotis, E.; Chelsky, D.; et al. Cdc42 and Rac1 activity is reduced in human pheochromocytoma and correlates with FARP1 and ARHGEF1 expression. *Endocr. Relat. Cancer* **2016**, *23*, 281–293. [[CrossRef](#)]
58. Croise, P.; Brunaud, L.; Toth, P.; Gasman, S.; Ory, S. Inhibition of Cdc42 and Rac1 activities in pheochromocytoma, the adrenal medulla tumor. *Small GTPases* **2017**, *8*, 122–127. [[CrossRef](#)]
59. de Cubas, A.A.; Leandro-Garcia, L.J.; Schiavi, F.; Mancikova, V.; Comino-Mendez, I.; Inglada-Perez, L.; Perez-Martinez, M.; Ibarz, N.; Ximenez-Embun, P.; Lopez-Jimenez, E.; et al. Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways. *Endocr. Relat. Cancer* **2013**, *20*, 477–493. [[CrossRef](#)]
60. Bossan, A.; Ottman, R.; Andl, T.; Hasan, M.F.; Mahajan, N.; Coppola, D.; Chakrabarti, R. Expression of FGD4 positively correlates with the aggressive phenotype of prostate cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 1257. [[CrossRef](#)]
61. Shahid, M.; George, T.B.; Saller, J.; Haija, M.; Sayegh, Z.; Boulware, D.; Strosberg, J.; Chakrabarti, R.; Coppola, D. FGD4 (Frabin) Overexpression in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Pancreas* **2019**, *48*, 1307–1311. [[CrossRef](#)]
62. Lazer, G.; Idelchuk, Y.; Schapira, V.; Pikarsky, E.; Katzav, S. The haematopoietic specific signal transducer Vav1 is aberrantly expressed in lung cancer and plays a role in tumourigenesis. *J. Pathol.* **2009**, *219*, 25–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Ziv, T.; Barnea, E.; Segal, H.; Sharon, R.; Beer, I.; Admon, A. Comparative proteomics of small cell lung carcinoma. *Cancer Biomark.* **2006**, *2*, 219–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Weissenrieder, J.S.; Reilly, J.E.; Neighbors, J.D.; Hohl, R.J. Inhibiting geranylgeranyl diphosphate synthesis reduces nuclear androgen receptor signaling and neuroendocrine differentiation in prostate cancer cell models. *Prostate* **2019**, *79*, 21–30. [[CrossRef](#)]
65. Arya, A.K.; Bhadada, S.K.; Singh, P.; Dahiya, D.; Kaur, G.; Sharma, S.; Saikia, U.N.; Behera, A.; Rao, S.D.; Bhasin, M. Quantitative proteomics analysis of sporadic parathyroid adenoma tissue samples. *J. Endocrinol. Investig.* **2019**, *42*, 577–590. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Tsai, H.K.; Lehrer, J.; Alshalalfa, M.; Erho, N.; Davicioni, E.; Lotan, T.L. Gene expression signatures of neuroendocrine prostate cancer and primary small cell prostatic carcinoma. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Bader, M.F.; Doussau, F.; Chasserot-Golaz, S.; Vitale, N.; Gasman, S. Coupling actin and membrane dynamics during calcium-regulated exocytosis: A role for Rho and ARF GTPases. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1742*, 37–49. [[CrossRef](#)]
68. Gasman, S.; Chasserot-Golaz, S.; Bader, M.F.; Vitale, N. Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: Focus on ARF and Rho GTPases. *Cell Signal.* **2003**, *15*, 893–899. [[CrossRef](#)]
69. Malacombe, M.; Bader, M.F.; Gasman, S. Exocytosis in neuroendocrine cells: New tasks for actin. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1763*, 1175–1183. [[CrossRef](#)]
70. Momboisse, F.; Houy, S.; Ory, S.; Calco, V.; Bader, M.F.; Gasman, S. How important are Rho GTPases in neurosecretion? *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 623–631. [[CrossRef](#)]
71. Ory, S.; Gasman, S. Rho GTPases and exocytosis: What are the molecular links? *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2011**, *22*, 27–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bader, M.F.; Holz, R.W.; Kumakura, K.; Vitale, N. Exocytosis: The chromaffin cell as a model system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2002**, *971*, 178–183. [[CrossRef](#)]
73. Westerink, R.H.; Ewing, A.G. The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta. Physiol. (Oxf.)* **2008**, *192*, 273–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Miyazaki, J.; Araki, K.; Yamato, E.; Ikegami, H.; Asano, T.; Shibasaki, Y.; Oka, Y.; Yamamura, K. Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: Special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* **1990**, *127*, 126–132. [[CrossRef](#)]
75. Flatt, P.R. Defective regulation of insulin secretion in diabetes and insulinoma. *Biochem. Soc. Trans.* **1990**, *18*, 124–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Okabayashi, T.; Shima, Y.; Sumiyoshi, T.; Kozuki, A.; Ito, S.; Ogawa, Y.; Kobayashi, M.; Hanazaki, K. Diagnosis and management of insulinoma. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 829–837. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Gasman, S.; Chasserot-Golaz, S.; Popoff, M.R.; Aunis, D.; Bader, M.F. Involvement of Rho GTPases in calcium-regulated exocytosis from adrenal chromaffin cells. *J. Cell. Sci.* **1999**, *112 Pt. 24*, 4763–4771.
78. Gasman, S.; Chasserot-Golaz, S.; Malacombe, M.; Way, M.; Bader, M.F. Regulated exocytosis in neuroendocrine cells: A role for subplasmalemmal Cdc42/N-WASP-induced actin filaments. *Mol. Biol. Cell.* **2004**, *15*, 520–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Gasman, S.; Chasserot-Golaz, S.; Hubert, P.; Aunis, D.; Bader, M.F. 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.* **1998**, *273*, 16913–16920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Gasman, S.; Chasserot-Golaz, S.; Popoff, M.R.; Aunis, D.; Bader, M.F. Trimeric G proteins control exocytosis in chromaffin cells. Go regulates the peripheral actin network and catecholamine secretion by a mechanism involving the small GTP-binding protein Rho. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20564–20571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Kalwat, M.A.; Thurmond, D.C. Signaling mechanisms of glucose-induced F-actin remodeling in pancreatic islet beta cells. *Exp. Mol. Med.* **2013**, *45*, e37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Wang, Z.; Oh, E.; Thurmond, D.C. Glucose-stimulated Cdc42 signaling is essential for the second phase of insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9536–9546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Uenishi, E.; Shibasaki, T.; Takahashi, H.; Seki, C.; Hamaguchi, H.; Yasuda, T.; Tatebe, M.; Oiso, Y.; Takenawa, T.; Seino, S. Actin dynamics regulated by the balance of neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) and cofilin activities determines the biphasic response of glucose-induced insulin secretion. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 25851–25864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kalwat, M.A.; Yoder, S.M.; Wang, Z.; Thurmond, D.C. A p21-activated kinase (PAK1) signaling cascade coordinately regulates F-actin remodeling and insulin granule exocytosis in pancreatic beta cells. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 808–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Bretou, M.; Jouannot, O.; Fanget, I.; Pierobon, P.; Larochette, N.; Gestraud, P.; Guillon, M.; Emiliani, V.; Gasman, S.; Desnos, C.; et al. Cdc42 controls the dilation of the exocytotic fusion pore by regulating membrane tension. *Mol. Biol. Cell.* **2014**, *25*, 3195–3209. [[CrossRef](#)]
86. Gabel, M.; Delavoie, F.; Demais, V.; Royer, C.; Bailly, Y.; Vitale, N.; Bader, M.F.; Chasserot-Golaz, S. Annexin A2-dependent actin bundling promotes secretory granule docking to the plasma membrane and exocytosis. *J. Cell. Biol.* **2015**, *210*, 785–800. [[CrossRef](#)]
87. Ma, W.; Chang, J.; Tong, J.; Ho, U.; Yau, B.; Kebede, M.A.; Thorn, P. Arp2/3 nucleates F-actin coating of fusing insulin granules in pancreatic beta cells to control insulin secretion. *J. Cell. Sci.* **2020**, *133*. [[CrossRef](#)]

88. Gomes, E.R.; Jani, S.; Gundersen, G.G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **2005**, *121*, 451–463. [[CrossRef](#)]
89. Brooks, A.B.; Humphreys, D.; Singh, V.; Davidson, A.C.; Arden, S.D.; Buss, F.; Koronakis, V. MYO6 is targeted by Salmonella virulence effectors to trigger PI3-kinase signaling and pathogen invasion into host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 3915–3920. [[CrossRef](#)]
90. Kimura, K.; Ito, M.; Amano, M.; Chihara, K.; Fukata, Y.; Nakafuku, M.; Yamamori, B.; Feng, J.; Nakano, T.; Okawa, K.; et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **1996**, *273*, 245–248. [[CrossRef](#)]
91. Wilkinson, S.; Paterson, H.F.; Marshall, C.J. Cdc42-MRCK and Rho-ROCK signalling cooperate in myosin phosphorylation and cell invasion. *Nat. Cell. Biol.* **2005**, *7*, 255–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Arous, C.; Rondas, D.; Halban, P.A. Non-muscle myosin IIA is involved in focal adhesion and actin remodelling controlling glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetologia* **2013**, *56*, 792–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Berberian, K.; Torres, A.J.; Fang, Q.; Kisler, K.; Lindau, M. F-actin and myosin II accelerate catecholamine release from chromaffin granules. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 863–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Neco, P.; Fernandez-Peruchena, C.; Navas, S.; Gutierrez, L.M.; de Toledo, G.A.; Ales, E. Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 10949–10957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Papadopulos, A.; Gomez, G.A.; Martin, S.; Jackson, J.; Gormal, R.S.; Keating, D.J.; Yap, A.S.; Meunier, F.A. Activity-driven relaxation of the cortical actomyosin II network synchronizes Munc18-1-dependent neurosecretory vesicle docking. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6297. [[CrossRef](#)]
96. Tomatis, V.M.; Josh, P.; Papadopulos, A.; Gormal, R.S.; Lanoue, V.; Martin, S.; Meunier, F.A. ENA/VASP proteins regulate exocytosis by mediating myosin VI-dependent recruitment of secretory granules to the cortical actin network. *Mol. Cell. Neurosci.* **2017**, *84*, 100–111. [[CrossRef](#)]
97. Gasman, S.; Vitale, N. Lipid remodelling in neuroendocrine secretion. *Biol. Cell* **2017**. [[CrossRef](#)]
98. Momboisse, F.; Lonchamp, E.; Calco, V.; Ceridono, M.; Vitale, N.; Bader, M.F.; Gasman, S. betaPIX-activated Rac1 stimulates the activation of phospholipase D, which is associated with exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Cell. Sci.* **2009**, *122*, 798–806. [[CrossRef](#)]
99. Zeniou-Meyer, M.; Zabari, N.; Ashery, U.; Chasserot-Golaz, S.; Haeberle, A.M.; Demais, V.; Bailly, Y.; Gottfried, I.; Nakanishi, H.; Neiman, A.M.; et al. Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21746–21757. [[CrossRef](#)]
100. Hughes, W.E.; Elgundi, Z.; Huang, P.; Frohman, M.A.; Biden, T.J. Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27534–27541. [[CrossRef](#)]
101. Metz, S.A.; Dunlop, M. Stimulation of insulin release by phospholipase D. A potential role for endogenous phosphatidic acid in pancreatic islet function. *Biochem. J.* **1990**, *270*, 427–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Gomez-Cambronero, J. Phospholipase D in cell signaling: From a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 22557–22566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zhang, Y.; Frohman, M.A. Cellular and physiological roles for phospholipase D1 in cancer. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 22567–22574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Ursino, G.M.; Fu, Y.; Cottle, D.L.; Mukhamedova, N.; Jones, L.K.; Low, H.; Tham, M.S.; Gan, W.J.; Mellett, N.A.; Das, P.P.; et al. ABCA12 regulates insulin secretion from beta-cells. *EMBO Rep.* **2020**, *21*, e48692. [[CrossRef](#)]
105. Gong, L.W.; Di Paolo, G.; Diaz, E.; Cestra, G.; Diaz, M.E.; Lindau, M.; De Camilli, P.; Toomre, D. Phosphatidylinositol phosphate kinase type I gamma regulates dynamics of large dense-core vesicle fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 5204–5209. [[CrossRef](#)]
106. Milosevic, I.; Sorensen, J.B.; Lang, T.; Krauss, M.; Nagy, G.; Haucke, V.; Jahn, R.; Neher, E. Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 2557–2565. [[CrossRef](#)]
107. Waselle, L.; Gerona, R.R.; Vitale, N.; Martin, T.F.; Bader, M.F.; Regazzi, R. Role of phosphoinositide signaling in the control of insulin exocytosis. *Mol. Endocrinol.* **2005**, *19*, 3097–3106. [[CrossRef](#)]
108. Gubar, O.; Morderer, D.; Tsyba, L.; Croise, P.; Houy, S.; Ory, S.; Gasman, S.; Rynditch, A. Intersectin: The Crossroad between Vesicle Exocytosis and Endocytosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2013**, *4*, 109. [[CrossRef](#)]

109. Malacombe, M.; Ceridono, M.; Calco, V.; Chasserot-Golaz, S.; McPherson, P.S.; Bader, M.F.; Gasman, S. Intersectin-1L nucleotide exchange factor regulates secretory granule exocytosis by activating Cdc42. *Embo. J.* **2006**, *25*, 3494–3503. [[CrossRef](#)]
110. Zheng, Y. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 724–732. [[CrossRef](#)]
111. Audebert, S.; Navarro, C.; Nourry, C.; Chasserot-Golaz, S.; Lecine, P.; Bellaiche, Y.; Dupont, J.L.; Premont, R.T.; Sempere, C.; Strub, J.M.; et al. Mammalian Scribble Forms a Tight Complex with the betaPIX Exchange Factor. *Curr. Biol.* **2004**, *14*, 987–995. [[CrossRef](#)]
112. Zhou, W.; Li, X.; Premont, R.T. Expanding functions of GIT Arf GTPase-activating proteins, PIX Rho guanine nucleotide exchange factors and GIT-PIX complexes. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 1963–1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Dufurrena, Q.; Back, N.; Mains, R.E.; Hodgson, L.; Tanowitz, H.; Mandela, P.; Eipper, E.; Kuliawat, R. Kalirin/Trio Rho GDP/GTP exchange factors regulate proinsulin and insulin secretion. *J. Mol. Endocrinol.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Kowluru, A. GPCRs, G Proteins, and Their Impact on beta-cell Function. *Compr. Physiol.* **2020**, *10*, 453–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Veluthakal, R.; Madathilparambil, S.V.; McDonald, P.; Olson, L.K.; Kowluru, A. Regulatory roles for Tiam1, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, in glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 101–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Veluthakal, R.; Tunduguru, R.; Arora, D.K.; Sidarala, V.; Syeda, K.; Vlaar, C.P.; Thurmond, D.C.; Kowluru, A. VAV2, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1, regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia* **2015**, *58*, 2573–2581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Xin, X.; Ferraro, F.; Back, N.; Eipper, B.A.; Mains, R.E. Cdk5 and Trio modulate endocrine cell exocytosis. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4739–4748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Khelifaoui, M.; Gambino, F.; Houbaert, X.; Ragazzon, B.; Muller, C.; Carta, M.; Lanore, F.; Srikumar, B.N.; Gastrein, P.; Lepleux, M.; et al. Lack of the presynaptic RhoGAP protein oligophrenin1 leads to cognitive disabilities through dysregulation of the cAMP/PKA signalling pathway. *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130160. [[CrossRef](#)]
119. Khelifaoui, M.; Pavlowsky, A.; Powell, A.D.; Valnegri, P.; Cheong, K.W.; Blandin, Y.; Passafaro, M.; Jefferys, J.G.; Chelly, J.; Billuart, P. Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 2575–2583. [[CrossRef](#)]
120. Nadif Kasri, N.; Nakano-Kobayashi, A.; Malinow, R.; Li, B.; Van Aelst, L. The Rho-linked mental retardation protein oligophrenin-1 controls synapse maturation and plasticity by stabilizing AMPA receptors. *Genes Dev.* **2009**, *23*, 1289–1302. [[CrossRef](#)]
121. Nakano-Kobayashi, A.; Kasri, N.N.; Newey, S.E.; Van Aelst, L. The Rho-linked mental retardation protein OPHN1 controls synaptic vesicle endocytosis via endophilin A1. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 1133–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Powell, A.D.; Gill, K.K.; Sainot, P.P.; Jiruska, P.; Chelly, J.; Billuart, P.; Jefferys, J.G. Rapid reversal of impaired inhibitory and excitatory transmission but not spine dysgenesis in a mouse model of mental retardation. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 763–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Houy, S.; Estay-Ahumada, C.; Croise, P.; Calco, V.; Haeberle, A.M.; Bailly, Y.; Billuart, P.; Vitale, N.; Bader, M.F.; Ory, S.; et al. Oligophrenin-1 Connects Exocytotic Fusion to Compensatory Endocytosis in Neuroendocrine Cells. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 11045–11055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Li, J.; O'Connor, K.L.; Hellmich, M.R.; Greeley, G.H., Jr.; Townsend, C.M., Jr.; Evers, B.M. The role of protein kinase D in neurotensin secretion mediated by protein kinase C-alpha/delta and Rho/Rho kinase. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 28466–28474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Arias-Romero, L.E.; Chernoff, J. Targeting Cdc42 in cancer. *Expert. Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 1263–1273. [[CrossRef](#)]
126. Cardama, G.A.; Gonzalez, N.; Maggio, J.; Menna, P.L.; Gomez, D.E. Rho GTPases as therapeutic targets in cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **2017**, *51*, 1025–1034. [[CrossRef](#)]
127. Evelyn, C.R.; Ferng, T.; Rojas, R.J.; Larsen, M.J.; Sondek, J.; Neubig, R.R. High-throughput screening for small-molecule inhibitors of LARG-stimulated RhoA nucleotide binding via a novel fluorescence polarization assay. *J. Biomol. Screen* **2009**, *14*, 161–172. [[CrossRef](#)]

128. Friesland, A.; Zhao, Y.; Chen, Y.H.; Wang, L.; Zhou, H.; Lu, Q. Small molecule targeting Cdc42-intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 1261–1266. [[CrossRef](#)]
129. Gao, Y.; Dickerson, J.B.; Guo, F.; Zheng, J.; Zheng, Y. Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7618–7623. [[CrossRef](#)]
130. Lee, M.H.; Kundu, J.K.; Chae, J.I.; Shim, J.H. Targeting ROCK/LIMK/cofilin signaling pathway in cancer. *Arch. Pharm. Res.* **2019**, *42*, 481–491. [[CrossRef](#)]
131. Lin, Y.; Zheng, Y. Approaches of targeting Rho GTPases in cancer drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2015**, *10*, 991–1010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Liu, W.; Du, W.; Shang, X.; Wang, L.; Evelyn, C.; Florian, M.C.; Ryan, M.A.; Rayes, A.; Zhao, X.; Setchell, K.; et al. Rational identification of a Cdc42 inhibitor presents a new regimen for long-term hematopoietic stem cell mobilization. *Leukemia* **2019**, *33*, 749–761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Mardilovich, K.; Olson, M.F.; Baugh, M. Targeting Rho GTPase signaling for cancer therapy. *Future Oncol.* **2012**, *8*, 165–177. [[CrossRef](#)]
134. Montalvo-Ortiz, B.L.; Castillo-Pichardo, L.; Hernandez, E.; Humphries-Bickley, T.; De la Mota-Peynado, A.; Cubano, L.A.; Vlaar, C.P.; Dharmawardhane, S. Characterization of EHop-016, novel small molecule inhibitor of Rac GTPase. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 13228–13238. [[CrossRef](#)]
135. Nassar, N.; Cancelas, J.; Zheng, J.; Williams, D.A.; Zheng, Y. Structure-function based design of small molecule inhibitors targeting Rho family GTPases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1109–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Pajic, M.; Herrmann, D.; Vennin, C.; Conway, J.R.; Chin, V.T.; Johnsson, A.K.; Welch, H.C.; Timpson, P. The dynamics of Rho GTPase signaling and implications for targeting cancer and the tumor microenvironment. *Small GTPases* **2015**, *6*, 123–133. [[CrossRef](#)]
137. Shang, X.; Marchioni, F.; Sipes, N.; Evelyn, C.R.; Jerabek-Willemsen, M.; Duhr, S.; Seibel, W.; Wortman, M.; Zheng, Y. Rational design of small molecule inhibitors targeting RhoA subfamily Rho GTPases. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 699–710. [[CrossRef](#)]
138. Xiao, X.H.; Lv, L.C.; Duan, J.; Wu, Y.M.; He, S.J.; Hu, Z.Z.; Xiong, L.X. Regulating Cdc42 and Its Signaling Pathways in Cancer: Small Molecules and MicroRNA as New Treatment Candidates. *Molecules* **2018**, *23*, 787. [[CrossRef](#)]
139. Zhang, Y.; Li, J.; Lai, X.N.; Jiao, X.Q.; Xiong, J.P.; Xiong, L.X. Focus on Cdc42 in Breast Cancer: New Insights, Target Therapy Development and Non-Coding RNAs. *Cells* **2019**, *8*, 146. [[CrossRef](#)]
140. Rath, N.; Olson, M.F. Rho-associated kinases in tumorigenesis: Re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. *EMBO Rep.* **2012**, *13*, 900–908. [[CrossRef](#)]
141. Wang, Y.; Lei, R.; Zhuang, X.; Zhang, N.; Pan, H.; Li, G.; Hu, J.; Pan, X.; Tao, Q.; Fu, D.; et al. DLC1-dependent parathyroid hormone-like hormone inhibition suppresses breast cancer bone metastasis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 1646–1659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Mécanismes moléculaires de la sécrétion hormonale et traitement anti-sécrétoire du phéochromocytome humain

Résumé

Les cellules neuroendocrines sécrètent des hormones et des neuropeptides par un processus d'exocytose régulé par le calcium. Malheureusement, toutes les cellules neuroendocrines de l'organisme peuvent se transformer en cellules tumorales et potentiellement engendrer un cancer. Bien que constituant un groupe très hétérogène, les tumeurs neuroendocrines possèdent une caractéristique commune intéressante qui est un dysfonctionnement de leur activité sécrétrice entraînant, dans la majorité des cas, une hypersécrétion des hormones et peptides qu'elles stockent. Cette sécrétion anarchique pose problème car elle peut engendrer des conséquences cliniques graves chez les patients. À ce jour, les mécanismes moléculaires qui induisent et maintiennent l'hypersécrétion de ces tumeurs ne sont pas connus et il n'existe aucune thérapie ciblée permettant de l'empêcher. Mes travaux de thèse montrent que l'hypersécrétion du phéochromocytome est la conséquence directe d'un dérèglement des phases tardives de l'exocytose et qu'un traitement par le pasiréotide, un analogue de la somatostatine inhibe efficacement l'hypersécrétion.

Mots clés : phéochromocytome, sécrétion, exocytose régulée par le calcium, analogue de la somatostatine

Abstract

Neuroendocrine cells secrete hormones and neuropeptides through calcium-regulated exocytosis. Unfortunately, all neuroendocrine cells in the body can develop into tumor cells and potentially into cancer. Although a very heterogeneous group, neuroendocrine tumors have one interesting feature in common, which is a dysfunction of their secretory activity leading, in the majority of cases, to hypersecretion of the hormones and neuropeptides. This anarchic secretion is problematic as it can lead to serious clinical consequences in patients. To date, the molecular mechanisms that induce and maintain hypersecretion in these tumors are not known and there is no targeted therapy to prevent it. My thesis work shows that hypersecretion in pheochromocytoma is a direct consequence of a deregulation of the late phases of exocytosis and that treatment with the somatostatin analogue pasireotide effectively inhibits hypersecretion.

Key words: pheochromocytoma, secretion, calcium-regulated exocytosis, somatostatin analogue