



**HAL**  
open science

# Tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques : recherche de nouveaux mécanismes de progression tumorale et de nouvelles cibles thérapeutiques

Julien Bollard

► **To cite this version:**

Julien Bollard. Tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques : recherche de nouveaux mécanismes de progression tumorale et de nouvelles cibles thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10016 . tel-00987973

**HAL Id: tel-00987973**

**<https://theses.hal.science/tel-00987973>**

Submitted on 7 May 2014

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

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

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE : Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 14 Février 2014

par :

**Julien BOLLARD**

TITRE

**Tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques : recherche de nouveaux mécanismes de progression tumorale et de nouvelles cibles thérapeutiques**

Directeur de thèse : Madame Colette ROCHE

JURY :	Madame Anne BARLIER	Rapportrice
	Madame Joëlle ROCHE	Rapportrice
	Monsieur Gilles PAGES	Examineur
	Monsieur Gérard RAVEROT	Examineur
	Monsieur Jean-Yves SCOAZEC	Examineur
	Madame Colette ROCHE	Directrice de thèse

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

**M. François-Noël GILLY**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIES***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme la Professeure H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

## Remerciements

---

La fameuse partie remerciements. La première partie, (voire la seule), que la plupart d'entre vous, lecteurs, liront. Malgré tout, la partie de cette thèse la plus difficile à écrire (non, je rigole !).

Bonne lecture !

Aux membres de mon jury de thèse : merci à **Anne Barlier** et **Joëlle Roche** d'avoir examiné ce travail en tant que rapportrices. Merci à **Gérald Raverot** d'avoir commenté ce travail en tant qu'examineur, ainsi qu'à **Gilles Pagès** pour avoir, de plus, suivi mon travail en qualité de membre de mon comité de suivi de thèse.

Je remercie **Jean-Yves** pour la confiance et le soutien qu'il m'a apporté et qui a donc permis la réalisation de ce travail.

Merci à **Toufic Renno** d'avoir suivi mon travail en tant que membre de mon comité de suivi de thèse.

Les lignes suivantes iront aux membres, anciens et actuels, de mon groupe :

- A **Colette** : la « chef », surnom que tu affectionnes peu, j'en profite donc au passage pour le placer une énième et dernière fois. Merci à toi pour ces fantastiques 56 mois passés à tes côtés, beaucoup de bonne humeur, énormément de travail. Merci pour ta simplicité, ton franc-parler, ta confiance, ton implication dans le travail ; toutes ces qualités que tu sais transmettre et qui ont fait de moi quelqu'un de meilleur, humainement et scientifiquement (enfin j'espère ...). On recommence quand tu veux !

- A **Martine**, technicienne hors pair qui m'a tout appris, ma maman du labo, en somme. Nous avons tout partagé, les bons moments comme les mauvais. Rarement une journée au laboratoire n'a commencé sans toi. Je souhaite de tout mon cœur que seul le meilleur t'accompagne pour le futur. Point besoin d'envolée lyrique ici, tu sais tout le bien que je pense de toi et l'admiration que je te porte. Vivement la retraite, tu l'aura amplement méritée !

- A **Patrick**, mon équipier de tous les jours, qui m'a rejoint en cours de route. Rarement une journée au laboratoire n'a fini sans toi. Certains prétendent même qu'on serait jumeaux ... attendons quand même les résultats du test ADN. Merci pour nos discussions, ton état d'esprit positif, tes conseils, ton accompagnement, ton sens critique et de la réflexion. Dès notre première rencontre, il fut évident que notre tandem fonctionnerait à merveille. Patrick ou le parfait mélange entre bonne humeur et jugement scientifique, le tout avec un déhanché à mi-chemin entre Mickael Jackson et John Travolta.

- A **Christophe**, qui m'a montré l'exemple pendant mon année de Master 2. J'espère avoir été un digne successeur.
- Aux membres d'ANIPATH, **Nico**, pour nos très nombreux échanges durant ces quatre années, un peu de science, beaucoup de rigolades, énormément d'histologie. Ainsi qu'à **Armelle** et **Lucie**, pour leur gentillesse et leur bonne volonté lorsqu'il fallait aller vite. Une pensée pour Histolab, qui m'a aussi beaucoup accompagné pendant tout ce temps.
- A **Valérie, Sarah, Marie-Odile** et **Florian**, pour tout le côté humain de ce travail (hé oui, même un chercheur doit savoir être humain par moment). Merci pour votre bonne humeur, notamment lors des longues séances de lecture de lames.
- A **Noura** : une fille pétillante et toujours souriante, médecin mais au top ! Les patients ont de la chance d'avoir quelqu'un comme toi pour s'occuper d'eux. Mais vu ta spécialité, j'espère ne jamais avoir affaire à toi ...

Merci à tous les membres de l'équipe, anciens et actuels, en particulier **Martine, Annie, Carole, Patricia, Alja, Mathilde, Jean, Juliette** ainsi qu'à tout le team CLB.

Spéciale dédicace à **Cécile** et **Joëlle** pour tous les délires que l'on a pu avoir durant toutes ces années.

Une pensée pour tous les étudiants qui sont passés au labo et particulièrement à ceux que j'ai eu la chance de co-encadrer :

- **Karima**, je te souhaite d'être ma digne successeuse (ce mot existe au Canada et en Belgique !)
- **Gladys**, une explosion de vie, un feu d'artifice !
- **Sarah**, la meilleur harlem-shakeuse que j'ai rencontré !
- **Olivia**, une étudiante brillante, normal puisque diplômée de l'ESTBB !
- **Nelly** et **Laetitia**.

Merci aux filles du LMT : **Isabelle, Virginie, Emilie**.

Merci à **Pierre, Aubin** et **Coralie** pour les discussions scientifiques et les pauses.

Merci à toute la tribu, en particulier **Merry, Larry, JB, Lélette, Riccos, Manouche, Guib, Mky, LaO, Mike, Sarah, Chachichon, Spouf, Bob** et tous les autres !

Merci à **Isabelle Hardy** (ESTBB) : l'envie de faire de la recherche, c'est pendant mes stages durant l'ESTBB qu'elle m'est venue (au passage, une pensée pour les amis nord-Irlandais et Norvégiens).  
Merci aussi pour m'avoir donné l'opportunité de faire du tutorat et d'avoir ainsi pu me retrouver de l'autre côté de la barrière.

Merci à **Isabelle Goude** (IPROB) pour m'avoir donné l'opportunité de faire de l'enseignement.

Merci à **Audrey**, ma doudou qui a le courage de me supporter depuis plus de sept années, et particulièrement durant les quatre dernières (je n'aurais pas aimé être à sa place ...). D'ici peu, ce sera pour la vie, pour le meilleur et pour le pire ... bon courage !

Aucune cellule n'a été maltraitée durant cette thèse.

# Tables des matières

Liste des abréviations.....	4
Liste des illustrations et tableaux.....	6
<b>Données bibliographiques.....</b>	<b>7</b>
<b>Première Partie - Les tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques .....</b>	<b>8</b>
<b>1. LES CELLULES ENDOCRINES .....</b>	<b>9</b>
1.1. ORIGINE EMBRYONNAIRE .....	9
1.2. ORGANISATION ANATOMIQUE .....	10
1.3. FONCTIONS .....	10
<b>2. EPIDEMIOLOGIE DES TNE-GEPS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. LES SYNDROMES GENETIQUES HEREDITAIRES.....</b>	<b>12</b>
3.1. NEOPLASIE ENDOCRINIENNE MULTIPLE DE TYPE 1 .....	12
3.2. SYNDROME DE VON HIPPEL-LINDAU .....	13
3.3. NEUROFIBROMATOSE DE TYPE 1 .....	13
3.4. SCLEROSE TUBEREUSE DE BOURNEVILLE .....	14
<b>4. HISTOIRE NATURELLE DES TNE-GEPS.....</b>	<b>14</b>
4.1. DEVELOPPEMENT ET PROGRESSION .....	14
4.2. HETEROGENEITE .....	17
<b>5. APPORTS DE L'ANATOMOPATHOLOGIE .....</b>	<b>17</b>
5.1. CLASSIFICATIONS .....	18
5.1.1. OMS .....	18
5.1.2. TNM .....	19
5.1.3. Grade histologique.....	19
5.2. DIAGNOSTIC .....	20
5.2.1. Hormones et autres marqueurs sériques .....	20
5.2.2. Marqueurs tissulaires.....	21
<b>6. ASPECT CLINIQUE.....</b>	<b>22</b>
6.1. CARACTERISATION DE L'ETAT FONCTIONNEL .....	22
6.2. SITES ANATOMIQUES DE DEVELOPPEMENT .....	22
6.2.1. Pancréas.....	23
6.2.2. Estomac.....	23
6.2.3. Duodénum et jéjunum proximal .....	23
6.2.4. Jéjunum distal et iléon .....	24
6.2.5. Appendice .....	24

6.2.6.	<i>Côlon</i> .....	24
6.2.7.	<i>Rectum</i> .....	25
<b>7.</b>	<b>TRAITEMENT</b> .....	<b>25</b>
7.1.	BIOETHERAPIES .....	25
7.1.1.	<i>Les analogues de la somatostatine</i> .....	25
7.1.2.	<i>L'interféron-<math>\alpha</math></i> .....	26
7.2.	CHIRURGIE .....	27
7.3.	RADIOLOGIE INTERVENTIONNELLE .....	29
7.3.1.	<i>Embolisation</i> .....	29
7.3.2.	<i>Chimioembolisation</i> .....	29
7.4.	CHIMIOETHERAPIE .....	30
7.5.	THERAPIES CIBLEES .....	31
7.5.1.	<i>Ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase</i> .....	31
7.5.2.	<i>Ciblage de l'angiogenèse</i> .....	32
7.5.3.	<i>Ciblage de la voie de signalisation mTOR</i> .....	32
<b>8.</b>	<b>EXEMPLE DE THERAPIE CIBLEE : LA VOIE MTOR</b> .....	<b>33</b>
8.1.	STRUCTURE DE MTOR .....	33
8.2.	REGULATIONS .....	34
8.2.1.	<i>Facteurs de croissance</i> .....	34
8.2.2.	<i>Métabolisme énergétique</i> .....	35
8.2.3.	<i>Etat nutritionnel</i> .....	36
8.2.4.	<i>Stress</i> .....	36
8.3.	MECANISMES CELLULAIRES REGULES PAR MTOR .....	37
8.4.	PERTINENCE DE L'INHIBITION DE MTOR EN CANCEROLOGIE .....	38
8.4.1.	<i>Dans les cancers non endocrines</i> .....	39
8.4.2.	<i>Dans les TNE-GEPs</i> .....	40

**Seconde Partie - Vers l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans la progression des TNE-GEPs.....43**

**Troisième Partie - Les sémaphorines .....47**

<b>1.</b>	<b>GENERALITES</b> .....	<b>48</b>
1.1.	DECOUVERTE .....	48
1.2.	LES 8 CLASSES .....	48
1.3.	LOCALISATION CHROMOSOMIQUE .....	49
<b>2.</b>	<b>STRUCTURE</b> .....	<b>49</b>
<b>3.</b>	<b>SIGNALISATION</b> .....	<b>49</b>



3.1.	PARTENAIRES MEMBRANAIRES .....	50
3.1.1.	<i>Neuropilines</i> .....	50
3.1.2.	<i>Plexines</i> .....	51
3.1.3.	<i>Autres co-récepteurs à activité tyrosine kinase</i> .....	52
3.2.	PARTENAIRES INTRACYTOPLASMIQUES ET EFFECTEURS.....	53
3.2.1.	<i>Protéines tyrosine kinases intracellulaires</i> .....	53
3.2.2.	<i>CRMPs</i> .....	53
3.3.	SIGNALISATION DE L'AXE SEMA3/NEUROPILINE/PLEXINE/CRMP : EFFETS SUR LA MIGRATION CELLULAIRE .....	55
<b>4.</b>	<b>ROLES BIOLOGIQUES DES SEMAPHORINES .....</b>	<b>56</b>
4.1.	GUIDAGE AXONAL.....	56
4.2.	SYSTEME IMMUNITAIRE .....	57
4.3.	BIOLOGIE TUMORALE.....	58
4.3.1.	<i>Sémaphorines pro-tumorales</i> .....	59
4.3.2.	<i>Sémaphorines anti-tumorales</i> .....	60
4.3.3.	<i>Cas particuliers : dualité pro- et anti-tumorale</i> .....	60
<b>5.</b>	<b>IMPLICATION DES SEMAPHORINES DE CLASSE 3 ET DE LEURS RECEPTEURS EN PATHOLOGIE TUMORALE</b>	<b>61</b>
5.1.	LES SEMAPHORINES DE CLASSE 3.....	61
5.2.	NEUROPILINES ET PLEXINES.....	65
	<b>Quatrième Partie - Les modèles d'étude des TNE-GEPs.....</b>	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>LIGNEES CELLULAIRES .....</b>	<b>68</b>
1.1.	HUMAINES .....	68
1.2.	SOURIS ET AUTRES RONGEURS .....	70
<b>2.</b>	<b>MODELES ANIMAUX .....</b>	<b>73</b>
2.1.	MODELE SPONTANE DE CARCINOME GASTRIQUE .....	73
2.2.	MODELES DE XENOGREFFE CHEZ LA SOURIS .....	73
2.2.1.	<i>Modèle murin de dissémination intrahépatique</i> .....	73
2.2.2.	<i>Modèle murin de xéno greffe orthotopique caecale</i> .....	74
2.3.	MODELES MURINS TRANSGENIQUES .....	74
2.3.1.	<i>Tumeurs pancréatiques</i> .....	74
2.3.2.	<i>Néoplasie endocrinienne multiple</i> .....	75
	<b>Objectifs du travail .....</b>	<b>76</b>
	<b>Etudes expérimentales.....</b>	<b>78</b>
	<b>Discussion générale et perspectives .....</b>	<b>85</b>
	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>94</b>

## Liste des abréviations

---

5-FU : 5-fluorouracile	IGFR : récepteur à l'IGF
5-HIAA : acide 5-hydroxy-indole acétique	IKK $\beta$ : I $\kappa$ B kinase B
AMPK : AMP-activated protein kinase	IL : interleukine
CDDP : cis-diaminedichloroplatine(II), cisplatine	IPT : immunoglobulin-plexin-transcription
CDK : cyclin-dependent kinase	IRS : insulin receptor substrate
Cdk5 : cyclin-dependent kinase 5	kDa : kilodalton
CEAH : chimioembolisation artérielle hépatique	MAM : meprin/A5-antigen/ptp-Mu
CgA : chromogranine A	MAP : microtubule-associated protein
CK8 : cytokératine 8	MEK : mitogen-activated protein kinase kinase
CPP : cell penetrating peptide	mTOR : mammalian target of rapamycin
CUB : calcium binding C1r/C1s/Uegf/Bmp-1	mTORC1 & 2 : mTOR complex 1 & 2
DOXO : doxorubicine	N-CAM : neural cell adhesion molecule
EAH : embolisation artérielle hépatique	NEM-1 : néoplasie endocrinienne de type 1
ECL : entérochromaffine-like	NF1 : neurofibromatose de type 1
EGF : epidermal growth factor	NRP : neuropiline
ENETS : European NeuroEndocrine Tumor Society	NSE : neuron-specific enolase
ErbB-2 : erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue 2	OMS : organisation mondiale de la santé
ERK : extracellular-signal-regulated kinase	OTK : off-track
FDA : Food and Drug Administration	PCR : polymerase chain reaction
FGF : fibroblast growth factor	pdCNE-GEP : carcinome neuroendocrine gastroentéropancréatique peu différencié
FKBP8 : FK506-binding protein	PDGF : platelet-derived growth factor
GAP : GTPase-activating protein	PDK1 : phosphoinositide-dependent kinase-1
GIPC : GAIP interacting protein, C terminus	PDZ : postsynaptic density protein (PSD95), drosophila disc large tumor suppressor (Dlg), zonula occludens protein 1
GnRH-1 : gonadotropin hormone-releasing hormone-1	PI3K : phosphoinositide 3-kinase
GSK-3 $\beta$ : glycogen synthase kinase 3 $\beta$	PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-phosphate
HGF : hepatocyte growth factor	PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate
HIF1 $\alpha$ : hypoxia inducible factor	Plk1 : polo-like kinase 1
Ig : immunoglobulin	pNET : tumeur neuroendocrine pancréatique
IGF : insulin-like growth factor	

PTEN : phosphatase and tensin homologue  
deleted on chromosome 10

Rag GTPases : Ras-related GTPase

RBD : Rho GTPase binding domain

RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire

REDD : regulated in development and DNA  
damage responses

RSK : ribosomal S6 kinase

RTK : récepteur à activité tyrosine-kinase

SEER : surveillance epidemiology and end  
results

SEMA : semaphorin

SGK-1 : serum- and glucocorticoid-induced  
protein kinase 1

SREBPs : sterol regulatory element-binding  
proteins

SSTRs : somatostatin receptors

STZ : streptozotocine

Tag : large T antigen

TCP1 : t-complex polypeptide-1

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TGF : transforming growth factor

TNE-GEP : tumeur neuroendocrine  
gastroentéropancréatique

TNF $\alpha$  : tumor necrosing factor  $\alpha$

TNM (classification) : Tumor-Nodes-Metastasis

Tpm : tropomyosine

TSC1&2 : tuberous sclerosis complex 1 & 2

VEGF : vascular endothelial growth factor

VHL (syndrome) : von Hippel-Lindau

VP-16 : étoposide

YpK2 : yeast protein kinase 2

ZEB-1 : zinc finger E-box-binding homeobox 1

## Liste des illustrations et tableaux

---

**Figure 1** : Localisation anatomique des organes de la sphère digestive abritant le système endocrinien diffus.

**Figure 2** : Incidence des TNE-GEPs digestives en fonction du site anatomique.

**Figure 3** : Expression de marqueurs communs par les cellules endocrines et les cellules nerveuses.

**Figure 4** : Structure de la protéine mTOR.

**Figure 5** : Structure des complexes mTORC1 et mTORC2.

**Figure 6** : La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

**Figure 7** : Inhibition de la voie de signalisation mTOR : rétrocontrôle et stratégies d'inhibition.

**Figure 8** : Les huit classes de sémaphorines : membres et structure.

**Figure 9** : Structure des neuropilines.

**Figure 10** : Structure des quatre sous-familles de plexines.

**Figure 11** : Modèle d'interaction entre une sémaphorine de classe 3 et ses récepteurs.

**Figure 12** : Modulation de l'état de phosphorylation des protéines CRMPs : exemple de CRMP2.

**Figure 13** : Les sémaphorines de classe 3 et leurs récepteurs.

**Figure 14** : Le modèle de dissémination intrahépatique.

**Figure 15** : Le modèle de xéno greffe orthotopique caecale.

**Figure 16** : Chronogramme de la tumorigenèse dans le modèle de tumeurs pancréatiques RIP-TAG.

**Tableau 1** : Origine embryonnaire des organes du tractus digestif.

**Tableau 2** : Les hormones du tractus digestif, sites de production, organes cibles et fonctions.

**Tableau 3** : Correspondances entre les classifications OMS 2000 et 2010.

**Tableau 4** : Système de gradation des TNE-GEPs.

**Tableau 5** : Localisation chromosomique des sémaphorines, des neuropilines et des plexines.

**Tableau 6** : Variation d'expression des sémaphorines de classe 3 et de leurs récepteurs dans différents cancers.

**Tableau 7** : Les lignées tumorales neuroendocrines digestives d'origine humaine.

**Tableau 8** : Les lignées tumorales neuroendocrines digestives développées chez les rongeurs.

## **Données bibliographiques**

# **Première Partie - Les tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques**

Les tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (TNE-GEPs) sont des tumeurs d'origine épithéliale, qui expriment des marqueurs neuroendocrines. Ces tumeurs dérivent de cellules endocrines néoplasiques, dont les caractéristiques morphologiques, phénotypiques et fonctionnelles sont proches des cellules endocrines normales (Figure 1).

## **1. Les cellules endocrines**

### **1.1. Origine embryonnaire**

L'origine embryonnaire des cellules endocrines a longtemps été discutée. Durant de nombreuses décennies, la conception dominante prétendait que les cellules du système endocrinien diffus dérivait de précurseurs issus de la crête neurale qui migraient vers leur localisation définitive. Les cellules endocrines des tissus périphériques étaient alors regroupées dans un système commun, appelé APUD (pour amine precursor uptake and decarboxylation). Cette ancienne conception est désormais abandonnée et l'essor de l'embryologie et de la biologie développementale a permis de préciser l'origine embryonnaire des cellules endocrines.

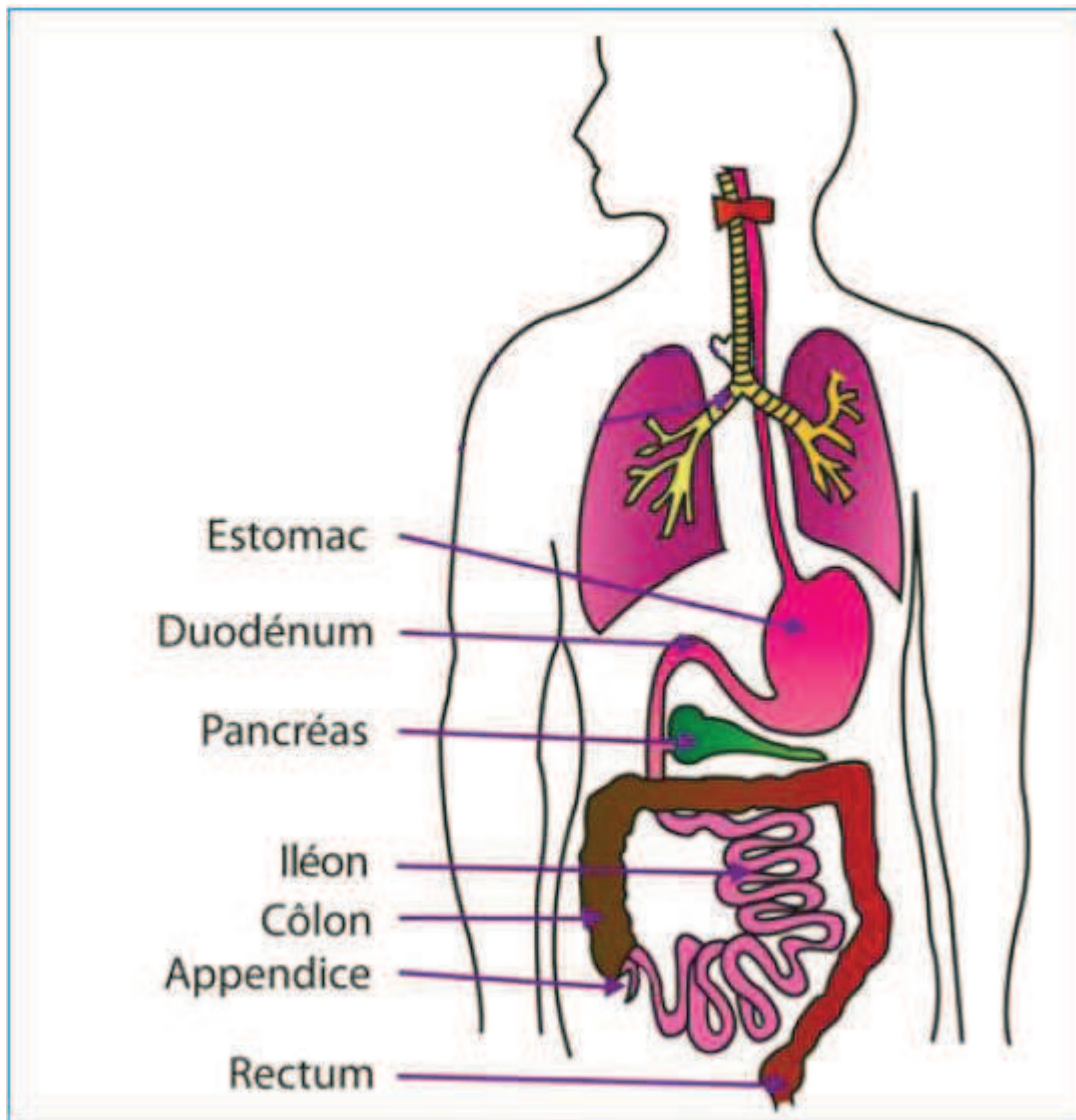
En réalité, même si certaines cellules endocrines dérivent effectivement de la crête neurale (cellules de la médullo-surrénale ou cellules para-folliculaires de la thyroïde par exemple), la plupart se forment sur place et proviennent des mêmes précurseurs que les cellules épithéliales environnantes (Montuenga et al., 2003). Dans le pancréas, la même cellule souche est à l'origine des cellules acinaires, canalaire, centro-acinaire et endocrine. Dans le tube digestif, la situation est plus complexe (Schonhoff et al., 2004). L'intestin embryonnaire est divisé en trois segments distincts (antérieur, moyen et postérieur) qui possèdent chacun un compartiment spécifique de précurseurs d'où dérive l'ensemble des cellules épithéliales du segment considéré (Tableau 1). Les cellules endocrines digestives dérivent d'un précurseur spécifique de chacun des trois segments, mais commun aux cellules endocrines et autres cellules exocrines de l'environnement.

La différenciation endocrine à partir des précurseurs souches va impliquer différents facteurs selon l'organe considéré mais le schéma général reste identique et suit trois grandes étapes dont (1) l'émergence du précurseur commun à l'ensemble des cellules endocrines de l'organe en réponse à l'induction d'un facteur de transcription spécifique tel que la neurogénine 3 pour le tube digestif et le pancréas endocrine (Gradwohl et al., 2000; Wang et al., 2009) ; puis (2) l'émergence des précurseurs des différentes lignées endocrines présentes au sein de l'organe, cette étape dépend de l'activation séquentielle de plusieurs facteurs de transcription ; et (3) la différenciation terminale des cellules endocrines en cellules spécialisées, étape elle-même contrôlée par différents facteurs spécifiques .

Partie embryonnaire	Dérivés adultes
Intestin antérieur	Pharynx, partie basse du système respiratoire, œsophage, estomac, moitié proximale du duodénum, foie, pancréas, vésicule biliaire
Intestin moyen	Intestin grêle, moitié distale du duodénum, caecum, côlon ascendant, la plupart du côlon transverse
Intestin postérieur	Partie gauche du côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde, rectum, urètre

**Tableau 1 : Origine embryonnaire des organes du tractus digestif.**





**Figure 1 : Localisation anatomique des organes de la sphère digestive abritant le système endocrinien diffus.**

Les tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques peuvent émerger à partir de n'importe quelle cellule ou structure endocrine du tractus digestif.

Partie embryonnaire	Dérivés adultes
Intestin antérieur	Pharynx, partie basse du système respiratoire, œsophage, estomac, moitié proximale du duodénum, foie, pancréas, vésicule biliaire
Intestin moyen	Intestin grêle, moitié distale du duodénum, caecum, côlon ascendant, la plupart du côlon transverse
Intestin postérieur	Partie gauche du côlon transverse, côlon descendant, côlon sigmoïde, rectum, urètre

**Tableau 1 : Origine embryonnaire des organes du tractus digestif.**

## **1.2. Organisation anatomique**

Trois modes d'organisation anatomique caractérisent les cellules endocrines : (1) certaines constituent des organes autonomes, ou glandes endocrines, tels que l'hypophyse, la thyroïde ou le thymus ; (2) d'autres sont associées aux organes sexuels ; (3) tandis que d'autres sont associées à d'autres types cellulaires, au sein desquels elles forment le système endocrinien diffus. C'est à cette dernière catégorie qu'appartiennent les cellules endocrines du tractus digestif et celles annexées aux muqueuses respiratoires et au revêtement de nombreux canaux excréteurs des glandes endocrines. Le système endocrine diffus associé au tractus digestif peut être d'ailleurs considéré comme la plus grande glande endocrine de l'organisme, tant en termes de densité cellulaire que de variétés d'hormones synthétisées et sécrétées.

## **1.3. Fonctions**

La propriété intrinsèque d'une cellule endocrine est de synthétiser, puis de sécréter une ou plusieurs hormones. Une hormone est un médiateur chimique qui possède des propriétés fondamentales : elle agit de manière sélective sur des cellules cibles spécifiques, son effet est médié par la fixation de l'hormone sur un ou des récepteurs spécifiques exprimés par les cellules cibles et cette fixation engendre la stimulation du récepteur qui va modifier l'activité biologique de la cible et induire un rétrocontrôle négatif sur la production de l'hormone.

Les hormones sont classiquement sécrétées par les cellules endocrines dans le tissu conjonctif, avant de rejoindre éventuellement le réseau vasculaire. Trois voies d'action des hormones sont alors envisageables : (1) la voie endocrine qui correspond au passage de l'hormone dans la circulation sanguine et à sa diffusion dans l'ensemble de l'organisme, opérant ainsi une action sur des cibles cellulaires situées à distance, (2) la voie paracrine qui correspond à la diffusion locale de l'hormone, permettant ainsi une action sur des cibles cellulaires à courte distance, et (3) la voie autocrine qui correspond au cas où la cellule productrice de l'hormone et la cellule cible sont une seule et même cellule.

Les hormones utilisent majoritairement la voie d'action endocrine et sont capables de réguler leur synthèse et sécrétion par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Ce rétrocontrôle est la conséquence de l'action biologique de l'hormone sur la cellule cible et est une caractéristique spécifique de ce type particulier de protéine.

Les hormones sont classées chimiquement en trois catégories : (1) les hormones stéroïdes de nature lipidique dont font partie les œstrogènes et la testostérone, (2) les hormones monoaminées de nature protidique et de solubilité variable telles que l'adrénaline ou les hormones stéroïdiennes, et

(3) les hormones peptidiques de nature protidique, solubles dans le plasma et qui sont sécrétées par les cellules endocrines.

Si l'on prend l'exemple du tube digestif, il est recensé, à ce jour, au moins 13 types différents de cellules endocrines qui vont sécréter différentes hormones comme la sérotonine, la somatostatine ou encore la gastrine (Tableau 2).

Dans le pancréas, les cellules endocrines sont regroupées en structures appelées îlots de Langerhans et sont aussi de nature sécrétoire différente. On distingue les cellules  $\alpha$  (qui sécrètent le glucagon),  $\beta$  (insuline),  $\delta$  (somatostatine), PP (polypeptide pancréatique) et  $\epsilon$  (ghréline).

Ces médiateurs sont stockés dans des vésicules ou grains de sécrétion et leur sécrétion est régulée par des récepteurs couplés aux protéines G, des canaux ioniques ou encore des récepteurs à activité tyrosine-kinase. En réponse à des stimuli extracellulaires, les médiateurs contenus dans les grains de sécrétion seront libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose. Ces grains de sécrétion assurent aussi la fonction de maturation des hormones qu'ils contiennent. En effet, ils participent à l'activation de la pro-hormone en hormone active via un équipement enzymatique riche, dont font partie les convertases PC1, 2 et 3 (Day and Salzet, 2002). D'autres protéines composant la matrice des grains de sécrétion, comme la chromogranine A (CgA), sont indispensables aux mécanismes de fusion des grains de sécrétion à la membrane cellulaire (Yoo et al., 2005). La CgA est donc libérée avec l'hormone dans le milieu extracellulaire et, en ce sens, est considérée comme un marqueur endocrine qui pourra être dosé dans le sérum humain (voir section 5.2.2) (Ozawa and Takata, 1995). D'autres protéines, telle que la synaptophysine (glycoprotéine membranaire des vésicules de sécrétion), sont des marqueurs dits « neuroendocrines » car communs aux cellules endocrines et nerveuses. Cette expression de marqueurs communs justifie d'ailleurs le terme de « tumeur neuroendocrine » et ces propriétés communes entre système endocrine et système nerveux seront largement développées et mises à profit dans ce travail pour identifier de nouveaux facteurs participant aux mécanismes de progression des TNE-GEPs (voir seconde partie).

## **2. Epidémiologie des TNE-GEPs**

Les TNE-GEPs constituent un groupe de tumeurs plutôt rares, puisque leur incidence est estimée à environ 2,5 à 5 cas pour 100 000. Les données du SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) indiquent que la prévalence et l'incidence des TNE-GEPs ont augmenté depuis le milieu des années 1980 (Figure 2). Ces tendances peuvent être, en partie, expliquées par l'amélioration des techniques d'imagerie endoscopique et radiologique qui ont abouti à la hausse du nombre de tumeurs bénignes diagnostiquées, ainsi que du nombre de tumeurs découvertes de façon fortuite (Modlin et al., 2008). Néanmoins, ces chiffres sont probablement sous-estimés puisque des séries autopsiques anciennes

HORMONE	SITE OF PRODUCTION	STIMULUS FOR PRODUCTION	TARGET ORGAN	ACTIVITY
Cholecystokinin (CCK)	Duodenal mucosa	Fatty chyme (also partially digested proteins)	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits stomach's secretory activity</li> </ul>
			Liver/pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Potentiates secretin's actions on these organs</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases output of enzyme-rich pancreatic juice</li> </ul>
			Gallbladder	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates organ to contract and expel stored bile</li> </ul>
Gastric inhibitory peptide (GIP) (or glucose-dependent insulinotropic peptide)	Duodenal mucosa	Fatty chyme	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits HCl production (minor effect)</li> </ul>
			Pancreas (beta cells)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates insulin release</li> </ul>
Gastrin	Stomach mucosa (G cells)	Food (particularly partially digested proteins) in stomach (chemical stimulation); acetylcholine released by nerve fibers	Stomach (parietal cells)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases HCl secretion</li> </ul>
			Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates gastric emptying (minor effect)</li> </ul>
			Ileocecal valve	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates contraction of intestinal muscle</li> </ul>
			Large intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Relaxes ileocecal valve</li> <li>Stimulates mass movements</li> </ul>
Histamine	Stomach mucosa	Food in stomach	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activates parietal cells to release HCl</li> </ul>
Intestinal gastrin	Duodenal mucosa	Acidic and partially digested foods in duodenum	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates gastric glands and motility</li> </ul>
Motilin	Duodenal mucosa	Fasting; periodic release every 1½-2 hours by neural stimuli	Proximal duodenum	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates migrating motor complex</li> </ul>
Secretin	Duodenal mucosa	Acidic chyme (also partially digested proteins and fats)	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits gastric gland secretion and gastric motility during gastric phase of secretion</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases output of pancreatic juice rich in bicarbonate ions; potentiates CCK's action</li> </ul>
			Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases bile output</li> </ul>
Serotonin	Stomach mucosa	Food in stomach	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Causes contraction of stomach muscle</li> </ul>
Somatostatin	Stomach mucosa; duodenal mucosa	Food in stomach; stimulation by sympathetic nerve fibers	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits gastric secretion of all products</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits secretion</li> </ul>
			Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits GI blood flow; thus inhibits intestinal absorption</li> </ul>
			Gallbladder and liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits contraction and bile release</li> </ul>
Vasoactive intestinal peptide (VIP)	Enteric neurons	Chyme containing partially digested foods	Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates buffer secretion</li> <li>Dilates intestinal capillaries</li> <li>Relaxes intestinal smooth muscle</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases secretion</li> </ul>
			Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits acid secretion</li> </ul>

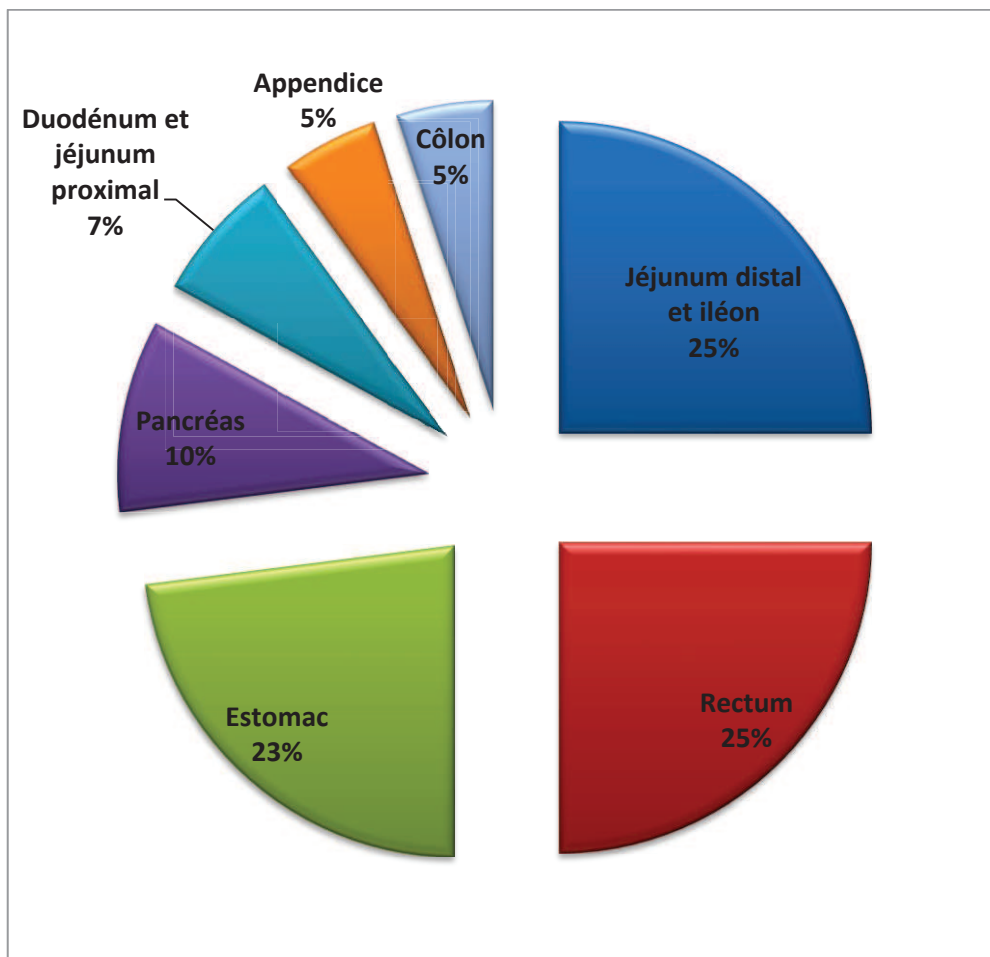
**Tableau 2 : Les hormones du tractus digestif, sites de production, organes cibles et fonctions.**

(source : [www.midlandstech.com](http://www.midlandstech.com))

HORMONE	SITE OF PRODUCTION	STIMULUS FOR PRODUCTION	TARGET ORGAN	ACTIVITY
Cholecystokinin (CCK)	Duodenal mucosa	Fatty chyme (also partially digested proteins)	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits stomach's secretory activity</li> </ul>
			Liver/pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Potentiates secretin's actions on these organs</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases output of enzyme-rich pancreatic juice</li> </ul>
			Gallbladder	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates organ to contract and expel stored bile</li> </ul>
Gastric inhibitory peptide (GIP) (or glucose-dependent insulinotropic peptide)	Duodenal mucosa	Fatty chyme	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits HCl production (minor effect)</li> </ul>
			Pancreas (beta cells)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates insulin release</li> </ul>
Gastrin	Stomach mucosa (G cells)	Food (particularly partially digested proteins) in stomach (chemical stimulation); acetylcholine released by nerve fibers	Stomach (parietal cells)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases HCl secretion</li> </ul>
			Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates gastric emptying (minor effect)</li> </ul>
			Ileocecal valve	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates contraction of intestinal muscle</li> </ul>
			Large intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Relaxes ileocecal valve</li> <li>Stimulates mass movements</li> </ul>
Histamine	Stomach mucosa	Food in stomach	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activates parietal cells to release HCl</li> </ul>
Intestinal gastrin	Duodenal mucosa	Acidic and partially digested foods in duodenum	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates gastric glands and motility</li> </ul>
Motilin	Duodenal mucosa	Fasting; periodic release every 1½-2 hours by neural stimuli	Proximal duodenum	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates migrating motor complex</li> </ul>
Secretin	Duodenal mucosa	Acidic chyme (also partially digested proteins and fats)	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits gastric gland secretion and gastric motility during gastric phase of secretion</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases output of pancreatic juice rich in bicarbonate ions; potentiates CCK's action</li> </ul>
			Liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases bile output</li> </ul>
Serotonin	Stomach mucosa	Food in stomach	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Causes contraction of stomach muscle</li> </ul>
Somatostatin	Stomach mucosa; duodenal mucosa	Food in stomach; stimulation by sympathetic nerve fibers	Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits gastric secretion of all products</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits secretion</li> </ul>
			Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits GI blood flow; thus inhibits intestinal absorption</li> </ul>
			Gallbladder and liver	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits contraction and bile release</li> </ul>
Vasoactive intestinal peptide (VIP)	Enteric neurons	Chyme containing partially digested foods	Small intestine	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stimulates buffer secretion</li> <li>Dilates intestinal capillaries</li> <li>Relaxes intestinal smooth muscle</li> </ul>
			Pancreas	<ul style="list-style-type: none"> <li>Increases secretion</li> </ul>
			Stomach	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibits acid secretion</li> </ul>

**Tableau 2 : Les hormones du tractus digestif, sites de production, organes cibles et fonctions.**

(source : [www.midlandstech.com](http://www.midlandstech.com))



**Figure 2 : Incidence des TNE-GEPs digestives en fonction du site anatomique.**

(d'après le registre du SEER, 2008)

rapportent une incidence de 8,4 pour 100 000 (Newton et al., 1994). Les registres américains et français rapportent des distributions anatomiques des TNE-GEPs semblables. La principale étude française indique les incidences suivantes, par ordre d'importance et pour les principales localisations : intestin grêle (38,9%), région colorectale (27,1%) et pancréas (20,5%) (Lepage et al., 2004). Néanmoins, une étude plus récente des mêmes auteurs, rapporte des disparités importantes au sein même du continent européen : les tumeurs endocrines de l'intestin grêle représenteraient 19,4% des TNE-GEPs en Europe de l'est, et 46,9% en Europe du nord (Lepage et al., 2010). Si l'on s'intéresse au degré de différenciation, il apparaît que les TNE-GEPs bien différenciées sont surreprésentées par rapport aux TNE-GEPs peu différenciées (le ratio étant environ de 80/20 pour l'Autriche et l'Angleterre).

De façon globale, les TNE-GEPs représentent environ 2% des tumeurs malignes gastrointestinales.

### **3. Les syndromes génétiques héréditaires**

Bien que la grande majorité des TNE-GEPs soit sporadique, il existe néanmoins 4 syndromes héréditaires de prédisposition génétique associés à un risque de développement de TNE-GEPs (Calender, 2000) : la néoplasie endocrinienne multiple de type 1, le syndrome de von Hippel-Lindau, la neurofibromatose de type 1 et la sclérose tubéreuse de Bourneville. De plus, certaines anomalies génétiques ont été décrites pour les TNE-GEPs sporadiques.

#### **3.1. Néoplasie endocrinienne multiple de type 1**

La néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1, ou syndrome de Wermer) est un syndrome de susceptibilité tumorale autosomal dominant qui engendre l'apparition de tumeurs endocrines des parathyroïdes, du duodénum, du pancréas endocrine, de l'antéhypophyse, du cortex surrénalien, du thymus et des bronches. Sa prévalence est estimée à 1 pour 40 000.

La plupart des patients (90%) présentent des atteintes parathyroïdiennes avec des adénomes. La seconde localisation des lésions NEM1, en termes de fréquence, est le tissu entéropancréatique. Des gastrinomes duodénaux sont fréquemment retrouvés, et sont caractérisés par une évolution maligne dans 40% des cas. Au niveau pancréatique, les lésions causées résultent surtout en des insulinomes, bénins pour la plupart (90% des cas). Hors insulinomes, de rares tumeurs agressives peuvent émerger, telles des gastrinomes pancréatiques ou des VIPomes (tumeurs sécrétant le vasoactive intestinal peptide).

Le gène *NEM1* est situé sur le chromosome 11q13 et code pour la ménine, une protéine de 67 kDa localisée dans le noyau cellulaire, dans le cytoplasme et aux environs des télomères (Agarwal et al.,



2004). Des mutations germinales de *NEM1* sont identifiables chez 70 à 90% des familles touchées par ce syndrome. Les profils mutationnels observés dans les lignées germinales et somatiques sont équivalents, et vont donner lieu, dans 80% des cas, à une absence de la ménine ou à sa troncature. La ménine peut se lier directement à l'ADN (La et al., 2004) et joue un rôle dans la régulation transcriptionnelle via une séquence de localisation nucléaire (La et al., 2006). La protéine va aussi interagir avec un très grand nombre de partenaires et donc être impliquée dans des mécanismes divers et variés (Balogh et al., 2010).

De nombreuses études, notamment menées chez des modèles murins, ont montré que *NEM1* est un gène suppresseur de tumeur. En effet, les souris KO hétérozygotes pour ce gène sont un bon modèle de la pathologie NEM1 (Bertolino et al., 2003a; Biondi et al., 2004). A partir de 16 mois, elles développent des tumeurs de la parathyroïde, des insulinomes et des prolactinomes.

### **3.2. Syndrome de von Hippel-Lindau**

La maladie de von Hippel-Lindau (VHL) est un syndrome néoplasique autosomal dominant, résultant de la mutation germinale du gène *VHL*. Cette pathologie engendre le développement d'hémangioblastomes de la rétine et du système nerveux central, des phéochromocytomes ou encore des tumeurs pancréatiques. Chez 11 à 17% des patients VHL, c'est le compartiment endocrine qui est touché, avec l'apparition de tumeurs endocrines pancréatiques à potentiel métastatique. A noter que, dans 20 à 30% des cas, l'absence de la protéine VHL (pVHL) est due à des délétions larges du gène *VHL*.

Le gène suppresseur de tumeur *VHL* est localisé sur le chromosome 3p25-26 et code pour pVHL qui transite entre le noyau et le cytoplasme et dont une des fonctions va être de dégrader la sous-unité  $\alpha$  des facteurs HIFs (Hypoxia-Inducible Factors). L'absence de pVHL va donc induire une stabilisation des HIFs et la production non contrôlée des facteurs de croissance (dont le VEGF, vascular endothelial growth factor) qui vont favoriser le développement tumoral (Kaelin, 2002). pVHL possède d'autres rôles complexes, notamment dans la régulation du cycle cellulaire, la transcription (élongation de l'ARN et stabilité de l'ARN messenger) et l'organisation du cytosquelette (Roe and Youn, 2006).

### **3.3. Neurofibromatose de type 1**

La neurofibromatose de type 1 (NF1, ou maladie de Recklinghausen) est une maladie autosomale dominante relativement fréquente (incidence estimée à 1 cas pour 2500) qui prédispose à des tumeurs cutanées et à des tumeurs des systèmes nerveux central et périphérique. Chez un faible

pourcentage de patients, la NF1 est aussi responsable de phéochromocytomes, de paragangliomes, et de tumeurs de la sphère digestive (duodénum principalement, estomac et pancréas plus rarement). Cette pathologie résulte de la perte de fonction de la neurofibromine 1, protéine codée par le gène *NF1* (chromosome 17q11-2) et impliquée dans la régulation négative des petites protéines G (Ras-GTP/Ras-GDP notamment) et la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) via une action sur la protéine TSC2 (Johannessen et al., 2005).

### 3.4. Sclérose tubéreuse de Bourneville

La sclérose tubéreuse de Bourneville (Tuberous Sclerosis Complex, TSC) est aussi un syndrome génétique de nature autosomale dominante dû à l'inactivation de 2 gènes, *TSC1* (9q34) et *TSC2* (16p13.3), codant respectivement pour l'hamartine et la tubérine. Les deux protéines régulent négativement la signalisation mTOR, et l'absence d'une de ces protéines va entraîner une suractivation de la voie de signalisation. Une étude a d'ailleurs montré que l'inactivation de *TSC2* dans des cellules  $\beta$ -pancréatiques induisait leur prolifération, de façon mTOR-dépendante (Rachdi et al., 2008).

## 4. Histoire naturelle des TNE-GEPs

### 4.1. Développement et progression

L'histoire naturelle des TNE-GEPs peut être résumée par trois étapes se déroulant successivement : (a) la phase d'initiation durant laquelle émerge un clone néoplasique, (b) la phase d'invasion locale pendant laquelle le clone se développe au sein de l'organe qui lui a donné naissance, et (c) la phase de dissémination métastatique, caractérisée par la dispersion du clone néoplasique vers des organes régionaux ou à distance.

Les mécanismes précoces qui régissent la **phase d'initiation** et l'émergence d'un clone néoplasique sont pratiquement inconnus, sauf pour les tumeurs endocrines gastriques à cellules ECL (entérochromaffine-like) qui surviennent dans un contexte d'hypergastrinémie chronique. En effet, les étapes qui récapitulent le développement de la tumeur à partir d'une hyperplasie endocrine sont morphologiquement très bien décrites (Solcia et al., 1995). Un autre exemple est celui du syndrome NEM-1. Néanmoins, ces cas particuliers ne peuvent en aucun cas être extrapolés aux autres TNE-GEPs. Il est important de noter que ni les principaux oncogènes connus (*SRC*, *MYC*, *RAS*, *FOS*, *HER2*, *RET* ...), ni les principaux gènes suppresseurs de tumeurs (*p53*, *BRCA*, *RB* ...) ne semblent impliqués dans la tumorigenèse neuroendocrine gastroentéropancréatique (sauf cas très particulier des

carcinomes pancréatiques de haut grade). Des mutations ou altérations de ces gènes ont été retrouvées dans certaines formes très atypiques et agressives, représentant seulement 5 à 10% des cas (Rindi et al., 2000). Quelques gènes ou aberrations génétiques potentiellement impliqués dans la tumorigenèse neuroendocrine ont été suspectés, tels que *DPC/SMAD4*, *p14/p15*, ainsi que des gènes suppresseurs de tumeurs localisés sur les chromosomes 18 et 3 sans que leurs implications soient réellement validées (Bartsch et al., 1999; Löllgen et al., 2001; Muscarella et al., 1998; Nikiforova et al., 1999). Plus récemment, il a été mis en évidence que les gènes *DAXX* et *ATRXX*, deux sous-unités d'un complexe impliqué dans le remodelage de la chromatine, étaient mutés dans presque la moitié des tumeurs endocrines pancréatiques (Jiao et al., 2011). Une autre étude rapporte que la mutation inactivatrice de ces deux gènes est retrouvée exclusivement dans les tumeurs pancréatiques G1 et G2, et pas dans les carcinomes pancréatiques. Comme noté précédemment, la très grande majorité des carcinomes endocrines pancréatiques présente des mutations de *p53*, ainsi que de *Rb* (Yachida et al., 2012). A noter que toutes ces études concernent seulement les tumeurs neuroendocrines pancréatiques, et qu'aucune mutation n'a été rapportée pour celles du tractus digestif, même si une étude de 2008 a suggéré l'implication du gène suppresseur de tumeurs *APC* dans les TNE-GEPs non-pancréatiques (Pizzi et al., 2008). Le profil génomique d'une série de 48 tumeurs neuroendocrines de l'intestin grêle a été publié récemment. Les auteurs montrent que des mutations de certains composants de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR sont fréquentes (33% des tumeurs), ainsi que les pertes du gène suppresseur de tumeur *SMAD4* (46%) même si aucune mutation de ce dernier n'a été mise en évidence. De plus, l'étude montre que le gène *SRC* est fréquemment amplifié dans ces tumeurs de l'intestin grêle (Banck et al., 2013). De façon intéressante, le rôle de la kinase Src a déjà été suggéré, via un rôle sur l'activation de mTOR dans les cellules neuroendocrines (Gaur et al., 2011). En 2013, une autre étude génomique d'une série de 180 TNE-GEPs de l'intestin grêle montre des délétions du gène *CDKN1B* (codant pour p27, régulateur négatif du cycle cellulaire) dans 8% des cas, suggérant ainsi un rôle potentiel des mécanismes de régulation du cycle cellulaire dans la tumorigenèse et la progression des TNE-GEPs intestinales (Francis et al., 2013).

La **phase de croissance** locale est beaucoup mieux caractérisée car c'est à des stades tardifs de cette phase que la grande majorité des TNE-GEPs sont diagnostiquées. La tumeur se développe localement au sein du tissu-hôte en élaborant un stroma particulier qui se caractérise par une très riche vascularisation. Ce stroma très vascularisé est d'ailleurs un signe diagnostique essentiel pour les pathologistes et radiologues, et est probablement dû à la conservation par les cellules endocrines tumorales des propriétés pro-angiogéniques des cellules endocrines normales dont elles dérivent. Ces propriétés s'expriment, entre autres, par l'expression constitutive de facteurs angiogéniques comme le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Góth et al., 2003). Durant cette phase de croissance, les TNE-GEPs se développent d'abord de façon expansive, en repoussant les tissus de

voisinage sans les envahir. Elles sont alors très souvent bien délimitées, voire encapsulées. Ce n'est que dans une phase tardive qu'elles deviennent infiltrantes. Il est important de bien noter qu'une tumeur neuroendocrine est qualifiée d'invasive que tardivement durant son évolution locale. Différents seuils sont pris en compte pour qualifier une TNE-GEP d'invasive : (a) pour les tumeurs endocrines du pancréas, la sortie des limites de l'organe et l'envahissement des tissus adjacents, et (b) pour les tumeurs endocrines du tractus digestif, l'envahissement de la musculature propre. Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la progression tumorale des TNE-GEPs sont toujours très mal connus à l'heure actuelle, même si des travaux ont mis en lumière l'implication de certains facteurs de croissance comme l'IGF (insulin-like growth factor, dont le rôle est détaillé dans la section 8.2.1), le VEGF, l'EGF, le TGF $\beta$  ou encore le PDGF.

Etant donné le caractère hypervascularisé des TNE-GEPs, il semble pertinent, au premier abord, de s'intéresser au VEGF (Terris et al., 1998). L'expression de ce facteur de croissance semble dépendre du type de lésion considéré puisque, dans les tumeurs pancréatiques, elle est plus élevée dans les formes différenciées que dans les formes peu différenciées (Couvelard et al., 2005). De plus, plusieurs études démontrent que l'augmentation de la densité vasculaire au sein des TNE-GEPs est associée à un meilleur pronostic que dans le cas contraire. Cette particularité, qui s'oppose diamétralement au dogme classique valable pour les adénocarcinomes, est soutenue par plusieurs observations. Tout d'abord, la densité vasculaire est plus élevée dans les tumeurs bénignes que dans les tumeurs malignes, et chez ces dernières, elle est inversement corrélée au grade tumoral (Marion-Audibert et al., 2003; Takahashi et al., 2007). Ensuite, l'implication du VEGF dans la progression des TNE-GEPs n'a jamais été validée dans des modèles *in vitro* ou *in vivo*, ni dans les tumeurs humaines (Poncet et al., 2009; La Rosa et al., 2003). Il semble néanmoins que la relation entre expression du VEGF et TNE-GEPs soit forte, même si celle-ci est plus complexe que pour les adénocarcinomes.

En ce qui concerne l'EGF (epidermal growth factor), l'expression de son récepteur a été rapportée dans des gastrinomes et la surexpression de ce récepteur (retrouvée dans 15-20% des gastrinomes) est corrélée avec la croissance tumorale et l'agressivité (Peghini et al., 2002).

Pour le TGF $\beta$  (transforming growth factor beta), l'isoforme 1 de cette cytokine (TGF $\beta$ -1) et ses récepteurs sont retrouvés dans des TNE-GEPs humaines, ainsi que dans des lignées cellulaires endocrines tumorales. Le TGF $\beta$ -1 est responsable de l'inhibition de la croissance cellulaire, qu'elle soit dépendante ou non de l'ancrage cellulaire, via un arrêt du cycle cellulaire. En agissant de façon autocrine et paracrine sur les cellules, il pourrait être responsable du faible taux prolifératif des TNE-GEPs (Wimmel et al., 2003). Une étude plus récente rapporte la surexpression du TGF $\beta$  et du TGF $\beta$ 1R dans les tumeurs neuroendocrines du tractus digestif (Gilbert et al., 2010).

Pour le PDGF (platelet-derived growth factor), l'expression d'un de ces récepteurs (PDGF $\beta$ R) est retrouvée dans des tumeurs endocrines pancréatiques et dans les métastases associées. Les auteurs

notent une surpression de ce récepteur dans les cellules tumorales et stromales par rapport aux îlots de Langerhans sains. La présence des récepteurs au PDGF dans le stroma pourrait suggérer un rôle dans la stimulation des cellules tumorales et stromales, de façon autocrine et/ou paracrine (Chaudhry et al., 1992; Fjällskog et al., 2007).

La dernière étape de l'histoire naturelle des TNE-GEPs réside en la **dissémination métastatique** du clone néoplasique, de façon locale au sein du tissu dans lequel il est apparu ou à distance vers d'autres organes. Cette phase est tardive et inconstante et c'est souvent à ce stade que les TNE-GEPs sont diagnostiquées : en effet, 37% des tumeurs colorectales, 39% des tumeurs de l'intestin grêle et 64% des tumeurs pancréatiques présentent déjà des atteintes à distance lors du diagnostic (Yao et al., 2008a). Certains cas sont même révélés par des métastases inaugurales. Ces atteintes métastatiques à distance vont toucher essentiellement le foie et attestent du caractère malin de la tumeur. Néanmoins, certaines disséminations métastatiques progressent très lentement et peuvent donc être compatibles avec des survies prolongées. De façon générale, le développement de foyers tumoraux secondaires est tout de même corrélé à une diminution de la survie médiane des patients atteints de TNE-GEPs (de 107 mois à 57 mois pour les tumeurs endocrines du duodénum et de 136 mois à 24 mois pour les tumeurs pancréatiques) (Yao et al., 2008a).

Outre l'atteinte hépatique, des foyers secondaires peuvent se développer dans le cerveau, le cœur, l'os, le poumon ainsi que les ovaires. La fréquence de ces métastases va dépendre du type tumoral considéré (Kos-Kudła et al., 2010; Pavel et al., 2010).

#### **4.2. Hétérogénéité**

Les TNE-GEPs sont caractérisées par une très grande variété de profils évolutifs, ce qui complique significativement la prise en charge clinique des patients et en particulier l'orientation thérapeutique. Un grand nombre de tumeurs présente un comportement bénin, sans envahissement des tissus voisins, ni métastases, ni récurrence après résection ; tandis que d'autres se comportent comme d'authentiques tumeurs malignes avec risque de métastases et de rechute. Même si leur évolution est lente, certaines TNE-GEPs peuvent former des masses considérables qui peuvent engager le pronostic vital. D'autres profils évolutifs sont rencontrés : certaines tumeurs sont stables pendant un temps variable, puis vont progresser rapidement ; certaines progressent d'emblée et entraînent le décès ; enfin, d'autres évoluent par poussées successives avec alternance de phases de stabilité et de progression de durée variable (Rindi et al., 2005).

### **5. Apports de l'anatomopathologie**

Etant donné la nature hétérogène des TNE-GEPs, ainsi que l'absence de mutations génétiques caractéristiques (mis à part les syndromes de prédisposition détaillés auparavant), c'est principalement l'anatomopathologie qui a pu apporter les outils nécessaires à l'étude de ce groupe très particulier de tumeurs. Des sociétés savantes européennes et internationales se sont basées sur les propriétés anatomopathologiques des TNE-GEPs pour établir une classification adaptée, des recommandations de prise en charge spécifiques ainsi que des outils diagnostiques pour mieux traiter les patients.

De manière générale, les TNE-GEPs ont une architecture lobulaire ou trabéculaire, un stroma d'abondance variable mais toujours hypervasculaire. Les cellules tumorales endocrines ont un aspect très stéréotypé : elles sont monomorphes et de taille moyenne, possèdent un noyau à chromatine fine en position centrale et un cytoplasme abondant et à limite nette.

## 5.1. Classifications

### 5.1.1. OMS

L'organisation mondiale de la santé (OMS) fait apparaître les TNE-GEPs dans sa classification pour la première fois en 2000 (Solcia and World Health Organization, 2000). Cette classification dite « OMS 2000 » est ensuite complétée en 2004 pour les tumeurs neuroendocrines du pancréas (DeLellis, 2004) . Cette classification distingue, dans un premier temps, les tumeurs endocrines pures et les tumeurs mixtes endocrines-exocrines. Dans un second temps, les TNE-GEPs sont classées de façon uniforme en trois catégories : (a) les **tumeurs endocrines bien différenciées de comportement bénin**, (b) les **tumeurs endocrines bien différenciées de comportement incertain** et les **carcinomes bien différenciés** de comportement malin mais de bas grade et (c) les **carcinomes peu différenciés de comportement malin** et de haut grade. Dans un dernier temps, ces tumeurs sont distinguées selon leur site anatomique d'origine, leur taille, leur degré de prolifération ou encore leur degré d'extension.

En 2010, l'OMS a actualisé sa classification des TNE-GEPs (Rindi et al., 2010) et introduit plusieurs changements : (a) le terme « neuroendocrine », abandonné en 2000, est officiellement adopté puisque les cellules endocrines expriment des marqueurs communs aux cellules nerveuses (synaptophysine ou PGP9.5 par exemple) ; (b) le terme « néoplasmes neuroendocrines » rassemble les TNE-GEPs bien et peu différenciées et (c) les tumeurs neuroendocrines du tractus digestif et du pancréas sont individualisées. En intégrant certains critères du grade tumoral (voir section 5.1.3), la classification OMS 2010 distingue trois catégories de TNE-GEPs : (1) les tumeurs neuroendocrines G1,

(2) les tumeurs neuroendocrines G2 et (3) les carcinomes neuroendocrines à grande ou petites cellules. (Tableau 3).

### **5.1.2. TNM**

En parallèle de la classification OMS 2010, les TNE-GEPs font aussi l'objet d'une classification Tumor-Nodes-Metastasis (TNM) qui reprend les principes généraux d'autres classifications TNM mais en intégrant les particularités des TNE-GEPs. Elle va notamment regrouper les tumeurs bénignes dont le comportement est incertain. Conçue sous l'égide de l'ENETS (European NeuroEndocrine Tumor Society), la première classification publiée en 2006 concerne les tumeurs endocrines de l'intestin antérieur (Rindi et al., 2006), puis elle est complétée un an plus tard par les classifications des tumeurs de l'intestin moyen et postérieur (Rindi et al., 2007). Cette classification a été largement validée au niveau clinique et semble pouvoir simplifier la prise en charge des patients (Jann et al., 2011).

La distinction entre les groupes « T » (T0-T4) est basée sur le degré d'invasion locale de la tumeur et sa taille. Les stades 1 et 2 peuvent être mis en parallèle avec les 2 premiers groupes de la classification OMS 2010, et regroupent les tumeurs endocrines bien différenciées de comportement bénin (T1) et celles de comportement incertain et les carcinomes bien différenciés (T2). A partir du stade T2, toutes les tumeurs sont localement invasives, sauf les tumeurs pancréatiques dont les seuils d'invasion sont différents des tumeurs du tractus digestif. Pour les lésions pancréatiques, le stade T3 regroupe les tumeurs ayant envahi localement le duodénum ou les voies biliaires, et le stade T4 les tumeurs ayant envahi les organes adjacents.

Les stades « N » (invasion ganglionnaire régionale) et « M » (invasion métastatique à distance) ne présentent pas de modifications propres aux TNE-GEPs, et sont donc calqués sur les classifications TNM classiques.

### **5.1.3. Grade histologique**

L'utilisation d'un grade histologique est aussi une recommandation de l'ENETS, validée par l'UICC (Union for International Cancer Control). Ce grade est largement inspiré de celui utilisé pour les tumeurs neuroendocrines du poumon (Travis, 2010).

Dans le cadre des TNE-GEPs, ce grade histologique permet de distinguer les carcinomes bien différenciés en fonction de leur taux de prolifération, dans le but de prévoir leur comportement (évolution bénigne ou maligne). Ce critère est évalué grâce à l'index mitotique et l'index Ki67. L'index mitotique est défini par le nombre de mitoses au sein de la prolifération tumorale, à partir d'une

OMS 2010	OMS 2000
Neuroendocrine tumours G1	Well-differentiated endocrine tumours with benign behaviour Well-differentiated endocrine tumours with uncertain behaviour (Ki-67 $\leq$ 2%) Well-differentiated endocrine carcinoma (Ki-67 $\leq$ 2%)
Neuroendocrine tumours G2	Well-differentiated endocrine tumours with uncertain behaviour (Ki-67 $>$ 2%) Well-differentiated endocrine carcinoma (Ki-67 $>$ 2%)
Small-cell neuroendocrine carcinomas	Small-cell endocrine carcinomas
Large-cell neuroendocrine carcinomas	Not available

**Tableau 3 : Correspondances entre les classifications OMS 2000 et 2010.**

(Lepage et al., 2013)



coupe tissulaire, dans dix champs au fort grossissement (High Power Field, HPF) et pour une surface déterminée. L'index Ki67 est évalué par comptage du nombre de cellules tumorales dont le noyau est marqué par l'anticorps dirigé contre la protéine Ki67. Cette protéine nucléolaire est un marqueur de la prolifération cellulaire, exprimé par les cellules pendant toutes les phases actives du cycle (G1, S, G2 et M) et dont la fonction précise est inconnue.

Ces index permettent de distinguer, parmi ce groupe de tumeurs, trois catégories : (a) les tumeurs neuroendocrines G1 : <2 mitoses/10 HPF et/ou Ki67≤2%, (b) les tumeurs neuroendocrines G2 : 2-20 mitoses/10 HPF et/ou Ki67 entre 3% et 20%, et (c) les carcinomes neuroendocrines à petites ou grandes cellules : >20 mitoses/10 HPF et/ou Ki67>20% (Sobin et al., 2009) (Tableau 4).

Le grade histologique, pour les TNE-GEPs, est reconnu comme un outil pertinent pour évaluer le pronostic et orienter la décision thérapeutique pour les carcinomes bien différenciés. Néanmoins, l'absence de standardisation technique, ainsi que les imprécisions imputables à la lecture par le pathologiste constituent des limites à l'utilisation du grade.

## **5.2. Diagnostic**

Parmi les outils diagnostiques à la disposition de l'anatomopathologiste, on distingue les marqueurs biologiques dosables dans le sérum (hormones) et les marqueurs tissulaires (principalement les marqueurs de différenciation endocrine).

### **5.2.1. Hormones et autres marqueurs sériques**

Une grande proportion de TNE-GEPs étant capable de synthétiser et/ou de sécréter une ou plusieurs hormones, il convient d'établir un profil hormonal du patient porteur de la tumeur. Historiquement, c'est la microscopie électronique qui était utilisée. Son utilisation a été pratiquement abandonnée au profit de l'immunohistochimie et de l'hybridation *in situ* (pratique pour les sécrétions hormonales atypiques non détectables par les anticorps conventionnels). Plus récemment, ce sont les méthodes de polymérase chain reaction (PCR) qui ont été utilisées pour la détection des hormones.

Certaines hormones vont être spécifiques d'un type de TNE-GEPs, notamment dans le cas des tumeurs présentant un syndrome fonctionnel : c'est alors l'hormone hypersécrétée qui fera office de marqueur (insuline, dans le cas d'un insulinome, gastrine dans le cas d'un gastrinome...) (Alexakis and Neoptolemos, 2008; Warner, 2005). Des dispositions sont à prendre dans certains cas de tumeurs fonctionnelles, notamment la mesure de la glycémie et de l'insulinémie lors d'une suspicion d'insulinome.

Grading system for neuroendocrine tumors

Differentiation	Grade	Mitotic Count	Ki-67 index (%)	Traditional Classification	ENETS, WHO Classification
Well-differentiated	Low (G1)	<2 per 10 HPF	≤2	Carcinoid, islet cell, pancreatic neuroendocrine tumor	Neuroendocrine tumor, grade 1
	Intermediate (G2)	2–20 per 10 HPF	3–20	Carcinoid, atypical carcinoid, islet cell, pancreatic neuroendocrine tumor	Neuroendocrine tumor, grade 2
Poorly differentiated	High (G3)	>20 per 10 HPF	>20	Small cell carcinoma	Neuroendocrine carcinoma, grade 3, small cell
				Large cell neuroendocrine carcinoma	Neuroendocrine carcinoma, grade 3, large cell

Abbreviations: ENETS, European Neuroendocrine Tumor Society; HPF, high power field; WHO, World Health Organization.

## Tableau 4 : Système de gradation des TNE-GEPs.

(Yao et al., 2013)

D'autres hormones, telles que les 5-HIAA (acide 5-hydroxy-indole acétique) sont spécifiques des carcinomes endocrines du tractus digestif. Les 5-HIAA sont des déchets éliminés dans l'urine suite à la dégradation de la sérotonine par le foie. La sérotonine est une hormone sécrétée par les tumeurs endocrines de l'intestin moyen (partie distale du duodénum, jéjunum, iléon, caecum, appendice et côlon). Le dosage des 5-HIAA est d'ailleurs recommandé pour ce type de tumeurs (Baudin, 2007).

Même si l'établissement du profil hormonal peut être utile dans le cas de tumeurs non-fonctionnelles, il convient d'utiliser d'autres marqueurs non hormonaux. L'acteur majeur est alors la CgA, le marqueur endocrine de référence, dont les rôles et fonctions seront abordés dans la partie suivante, concernant les marqueurs tissulaires. La pertinence du dosage de la CgA n'est plus à démontrer puisque son niveau plasmatique est élevé dans 60 à 80% des TNE-GEPs (Peracchi et al., 2003). L'utilisation de la CgA peut être combinée à celle du polypeptide pancréatique pour le diagnostic des tumeurs endocrines pancréatiques (Panzuto et al., 2004).

A l'heure actuelle, la CgA est le meilleur biomarqueur pour le diagnostic et le suivi des TNE-GEPs car son expression est corrélée à la progression tumorale et à l'efficacité d'un traitement (Massironi et al., 2010; Yao et al., 2011a). En effet, une augmentation de son taux est un facteur de mauvais pronostic (Chou et al., 2012; Welin et al., 2009).

### **5.2.2. Marqueurs tissulaires**

Les marqueurs tissulaires sont regroupés en deux grandes familles : les marqueurs endocrines, spécifiques aux cellules endocrines et les marqueurs neuroendocrines, communs aux cellules nerveuses et endocrines.

L'expression des marqueurs endocrines par les cellules tumorales témoigne de la conservation du phénotype endocrine par les TNE-GEPs, tant sur le plan structural que fonctionnel. Parmi ceux-ci, le marqueur le plus caractérisé et le plus utilisé pour le diagnostic et le suivi des TNE-GEPs est la CgA. Cette glycoprotéine de 439 acides aminés est sécrétée par la quasi-totalité des TNE-GEPs, et particulièrement par les tumeurs peu différenciées de l'intestin moyen et du pancréas (Eriksson et al., 2000). Ce marqueur est aussi validé pour les tumeurs bien différenciées, dans lesquelles son taux sérique est corrélé au volume tumoral et à la présence de métastases hépatiques (Alexandraki and Kaltsas, 2012; Welin et al., 2009). Néanmoins, la sensibilité de ce marqueur peut être mise à mal dans plusieurs cas de figures : certaines TNE-GEPs (peu différenciées et bien différenciées) perdent l'expression de la CgA (grains de sécrétion en faible nombre ou activité sécrétoire trop intense) ; tandis que le taux de CgA circulante est abaissé chez les patients traités avec les analogues de la somatostatine (Eriksson et al., 1996). D'autres marqueurs spécifiquement endocrines existent : ce sont aussi des protéines associées aux vésicules de sécrétion comme la protéine NESP55 dont

l'expression est retrouvée dans les cellules endocrines du pancréas et de la médullosurrénale. Néanmoins, ils ne sont pas utilisés en clinique (Taupenot et al., 2003).

Les marqueurs de nature « neuroendocrine » sont communs aux cellules endocrines et aux cellules nerveuses. Ils sont divisés en trois catégories : (1) les marqueurs cytosoliques tels que la NSE (neuron-specific enolase) ou la protéine PGP9.5, (2) les marqueurs associés aux petites vésicules dont fait partie la synaptophysine, (3) les marqueurs membranaires dont le membre le mieux caractérisé est la protéine N-CAM (neural cell adhesion molecule) (Figure 3).

En pratique, l'identification d'une TNE-GEP repose sur la détection d'un marqueur spécifiquement endocrine (CgA dans la grande majorité des cas), associée à celle d'un marqueur neuroendocrine (synaptophysine ou N-CAM).

## **6. Aspect clinique**

### **6.1. Caractérisation de l'état fonctionnel**

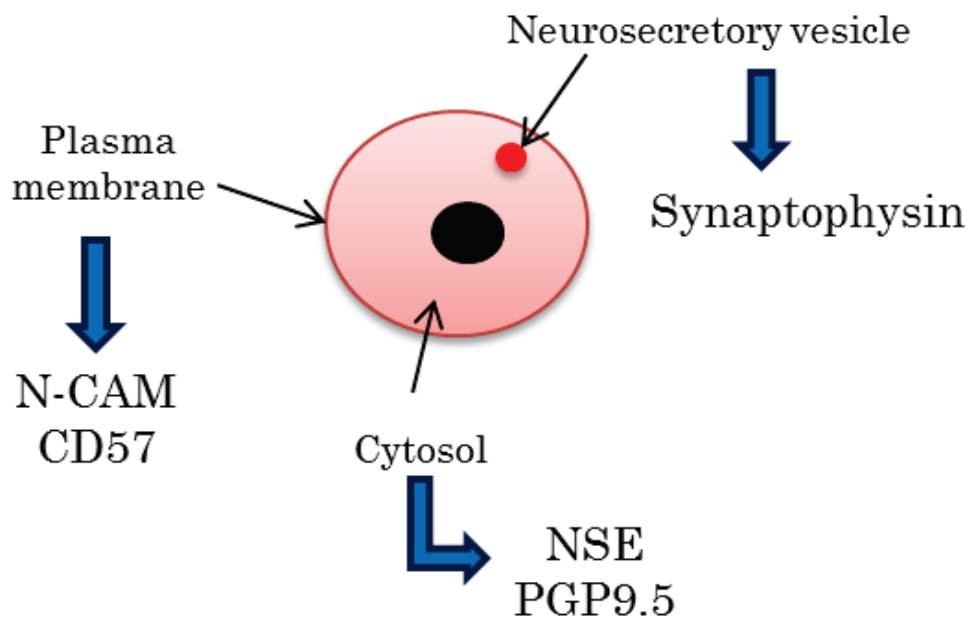
Une tumeur endocrine sera qualifiée de fonctionnelle dès lors qu'elle sécrète des peptides de nature hormonale, qui seront responsables de l'apparition d'un syndrome clinique d'hypersécrétion hormonale (ou syndrome carcinoïde).

Il est important de noter que le terme « non fonctionnel » est un non-sens puisque qu'une tumeur non fonctionnelle n'induit pas de syndrome fonctionnel mais pourra quand même sécréter des peptides (polypeptide pancréatique, neuron-specific enolase, CgA, ghréline et neurotensine entre autres), et ceux-ci ne seront pas la cause d'un syndrome clinique (Ito et al., 2012). Les symptômes d'hypersécrétion n'étant que rarement reliés à la présence d'une TNE-GEP, le délai de diagnostic est retardé de 5 à 7 ans en moyenne, favorisant le risque de développement de foyers tumoraux secondaires (Modlin et al., 2008).

La grande majorité des TNE-GEPs sont non fonctionnelles (même si la sécrétion de peptide actif peut survenir tardivement), et leur diagnostic est alors posé sur la base du développement d'une masse tumorale et/ou de l'apparition de métastases (hépatiques dans la plupart des cas) (Modlin et al., 2005).

En termes de symptômes, une tumeur présentant un syndrome fonctionnel peut provoquer des diarrhées, des flushs cutanés (aussi qualifiés de bouffées vasomotrices qui correspondent à des rougeurs brutales du cou et du visage), et éventuellement une valvulopathie cardiaque.

### **6.2. Sites anatomiques de développement**



**Figure 3 : Expression de marqueurs communs par les cellules endocrines et les cellules nerveuses.**

La prise en charge des TNE-GEPs est dépendante de la localisation et du degré d'envahissement de la tumeur. L'imagerie médicale va alors jouer un rôle important pour déterminer ces caractéristiques. Les techniques classiquement utilisées incluent la radiologie conventionnelle, l'angiographie sélective, l'imagerie nucléaire (notamment la scintigraphie des récepteurs à somatostatine, SRS Octreoscan®) ou encore l'ultrasonographie endoscopique. Malgré cet arsenal, la tumeur n'est jamais localisée chez 20 à 50% des patients (Modlin et al., 2008).

### **6.2.1. Pancréas**

Les tumeurs neuroendocrines pancréatiques (pNETs) représentent environ 10% des TNE-GEPs si l'on se réfère au programme SEER (Yao et al., 2008a). Souvent associées à l'un des quatre syndromes de prédisposition génétique préalablement décrits, les pNETs sont divisées en dix catégories, dont neuf concernent des pNETs fonctionnelles. La dernière catégorie regroupe les pNETs non fonctionnelles qui constituent la majorité des pNETs. Les pNETs fonctionnelles regroupent, entre autres, les gastrinomes, les insulinomes, les VIPomes, les glucagonomes et les somatostatines. Les pNETs sont majoritairement localisées dans la queue et la tête du pancréas (49% et 31% des pNETs, respectivement) et sont malignes dans plus de moitié des cas (sauf pour les insulinomes qui sont majoritairement bénins) (Alexakis and Neoptolemos, 2008). Ce fort potentiel de malignité fait que 50% des pNETs sont déjà métastatiques lors du diagnostic.

### **6.2.2. Estomac**

Les tumeurs endocrines de l'estomac représentent environ 23% des TNE-GEPs et se développent majoritairement à partir des cellules entérochromaffine-like (ECL), qui représentent environ 2% des cellules gastriques. 3 grands types de tumeurs sont décrits : (a) les tumeurs à cellules ECL de type I qui se développent dans un contexte de gastrite chronique atrophique, (b) les tumeurs à cellules ECL de type II qui surviennent dans un contexte de syndrome de Zollinger-Ellison (hypergastrinémie secondaire à un gastrinome, bien souvent apparaissant dans un cadre NEM1), et (c) les tumeurs à cellules ECL de type III qui sont des pathologies sporadiques, de plus mauvais pronostic et très souvent invasives et métastatiques (Brunaud et al., 2004; Couvelard, 2005).

### **6.2.3. Duodénum et jéjunum proximal**

Les tumeurs endocrines duodénales et du jéjunum proximal font partie, avec les tumeurs gastriques et pancréatiques, des tumeurs de l'intestin antérieur. Selon le registre SEER, elles représentent 7% de

l'ensemble des TNE-GEPs (Yao et al., 2008a) et sont très souvent fonctionnelles. Cinq groupes sont classiquement décrits : (1) les gastrinomes qui peuvent être sporadiques ou associés à un syndrome NEM-1 et responsables d'un syndrome de Zollinger-Ellison, (2) les somatostatines qui sont localisés préférentiellement au niveau de l'ampoule de Vater ou dans les zones proches et peuvent être associés à une neurofibromatose de type 1, (3) les tumeurs non fonctionnelles qui sécrètent de la sérotonine (plus rarement de la gastrine et de la calcitonine) et qui sont généralement bénignes, (4) les carcinomes peu différenciés, qui constituent des tumeurs de forte malignité et souvent déjà métastatiques au moment du diagnostic et (5) les paragangliomes gangliocytiques, qui sont localisés au niveau de l'ampoule de Vater et souvent bénins malgré leur grande taille (Couvelard, 2005).

#### **6.2.4. Jéjunum distal et iléon**

Les tumeurs affectant la partie distale du jéjunum et l'iléon représentent environ 25% des TNE-GEPs (Yao et al., 2008a). La grande majorité de ces tumeurs sécrète de la sérotonine et de la substance P et est associée à un syndrome carcinoïde chez 20 à 50% des patients. Ces tumeurs sont très souvent détectées à un stade avancé et sont déjà métastatiques chez plus de 50% des patients. Il est intéressant de noter que 17% des patients présentent une association tumorale avec d'autres cancers non endocrines, signe de la sécrétion de facteurs de croissance tumoraux par ces TNE-GEPs. Ces tumeurs sont majoritairement sporadiques, seules 1% apparaissent dans un contexte de prédisposition génétique (Brunaud et al., 2004; Couvelard, 2005).

#### **6.2.5. Appendice**

Les tumeurs appendiculaires représentent 5% des TNE-GEPs et la majorité (70-80%) surviennent à la pointe de l'appendice, zone dans laquelle les cellules endocrines épithéliales sont les plus nombreuses (Yao et al., 2008a). Comme les tumeurs du jéjunum distal et du côlon, elles sont associées dans 15% des cas à d'autres cancers non endocrines. Elles sont très majoritairement asymptomatiques (90% des cas) et sont découvertes de manière fortuite lors d'une exploration chirurgicale de l'abdomen ou lors d'appendicite aiguë. Leur comportement est le plus souvent bénin et le risque de métastases très faible puisqu'inférieur à 3% (Brunaud et al., 2004; Couvelard, 2005). Les taux de survie à 5 ans sont de 94% pour des tumeurs localisées, 85% lorsque des atteintes ganglionnaires sont présentes et 34% pour les tumeurs métastatiques.

#### **6.2.6. Côlon**

Les tumeurs endocrines coliques représentent environ 5% des TNE-GEPs. Se développant à partir des cellules endocrines épithéliales coliques, ce sont principalement des carcinomes peu différenciés qui sécrètent la sérotonine. Deux tiers de ces tumeurs sont retrouvés dans le côlon droit, dont presque la moitié au niveau du caecum. Moins de 5% des patients présentent un syndrome carcinoïde. Ces tumeurs sont plutôt de mauvais pronostic, puisque la survie globale à 5 ans est de 70% pour les patients atteints localement, 44% lors d'atteinte ganglionnaire et seulement 44% pour ceux présentant des métastases. A noter qu'une association avec une tumeur non endocrine du côlon est retrouvée chez 13% des patients (Brunaud et al., 2004; Couvelard et al., 2003).

### **6.2.7. Rectum**

Les tumeurs endocrines rectales sont plus fréquentes que les tumeurs coliques, et représenteraient environ 25% des TNE-GEPs. Elles sont découvertes de façon fortuite lors d'une coloscopie ; et sont très souvent asymptomatiques (50% des cas), non fonctionnelles, de petite taille (<1 cm, 80% des cas) et localisées au moment du diagnostic. A noter que les tumeurs rectales n'expriment pas la CgA, mais conservent majoritairement l'expression de chromogranine B et de la synaptophysine. Ces tumeurs peuvent sécréter de l'entéroglucagon ainsi que le polypeptide pancréatique, et plus rarement de la sérotonine. Des carcinomes neuroendocrines peu différenciés sont très rarement diagnostiqués pour cette localisation. La survie globale à 5 ans est de 72% et chute à 10% chez les patients présentant des métastases à distance (Brunaud et al., 2004; Couvelard et al., 2003).

## **7. Traitement**

### **7.1. Biothérapies**

Les biothérapies utilisées pour le traitement des TNE-GEPs incluent l'utilisation des analogues de la somatostatine et de l'interféron- $\alpha$ . Ces deux thérapies ont été développées à partir des années 1980 et visaient initialement les syndromes carcinoïdes observés chez les patients porteurs de tumeurs endocrines de l'intestin grêle.

#### **7.1.1. Les analogues de la somatostatine**

La somatostatine est découverte par Brazeau et Guillemin en 1973 (Brazeau et al., 1973) qui caractérisent ce peptide comme un inhibiteur de la GHRH (growth hormone releasing hormone). Etant donné le très grand nombre et la grande variété de récepteurs à la somatostatine exprimés par



le TNE-GEPs (Hofland and Lamberts, 2001; Janson and Oberg, 2003), ce peptide devient alors une cible thérapeutique de premier choix, principalement pour inhiber la sécrétion hormonale.

Parmi les 5 récepteurs à la somatostatine (SSTRs), des études ont montrés que SSTR2 et SSTR5 étaient les récepteurs les plus aptes à médier les effets anti-sécrétoires de la somatostatine dans la glande pituitaire et les adénomes (Saveanu et al., 2001; Shimon et al., 1997).

De nombreux analogues de la somatostatine ont été développés, dont le premier appelé octréotide, est testé chez l'homme dès 1982 (Bauer et al., 1982). De nos jours, de nombreuses firmes pharmaceutiques ont développé d'autres analogues plus efficaces, notamment avec des temps de demi-vie plus longs, des formulations optimisées et des modalités de prise améliorées, comme c'est le cas pour le lanréotide (Caron et al., 1997). Les deux analogues disponibles dans le commerce (octréotide et lanréotide) se fixent avec haute affinité au SSTR2, et avec plus faible affinité au SSTR 5 et 3. Le contrôle de l'hypersécrétion par ces analogues est effectif chez 40-60% des patients et permet une baisse ou une stabilisation des marqueurs tumoraux chez environ 30 à 75% des patients répondants, en fonction du type tumoral considéré (Eriksson and Oberg, 1999; Panzuto et al., 2006; Rinke et al., 2009; Rubin et al., 1999; Welin et al., 2004). Néanmoins, la régression tumorale sous analogues de la somatostatine reste très rare, et concerne moins de 5% des patients (Reidy et al., 2009; Saltz et al., 1993).

L'essor de l'utilisation de ces analogues de la somatostatine a conduit au développement de la radiothérapie métabolique, d'abord en tant que méthode diagnostique puis rapidement à visée thérapeutique. Cette pratique consiste à radio-marquer les analogues de la somatostatine, et ainsi permettre un meilleur ciblage des tumeurs par les radiations (Borson-Chazot, 2006). Le premier radio-analogue commercialisé est l'Octréoscan ( $^{111}\text{In}$ -octréotide), et il permet d'augmenter la survie des patients (Anthony et al., 2002; Krenning et al., 1994). De nos jours, d'autres radionucléides plus efficaces et mieux tolérés ont été développés, il s'agit du [ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>]octréotide et du [ $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Tyr<sup>3</sup>]octréotate (Kayani et al., 2008). Ce type de thérapie est particulièrement recommandé pour les cas de TNE-GEPs inopérables ou métastatiques. Les taux de réponse varient entre 15 et 35% selon les radiopeptides considérés, et les effets secondaires sont modérés (Bergsma et al., 2012).

### **7.1.2. L'interféron- $\alpha$**

L'interféron- $\alpha$  est sécrété physiologiquement en réponse à certaines substances comme les microorganismes ou les antigènes et cellules tumorales. Son action anti-tumorale est médiée par plusieurs mécanismes complémentaires via sa fixation sur des récepteurs membranaires spécifiques qui entraîne l'action de la voie de signalisation des protéine JAK-STAT. Cette voie aboutit, via une

cascade de transduction, à l'induction de gènes qui agiraient comme des gènes suppresseurs de tumeurs (Zhou et al., 2001).

Plusieurs études notent un effet anti-prolifératif de l'interféron- $\alpha$  via un blocage de la transition G0-G1 du cycle cellulaire et une inhibition de certaines CDKs (cyclin-dependent kinases) (Zhou et al., 1999, 2002). En plus, l'interféron présente des effets anti-sécrétoires comparables à ceux des analogues de la somatostatine et la rémission des symptômes est observée chez 30 à 70% des patients selon les études (Creutzfeldt et al., 1991; Schöber et al., 1992). Néanmoins, les doses d'interféron utilisées engendrent une toxicité non négligeable.

Combiné à des analogues de la somatostatine, l'interféron- $\alpha$  semble améliorer une augmentation de la survie et une diminution du risque de progression (Kölby et al., 2003).

## 7.2. Chirurgie

A ce jour, la chirurgie est le seul traitement curatif pour les TNE-GEPs. En conséquence, la chirurgie doit être toujours considérée comme le traitement de première ligne, mais s'applique néanmoins seulement que dans un certain nombre de situations cliniques. Des recommandations internationales ont été publiées récemment pour préciser les termes de la prise en charge chirurgicale des patients atteints de TNE-GEPs (Pavel et al., 2012; Salazar et al., 2012). Cette partie vise à renseigner sur les différentes stratégies chirurgicales à mettre en œuvre pour les TNE-GEPs les plus fréquemment diagnostiquées.

Tumeurs pancréatiques : le traitement chirurgical dépend du type, de la taille et de la localisation des tumeurs. Le risque métastatique étant lié au volume tumoral, une tumeur pancréatique de moins de 1-2 cm et ne présentant pas d'évolution de volume sur une grande période de temps présentera un potentiel de dissémination très faible. Les tumeurs localisées au niveau de la tête du pancréas subiront, dans la majorité des cas, une duodéno pancréatectomie tandis que les tumeurs localisées du côté distal de l'organe subiront une pancréatectomie distale associée à une splénectomie (Hellman et al., 2000). La rate pourra cependant être épargnée si la tumeur est bénigne (cas d'un insulinome par exemple). Les tumeurs pancréatiques étant généralement encapsulées, l'énucléation des petites tumeurs bénignes (<2cm) est une alternative à la résection, seulement si la tumeur est éloignée d'un canal pancréatique majeur. Dans le cas contraire, un risque de 20-30% de fistule pancréatique (communication anormale du pancréas avec l'extérieur ou avec un autre organe) est rapporté (Brient et al., 2012). Les tumeurs qui ont infiltré la grande majorité du pancréas impliqueront la réalisation d'une duodéno pancréatectomie totale. Cette procédure engendre évidemment des difficultés de contrôle du taux de glucose et du diabète, mais celles-ci peuvent être corrigées à l'aide d'analogues de l'insuline ou d'enzymes pancréatiques.

La présence de métastases hépatiques ne constitue pas de contre-indications à la résection pancréatique si elles sont en faible nombre (Fendrich et al., 2006).

Tumeurs non fonctionnelles : La majorité de ces tumeurs sont de grade G1 et G2, et de taille supérieure à 4 cm lors du diagnostic. La stratégie opératoire se dirigera vers une duodéno pancréatectomie ou une résection du pancréas distal avec splénectomie selon la localisation de la tumeur.

Insulinomes : Tous les insulinomes doivent être réséqués ou énucléés dans le but de soulager les patients des symptômes résultants de l'hypoglycémie induite par l'hyperinsulinémie (Zhao et al., 2011). La résection et l'énucléation de la queue du pancréas peuvent être réalisées par voie laparotomique (Isla et al., 2009; Richards et al., 2011). Les insulinomes malins doivent être traités par duodéno pancréatectomie totale ou partielle, ou par pancréatectomie distale, avec une résection de métastases hépatiques si une résection hépatique radicale est possible. Le suivi post-opératoire n'est pas nécessaire après la résection d'un seul insulinome bénin, alors qu'un suivi biochimique du taux de sucre dans le sang est effectué chez les patients opérés d'insulinomes multiples.

Gastrinomes : La grande majorité (70%) des gastrinomes est sporadique. Dans le pancréas, ces lésions se situent dans la tête de la glande. Les gastrinomes sporadiques sont réséqués pour soulager les patients des symptômes et pour prévenir l'apparition de métastases hépatiques, ceux-ci étant tous potentiellement malins (Jensen et al., 2006). La résection radicale des gastrinomes sporadiques induit un fort taux de guérison à 20 ans (98% vs. 74% chez les patients non-opérés) (Norton et al., 2006). Après la résection, le suivi des patients réside dans l'évaluation des taux sériques de gastrine et de CgA.

Carcinomes de l'intestin grêle : Les recommandations chirurgicales pour les carcinomes de l'intestin grêle préconisent une résection intestinale ou une hémicolectomie droite associée à une dissection du ganglion mésentérique et à une résection des ganglions lymphatiques entourant les vaisseaux sanguins mésentériques, dans le but d'obtenir une résection complète. Ces carcinomes pouvant être multiples, l'intestin doit être méticuleusement palpé pour vérifier la présence ou non d'autres tumeurs. Pour vérifier que la résection est complète, le suivi des patients inclut le dosage plasmatique de la CgA, un CT-scan et une scintigraphie à l'octréotide un à deux mois suivant l'opération, puis tous les 6 à 12 mois puisque le taux de récurrence après 20 ans est de 80%.

Dans le cas d'atteintes à distance (hépatique notamment), l'option chirurgicale reste envisageable. Selon les cas, il est possible de réaliser des résections complètes de la tumeur primitive, ainsi que des métastases régionales et à distance. Si les atteintes secondaires ne sont pas opérables, la résection de la tumeur primaire permet tout de même de prévenir une obstruction intestinale et l'apparition de métastases supplémentaires.

### **7.3. Radiologie interventionnelle**

Les TNE-GEPs prédisposent à la formation de lésions métastatiques dans le foie qui vont dériver environ 90% de leurs besoins en oxygène et nutriments en utilisant l'artère hépatique. Cette artère offre donc une cible de choix pour traiter les métastases hépatiques, notamment en créant un environnement ischémique destiné à affaiblir les foyers tumoraux secondaires (tout en protégeant les hépatocytes sains qui utilisent préférentiellement la veine hépatique), ou en diffusant des agents chimiothérapeutiques par voie artérielle directement au cœur des métastases.

#### **7.3.1. Embolisation**

L'objectif de l'embolisation de l'artère hépatique (EAH) est donc l'induction d'une ischémie au sein de la tumeur à l'aide d'agents variés (cyanoacrylate, alcool polyvinyle, microsphères ou particules de caoutchouc). L'EAH est indiquée pour les patients présentant une tumeur non résécable, des symptômes liés à l'hypersécrétion hormonale et présentant une progression rapide des métastases hépatiques (Madoff et al., 2006). L'EAH permet de réduire le volume tumoral hépatique et les symptômes, ainsi que d'améliorer les marqueurs biophysiques après évaluation radiographique (Hoffmann et al., 2011).

Une étude a montré que l'EAH donnait de meilleurs résultats lorsqu'elle était suivie d'une chimiothérapie systémique (Vogl et al., 2009). L'efficacité de cette technique chirurgicale a donc été améliorée en couplant des agents chimiothérapeutiques, pour ainsi donner naissance à la chimioembolisation.

#### **7.3.2. Chimioembolisation**

La chimioembolisation de l'artère hépatique (CEAH) va permettre, en plus de la création d'une ischémie, d'introduire des molécules chimiothérapeutiques au sein des métastases, jusqu'aux capillaires sanguins, et donc de concentrer jusqu'à vingt fois plus l'agent chimiothérapeutique par rapport à un traitement systémique classique (Mazzaglia et al., 2007). Malgré cet avantage annoncé, la majorité des études scientifiques ne note aucune amélioration significative de la CEAH par rapport à l'EAH sur la survie des patients. Par exemple, l'étude de Pitt ne note aucune différence significative entre EAH et CEAH sur la survie (Pitt et al., 2008). Malgré cela, l'efficacité de la CEAH est améliorée grâce à l'utilisation de thérapies adjuvantes comme la chimio-infusion artérielle hépatique

(CAH). LA CAH va permettre d'augmenter le bénéfice clinique de la CEAH, particulièrement pour les tumeurs fonctionnelles et peu différenciées (Christante et al., 2008; Hoffmann et al., 2011).

Néanmoins, et comme pour toutes les procédures chirurgicales, ces protocoles présentent des risques, lesquels incluent des abcès hépatiques, des pertes de fonction hépatique, une crise carcinoïde ou encore des effusions pleurales.

#### **7.4.Chimiothérapie**

Les traitements chimiothérapeutiques vont varier en fonction du type de tumeur (degré de différenciation, localisation anatomique) et de la chimiosensibilité de la tumeur considérée, les carcinomes peu différenciés étant plus sensibles à la chimiothérapie que les carcinomes bien différenciés. Cette différence est expliquée par le fait que les tumeurs bien différenciées se caractérisent par un index Ki67 faible, associé à une forte expression de gènes impliqués dans la résistance aux drogues (Kaltsas et al., 2001).

Pour les tumeurs pancréatiques bien différenciées, la chimiothérapie de première ligne est réalisée avec la streptozotocine (STZ), antibiotique utilisé originellement pour induire le diabète dans des modèles animaux. Des études ont rapporté une réduction de l'hypoglycémie chez des patients atteints d'insulinomes, ainsi que certains cas de rémission. L'association de la streptozotocine avec le 5-fluorouracile (5-FU) montre un taux de réponse important à cette combinaison chez des patients atteints de tumeurs neuroendocrines pancréatiques. Actuellement la STZ peut aussi être associée à la doxorubicine (DOXO) avec des taux de réponse meilleurs qu'avec le 5-FU. D'autres études dénotent des taux de réponse plus faibles, de l'ordre de 50 à 40% (Reidy et al., 2009). Une étude plus récente pointe le plus faible rapport efficacité/toxicité de la combinaison STZ/DOXO et le besoin d'approches nouvelles (McCollum et al., 2004). Néanmoins, la petite taille des cohortes de patients étudiées, la nature rétrospective de la majorité des études, ainsi que l'hétérogénéité tumorale, ne permettent pas de dresser des protocoles chimiothérapeutiques de référence.

Pour les tumeurs peu différenciées (tous sites primitifs confondus), le traitement cytotoxique systémique de référence consiste en une combinaison d'étoposide (VP-16) et de cisplatine (CDDP, cis-diaminedichloroplatine(II)) (Mitry et al., 1999). Cette combinaison induit un taux de réponse de 67% chez les patients atteints de tumeurs peu différenciées, tandis que ce taux était seulement de 7% chez les cas de tumeurs bien différenciées (Moertel et al., 1991).

Pour les tumeurs bien différenciées non pancréatiques, la chimiothérapie est peu efficace et n'est employée qu'après échec des traitements de première ligne. Le choix du traitement chimiothérapeutique va alors s'orienter vers une combinaison de la streptozotocine avec le fluorouracile, malgré des résultats décevants (Sun et al., 2005b).

## 7.5. Thérapies ciblées

Les options thérapeutiques présentées auparavant pour traiter les TNE-GEPs montrent des résultats globalement limités. En effet, la nature faiblement proliférative de ces tumeurs va limiter l'efficacité des traitements systémiques tels que la chimiothérapie. Le fait que ces tumeurs particulières soient d'une grande hétérogénéité empêche la mise en place de traitements consensuels et constitue un véritable défi clinique. C'est dans ce contexte que s'est développé le concept de thérapie ciblée.

La thérapie ciblée se définit comme un type de traitement qui utilise des molécules pour identifier et attaquer des types spécifiques de cellules cancéreuses, en minimisant au maximum les effets indésirables sur les cellules saines (National Cancer Institute - Dictionary of Cancer Terms). La majorité des molécules de thérapie ciblée ciblent les facteurs de croissance, leurs récepteurs ou la voie de signalisation sous-jacente.

Dans le cadre des TNE-GEPs, la thérapie ciblée va s'articuler autour de trois grandes caractéristiques de ces tumeurs : (1) la surexpression de certains récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs), (2) l'hypervascularisation et (3) la suractivation constitutionnelle de la voie mTOR.

### 7.5.1. Ciblage des récepteurs à activité tyrosine kinase

Les TNE-GEPs surexpriment certains RTKs tels que l'EGFR (Back et al., 2003; Peghini et al., 2002). Il a été démontré, *in vitro*, que des inhibiteurs de l'EGFR étaient capables d'inhiber la croissance de modèles cellulaires de TNE-GEPs (Höpfner et al., 2003). Malgré ces données précliniques encourageantes, très peu d'études cliniques ont été conduites. Une étude de phase II montre qu'un inhibiteur de l'EGFR, le gefitinib, augmente le temps de stabilisation de la maladie mais aucune réponse objective n'a été observée (Höpfner et al., 2008). Il semble que les thérapies utilisant les inhibiteurs de l'EGFR présentent une efficacité optimale lorsqu'elles associent un autre inhibiteur ciblé ou une molécule cytostatique conventionnelle.

Le récepteur à l'IGF (IGFR) est aussi un RTK surexprimé par les TNE-GEPs. Dans les gastrinomes, l'expression de l'IGF et de l'IGFR est associée à un mauvais pronostic et au développement de métastases (Furukawa et al., 2005). De ce fait, le NVP-AEW541, un inhibiteur de l'IGFR, présente des propriétés anti-tumorales sur des modèles cellulaires (Höpfner et al., 2006). Un anticorps monoclonal ciblant ce récepteur (figitumumab) est actuellement en essai clinique pour le traitement de plusieurs cancers, mais pas pour les TNE-GEPs (Chi et al., 2012; Juergens et al., 2011).

### **7.5.2. Ciblage de l'angiogenèse**

Du fait de leur caractère hypervasculaire, il semble logique que les TNE-GEPs constituent une pathologie candidate prometteuse pour les traitements à visée anti-angiogénique. Plusieurs études ont démontré que ces tumeurs surexpriment le VEGF et ses récepteurs (VEGFR-1 et -2), non seulement dans la tumeur mais aussi dans le stroma tumoral (La Rosa et al., 2003; Terris et al., 1998). Les inhibiteurs utilisés actuellement en phase clinique pour les TNE-GEPs sont : le bévacizumab (anticorps monoclonal ciblant le VEGF), le sunitinib (inhibiteur de RTKs à large spectre ciblant les VEGFRs et le PDGFR) et le sorafénib (inhibiteur des RTKs VEGFR-2 et-3, PDGFR- $\beta$ , FLT3 et des kinases c-Kit et Raf).

Pour le bévacizumab, son potentiel thérapeutique a été testé directement en combinaison chez des patients atteints de TNE-GEPs. Par exemple, la combinaison de l'octréotide avec cet anticorps induit un taux de réponse plus important que la combinaison octréotide + interféron en phase II (Yao et al., 2008b), ouvrant la voie à une étude de phase III actuellement en cours.

Le sunitinib présente un fort effet anti-tumoral dans le modèle de souris RIP-Tag (voir quatrième partie, section 2.3.1), avec une inhibition de la croissance tumorale et un allongement de la survie des animaux (Pietras and Hanahan, 2005). De plus, les données provenant d'une étude de phase III apportent des résultats encourageants : utilisé en monothérapie, l'inhibiteur de RTKs à large spectre montre un taux de réponse objectif de 9,3% et améliore la survie sans progression chez des patients atteints de pNETs (Raymond et al., 2011).

Sur le plan préclinique, le sorafénib induit l'apoptose et diminue la prolifération des cellules tumorales dans le modèle de souris RIP-Tag (Fendrich et al., 2012). Une étude clinique de phase I a testé la combinaison sorafénib + évérolimus chez des patients atteints de tumeurs pancréatiques avancées. La combinaison est active mais les toxicités engendrées ne semblent pas permettre des études plus avancées (Chan et al., 2013).

### **7.5.3. Ciblage de la voie de signalisation mTOR**

Comme dit précédemment, les TNE-GEPs surexpriment fréquemment l'IGF et ses récepteurs, protéines initiateuses et activateuses de la voie mTOR. Parmi les quelques exemples de thérapies ciblées brièvement décrits auparavant, le ciblage de la voie mTOR semble donc être l'une des pistes thérapeutiques les plus prometteuses, au vu des données disponibles dans la littérature. La partie

suiVante fait le bilan sur la voie mTOR, ses fonctions biologiques et sur son potentiel en tant que thérapie ciblée, pour la pathologie tumorale en général et les TNE-GEPs en particulier.

## **8. Exemple de thérapie ciblée : la voie mTOR**

La plupart des organismes vivants ont développé des mécanismes cellulaires pour assurer leur survie et leur croissance dans un environnement aux conditions changeantes (en termes de disponibilité en nutriments et en oxygène, notamment). Chez les mammifères, la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR constitue un tel mécanisme d'adaptation. Des études, en nombre croissant, mettent en évidence son rôle dans de très nombreuses fonctions cellulaires (régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire). Ainsi, la dérégulation de la voie mTOR va être, en partie, responsable de nombreuses pathologies humaines telles que l'obésité, le diabète de type 2, la neurodégénération et le cancer. Depuis les années 1990, cette voie de signalisation devient une cible thérapeutique de choix dans différents types de cancer, et particulièrement pour les TNE-GEPs.

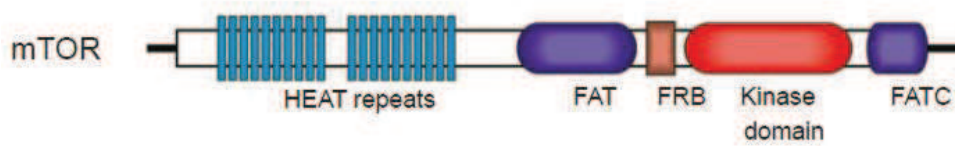
### **8.1. Structure de mTOR**

mTOR est une sérine/thréonine kinase atypique qui appartient à la famille des phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related molecules et qui s'associe à plusieurs autres protéines pour former deux complexes distincts appelés mTOR complex 1 (mTORC1) et mTOR complex 2 (mTORC2).

Le nom mTOR (mammalian target of rapamycin) provient du fait que cette protéine est la cible d'un macrolide bactérien, la rapamycine, produit par *Streptomyces Hygroscopicus*. La rapamycine présente des propriétés antiprolifératives qui intéressent la communauté scientifique dès le début des années 1990. Les deux complexes mTORC1 et C2 sont rapidement identifiés comme médiateurs de l'effet anti-prolifératif de la rapamycine chez la levure (Cafferkey et al., 1993; Kunz et al., 1993). L'identification de la protéine mTOR comme cible de la rapamycine, et sa purification sont réalisées seulement 1 à 2 ans plus tard (Brown et al., 1994; Sabers et al., 1995).

Cette protéine est constituée de 2549 acides aminés pour un poids théorique de 289 kDa. Sa structure contient plusieurs domaines : la partie N-terminale contient 20 répétitions HEAT (Huntington, EF3, sous-unité A de PP2A, TOR1) qui sont des domaines d'interaction protéines-protéines ; la partie C-terminale contient 4 domaines dont FAT (FRAP, ATM, TRAP), FRB (FKBP12-rapamycin-binding) sur lequel se fixe la rapamycine associée à son récepteur intracellulaire FKBP12, le domaine kinase et le domaine FATC (FAT C-terminus), nécessaire à l'activité de la protéine (Peterson et al., 2000) (Figure 4).





**Figure 4 : Structure de la protéine mTOR.**

La kinase TOR est composée de 20 répétitions HEAT (domaines d'interaction protéines-protéines) ; des domaines FAT (FRAP, ATM, TRAP), FRB (FKBP12-rapamycin-binding, kinase) et FATC (FAT C-terminus, nécessaire à l'activité de la protéine). (Yang and Guan, 2007)

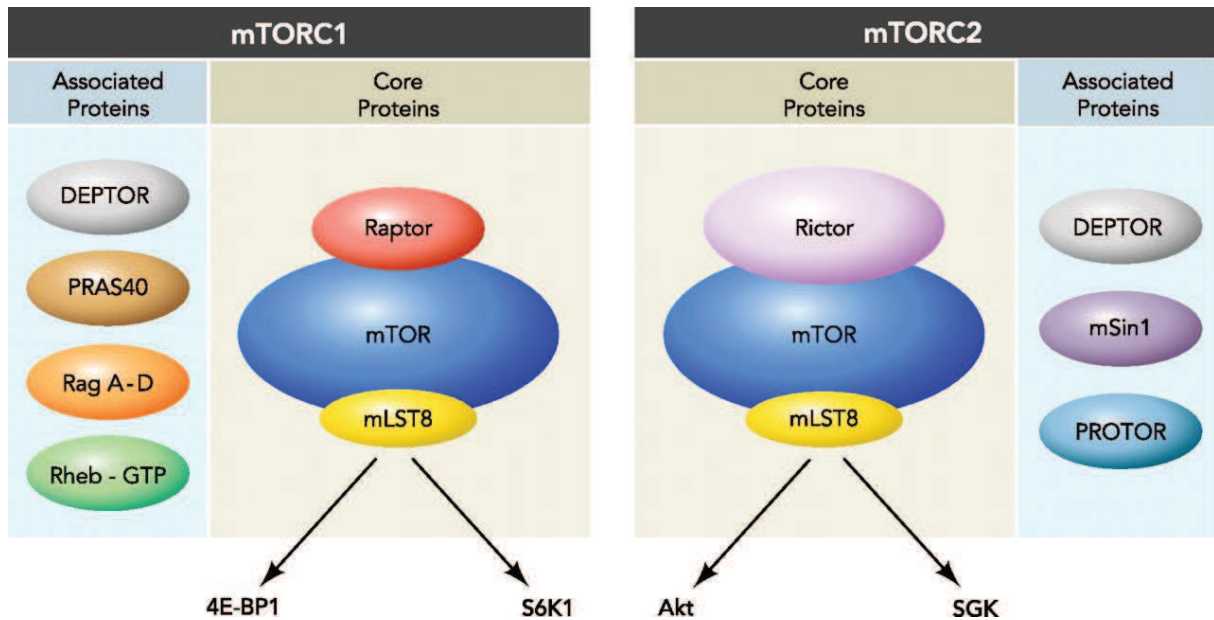
Les deux complexes multiprotéiques mTOR présentent des sensibilités différentes à la rapamycine, ainsi qu'aux nombreux régulateurs situés en amont ou en aval de la protéine, et possèdent des fonctions différentes. mTORC1 et mTORC2 partagent différentes protéines en commun dont mTOR (la sous-unité catalytique), DEPTOR (DEP domain containing mTOR interacting protein, inhibiteur de mTOR) (Peterson et al., 2009), mLST8 (mammalian lethal with sec-13 protein 8, supposée régulatrice) (Jacinto et al., 2004) et le complexe Tti1/Tel2 (protéines scaffold régulant l'assemblage et la stabilité des mTORCs) (Kaizuka et al., 2010). mTORC1 est caractérisé par la présence de RAPTOR (regulatory-associated protein of mTOR, régulant l'assemblage, la localisation de mTORC1 et la liaison à ses substrats) (Hara et al., 2002) et de PRAS40 (proline rich Akt substrat de 40 kDa, inhibiteur de mTORC1) (Sancak et al., 2007; Wang et al., 2007) ; tandis que mTORC2 se différencie du complexe 1 par la présence de RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR, régulant l'assemblage, la localisation de mTORC2 et la liaison à ses substrats) (Sarbasov et al., 2004), mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1, régulant l'assemblage de mTORC2 et l'interaction avec ses substrats) (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006) et PROTOR1/2 (protein observed with rictor 1 et 2, favorisant l'interaction de mTORC2 avec certains de ses substrats) (Pearce et al., 2007, 2011) (Figure 5).

Parmi les deux complexes, c'est mTORC1 qui est, à ce jour, le mieux décrit et dont les fonctions intracellulaires sont multiples. mTORC1 constitue en effet un centre intégrateur des signalisations induites par les facteurs de croissance, la disponibilité en nutriment et le métabolisme énergétique.

## **8.2. Régulations**

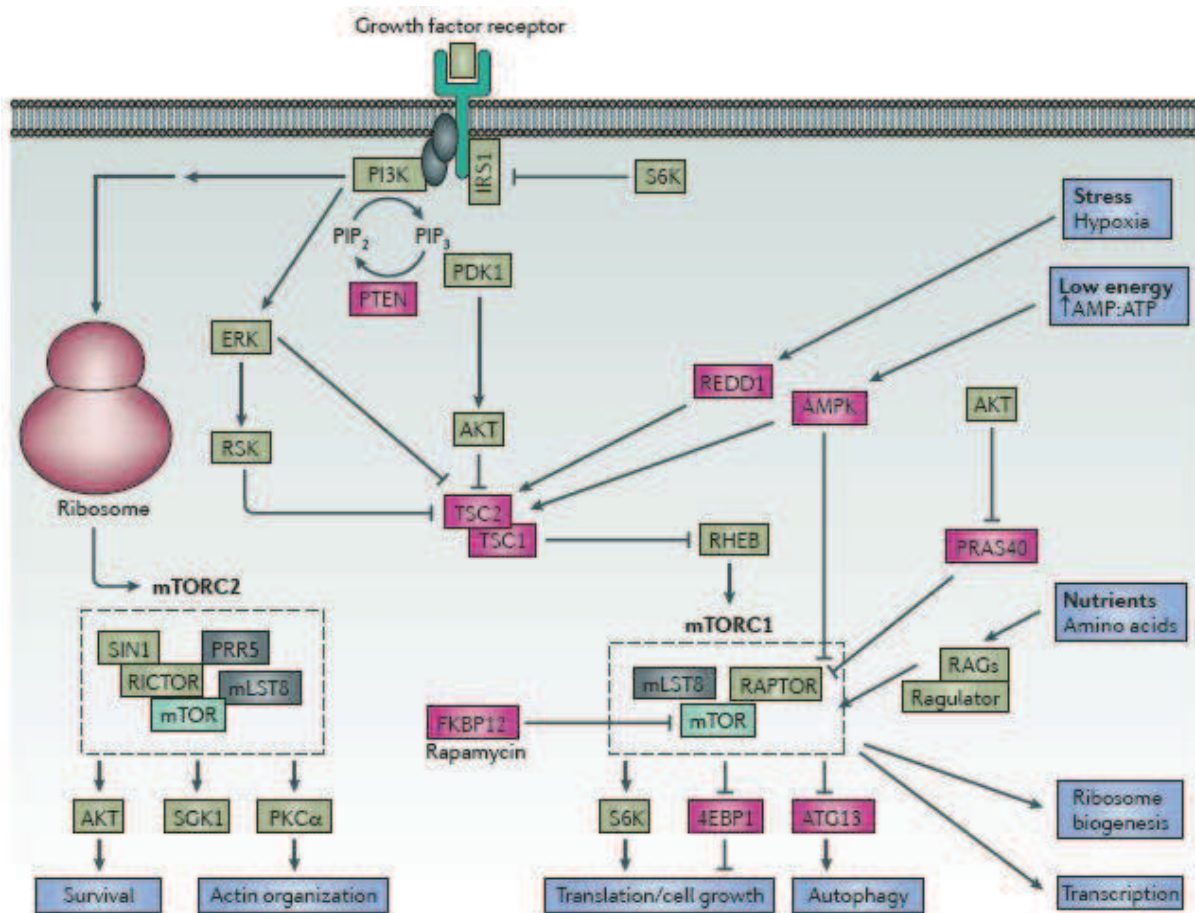
### **8.2.1. Facteurs de croissance**

La voie de signalisation mTOR est capable de répondre à une stimulation par certains facteurs de croissance par la voie canonique PI3K/Akt (Figure 6). La fixation de l'insuline ou des IGFs à leurs récepteurs va induire le recrutement, puis la phosphorylation de la protéine adaptatrice IRS (insulin receptor substrate), puis le recrutement de PI3K. La PI3K liée à IRS peut ensuite convertir le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-phosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate) au niveau de la membrane cellulaire. La réaction inverse (PIP3 vers PIP2) est catalysée par une phosphatase de lipides codée par le gène *PTEN* (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), un gène suppresseur de tumeur. PIP3 recrute PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) et Akt, et le premier peut alors activer le second par phosphorylation. Akt peut ensuite inactiver, par phosphorylation, TSC2 qui exerce une régulation négative sur mTORC1 (Manning, 2004). Cette régulation de mTOR est en réalité assurée par un hétérodimère composé de TSC1 et TSC2. Mais c'est



**Figure 5 : Structure des complexes mTORC1 et mTORC2.**

Les deux complexes sont constitués par mTOR (sous-unité catalytique), mLST8 (unité régulatrice) et DEPTOR (inhibiteur de mTOR). Ils se distinguent l'un de l'autre par des associations avec différents partenaires protéiques. mTORC1 active les effecteurs 4EBP1 et p70S6K (S6K1), tandis que mTORC2 phosphoryle Akt et SGK. (Frost and Lang, 2011)



**Figure 6 : La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.**

L'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase par son ligand spécifique (IGF, insuline, par exemple) induit la phosphorylation d'IRS, qui recrute la PI3K. Cette kinase active PDK1 via la conversion du PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>. PDK1 phosphoryle Akt qui dissocie ensuite le complexe TSC1/TSC2, levant ainsi l'effet inhibiteur de Rheb sur mTORC1. mTORC1 actif phosphoryle ses effecteurs, notamment p70S6K (S6K) et 4EBP1 qui favorisent la traduction protéique, et la prolifération cellulaire. mTORC2 présente un rôle dans la modulation du cytosquelette. La voie mTOR est aussi capable d'intégrer différents stimulus, tels le stress, la disponibilité en nutriment ou le statut énergétique de la cellule.

essentiellement TSC2 qui importe puisqu'il agit comme une protéine GAP (GTPase-activating protein) pour la protéine Rheb (Tee et al., 2003). Rheb se lie directement au domaine kinase de mTOR de façon GTP-dépendante, et induirait un changement de conformation de mTORC1, aboutissant ainsi à une activation du complexe et à celle de ses effecteurs p70S6K et 4EBP1. De plus, ce complexe Rheb-GTP se lie aussi à la protéine FKBP8 (FK506-binding protein 8) qui participe à la régulation de l'activité de mTORC1. FKBP8 est normalement liée à mTORC1, formant ainsi un complexe inhibiteur de mTORC1. FKBP8 se liant avec une plus grande affinité au complexe Rheb-GTP, le complexe inhibiteur se dissocie et mTORC1 devient alors actif (Tee, et al. 2003) (Avruch et al., 2009). Akt participe aussi à l'activation de mTORC1, mais de manière plus directe, en phosphorylant PRAS40, ce qui induit la dissociation de ce partenaire inhibiteur du complexe mTORC1 et donc une activation de ce dernier (via l'intervention de la protéine 14-3-3 (Vander Haar et al., 2007). A noter que le complexe mTORC2 peut phosphoryler et activer Akt.

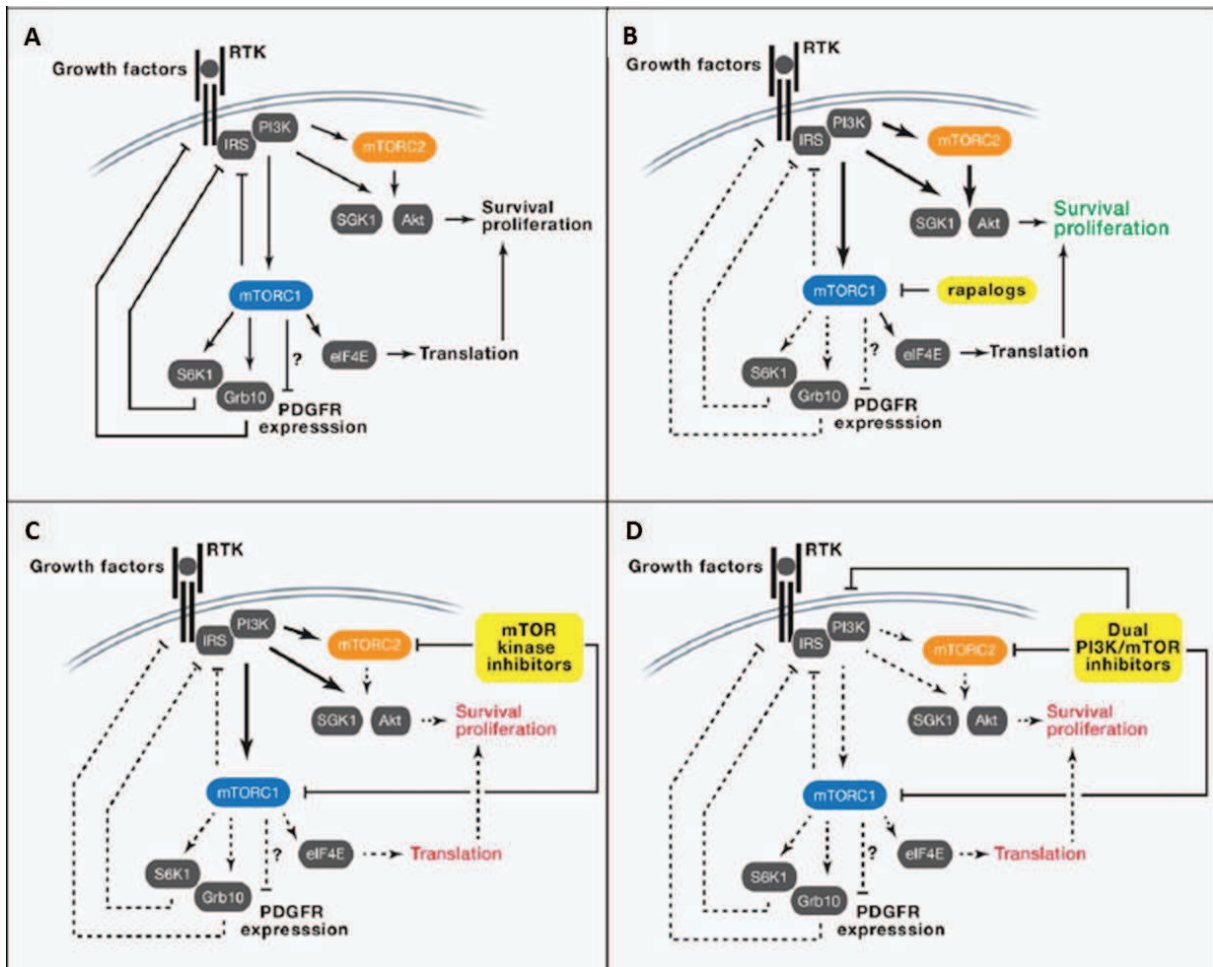
L'activation de mTORC1 est responsable, en retour, de la répression de l'activité de la voie PI3K/Akt, notamment via l'inhibition d'IRS-1 (Haruta et al., 2000). Il existe donc un rétrocontrôle négatif de l'activation de mTORC1 sur IRS-1. Ce rétrocontrôle est médié par la protéine effectrice p70S6K qui, activée, inhibe IRS-1. L'existence de ce mécanisme est très importante puisque l'utilisation de rapamycine, qui inhibe mTORC1 et p70S6K, va donc induire une levée du rétrocontrôle et une augmentation de l'activité de la signalisation PI3K/Akt. Cela a pour conséquence, dans certains cas, d'atténuer les effets anti-tumoraux de la rapamycine (O'Reilly et al., 2006) (Figure 7).

D'autres signalisations peuvent interagir avec la voie mTOR pour moduler son activité ; c'est le cas de la voie MEK/ERK (Mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular-signal-regulated kinase), celle du TNF $\alpha$  et la voie Wnt. Pour la voie MEK/ERK, la modulation de mTORC1 s'effectue au niveau de TSC2. En effet, les protéines ERKs et RSK (ribosomal S6 kinase), 2 effecteurs de la voie MEK, sont capables de phosphoryler directement TSC2 pour l'inactiver (Ma et al., 2007; Roux et al., 2004). RSK peut aussi phosphoryler directement RAPTOR et donc activer mTORC1 (Carrière et al., 2008).

La voie du TNF $\alpha$  peut aussi activer mTORC1 via la phosphorylation inactivatrice de TSC1 par IKK $\beta$  (I $\kappa$ B kinase B), un effecteur de la signalisation du TNF $\alpha$  (Lee et al., 2007). La protéine Akt peut aussi phosphoryler directement un second effecteur de la voie du TNF $\alpha$ , IKK $\alpha$ , qui, activé, s'associe à mTORC1 et engendre son activation (Dan et al., 2007).

La voie Wnt, qui est un régulateur majeur de la prolifération et de la différenciation cellulaire, entre autres, peut aussi activer mTORC1 via le complexe TSC1/2. La signalisation Wnt inhibe la GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), qui phosphoryle et active TSC2 en condition basale (Inoki et al., 2006).

### **8.2.2. Métabolisme énergétique**



**Figure 7 : Inhibition de la voie de signalisation mTOR : rétrocontrôle et stratégies d'inhibition.**

Le rétrocontrôle négatif exercé par p70S6K (S6K1) sur la protéine IRS permet de moduler l'activité de la voie mTOR (A). Lorsque l'activation du complexe mTORC1 est bloquée par un rapalogue, le rétrocontrôle est aboli et le flux signalétique conduit à l'activation de AKT et à une réponse proliférative (B). Cette prolifération induite par la suractivation de AKT peut être diminuée par l'utilisation d'inhibiteurs de dernière génération qui ciblent l'activité kinase de mTORC1 et mTORC2 (C) ou d'inhibiteurs doubles de PI3K et mTOR (D). (Laplanche and Sabatini, 2012)

La croissance cellulaire dépend de la synthèse protéique, et nécessite donc un apport énergétique important. Ce niveau énergétique est donc capable de moduler la voie mTOR, essentiellement par un senseur énergétique clé, la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase). L'AMPK est activée en réponse à une diminution de l'énergie disponible au niveau cellulaire (appréciée par le ratio AMP/ATP) et va favoriser la production d'ATP, et le blocage des mécanismes consommateurs d'énergie tels que la synthèse protéique (Kahn et al., 2005). L'AMPK activée phosphoryle TSC2 et stimule son activité GAP, qui conduit à une inhibition de mTORC1, et donc à l'inactivation de ses deux effecteurs p70S6K et 4EBP1 (Inoki et al., 2003). Une autre étude montre que l'AMPK peut aussi inhiber directement mTORC1, de façon TSC2-dépendante, en phosphorylant RAPTOR (Gwinn et al., 2008).

Une autre protéine est impliquée dans la régulation de mTOR par le métabolisme énergétique, LKB1. Ce suppresseur de tumeur est une kinase située en amont d'AMPK. LKB1 est capable de phosphoryler et d'activer l'AMPK, conduisant ainsi à l'inactivation de mTORC1 (Shaw, 2009).

### **8.2.3. Etat nutritionnel**

L'état nutritionnel de la cellule est aussi capable de réguler l'activité de la signalisation médiée par mTOR via les acides aminés. En effet, la synthèse protéique dépend étroitement de la disponibilité en acides aminés. Certaines études des années 1990 montrent que la leucine et l'arginine sont essentiels à la transduction du signal et à l'activation de mTORC1 (Blommaart et al., 1995; Hara et al., 1998). Cette activation de mTORC1 par les acides aminés repose sur les Rag GTPases (Ras-related GTPase) (Kim et al., 2008). Quatre protéines Rag ont été mises en évidence chez les mammifères (RagA-D). Ces protéines s'associent en hétérodimères, RagA/B et RagC/D, qui sont chargés différemment en nucléotides : lorsque RagA/B est lié au GTP, RagC/D est lié au GDP. Les acides aminés peuvent favoriser la liaison du GTP à RagA/B, ce qui permet à cet hétérodimère d'interagir avec RAPTOR et d'induire son activation via une translocation de mTORC1 à la membrane lysosomale où il pourrait être activé par Rheb (Bar-Peled et al., 2013; Sancak et al., 2008).

### **8.2.4. Stress**

Les cellules peuvent répondre à des signaux de stress environnementaux (déplétion énergétique ou hypoxie) en inhibant les processus intracellulaires énergivores, et en stoppant leur croissance. Dans le cadre de l'hypoxie, ce stress induit une inhibition de l'activité de mTORC1 et une baisse de la synthèse protéique. Le signal hypoxique est transduit jusqu'à mTORC1 par les deux protéines homologues REDD1 et REDD2 (regulated in development and DNA damage responses 1 and 2)

(Brugarolas et al., 2004). L'expression des protéines REDDs est augmentée par le facteur HIF-1 $\alpha$ ., et ces deux protéines agissent en aval d'Akt et en amont du complexe TSC1/TSC2. Le mécanisme d'action exact des protéines REDD sur le complexe TSC1/TSC2 est peu clair à l'heure actuelle.

Les dommages de l'ADN sont aussi responsables de la modulation de l'activation de mTOR, via les activations p53-dépendante de TSC2 et de PTEN qui conduisent à l'inhibition de toute la signalisation mTOR. De plus, certaines sous-unités de l'AMPK sont des cibles transcriptionnelles de p53, qui participent à l'inhibition de mTOR lors de dommages de l'ADN (Feng et al., 2007).

### 8.3. Mécanismes cellulaires régulés par mTOR

mTORC1 est capable de réguler la **traduction protéique** via ses deux principaux effecteurs, p70S6K et 4EBP1 (Tee and Blenis, 2005). La phosphorylation de 4EBP1 va empêcher sa fixation à eIF4E (cap-binding protein), et donc favoriser la formation du complexe eIF4F (auquel participe eIF4E) indispensable à l'initiation de la traduction coiffe-dépendante.

Le rôle de p70S6K sur la traduction a été longtemps discuté. Les premiers travaux publiés montraient que p70S6K phosphoryle la protéine ribosomale 40S S6, ce qui induit l'augmentation de la traduction d'un sous-type spécifique d'ARNm qui contiennent une succession d'oligopyrimidines côté 5' (TOP, 5' tract of oligopyrimidine). Ces ARNs 5'TOP codent pour des composants de la machinerie de traduction, tels les protéines ribosomiques ou les facteurs d'élongation. La phosphorylation de p70S6K engendrerait donc, via le mécanisme précédemment décrit, une augmentation de la capacité traductionnelle de la cellule. Ce mécanisme est cependant remis en question, puisque certaines études ont montré que la traduction des ARNs 5'TOP n'était pas dépendante de p70S6K, ni de la phosphorylation des protéines S6 (Ruvinsky et al., 2005; Tang et al., 2001). Néanmoins, la protéine mTOR semble contrôler la production de ces ARNs 5'TOP puisque la rapamycine réprime la traduction de ces ARNs particuliers (Tang et al., 2001). Une autre étude démontre que p70S6K stimule la transcription de l'ADN ribosomique à l'origine de l'ARN ribosomique 45S, précurseur des ARN 18S, 5,8S et 28S formant les ribosomes. Ce mécanisme est dépendant de la phosphorylation du facteur de transcription UBF (Hannan et al., 2003).

mTORC1 agit néanmoins sur la traduction par 2 autres mécanismes principaux : (1) mTORC1 peut activer la protéine régulatrice TIF-1A (tripartite motif-containing protein-24) qui interagit avec l'ARN polymérase I et induit l'expression des ARN ribosomiaux (Mayer et al., 2004) ; (2) mTORC1 peut aussi inhiber, par phosphorylation, maf1, un répresseur de l'ARN polymérase III qui induit alors la transcription d'ARNt et de sous-unités ribosomiques (Kantidakis et al., 2010; Shor et al., 2010).

mTORC1 est aussi capable de contrôler la **transcription** de plusieurs gènes, impliqués dans les voies métaboliques et de biosynthèse (Peng et al., 2002). Il a notamment été montré que mTOR était



capable de phosphoryler STAT1 et STAT3 (signal transducer and activator of transcription) et donc d'activer le facteur de transcription et récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), un régulateur central de l'adipogenèse (Kim and Chen, 2004; Kristof et al., 2003).

La protéine mTOR est donc aussi capable de contrôler le **catabolisme** cellulaire. C'est le cas notamment de la synthèse lipidique, indispensable aux cellules qui prolifèrent pour la synthèse de leurs membranes. Le complexe mTORC1 est en effet capable d'activer les facteurs de transcription SREBPs (sterol regulatory element-binding proteins), qui contrôlent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des acides gras et du cholestérol. Une baisse de l'activité de mTORC1, concomitante à une baisse de prolifération, diminue l'activité des SREBPs et l'expression des gènes lipogéniques pour ajuster la production de lipides destinés à la synthèse membranaire. L'effecteur de mTORC1 mis en jeu dans ces processus semble être p70S6K (Düvel et al., 2010; Wang et al., 2011). Le complexe mTORC1 peut aussi, par phosphorylation directe, empêcher la translocation nucléaire de la lipin-1, responsable de l'inhibition des SREBPs (Peterson et al., 2011).

mTORC1 est aussi capable de réguler positivement le flux glycolytique, notamment via la transcription et la traduction du facteur HIF1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ), qui agit sur l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse et l'angiogenèse (Hudson et al., 2002; Laughner et al., 2001).

Un autre processus contrôlé par mTOR est l'**autophagie**. Ce processus permet aux cellules en manque de nutriment de recycler leur contenu cytoplasmique pour s'adapter et survivre. Ce processus est régulé par mTOR chez les levures et eucaryotes (Jung et al., 2010). Chez la levure, mTOR agit comme un régulateur négatif en inhibant la kinase Atg1 qui active les étapes précoces de l'autophagie (Kamada et al., 2000). Chez les mammifères, mTORC1 inhibe par phosphorylation directe le complexe ULK1/Atg13/FIP200 (unc-51-like kinase A/autophagy-related gene 13/focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa), un complexe de kinases requis pour initier l'autophagie (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009).

Un dernier exemple de mécanisme contrôlé par mTOR est celui de l'**organisation de l'actine** qui est contrôlée par mTORC2. Des études menées chez la levure montrent que mTORC2 phosphoryle directement YpK2 (yeast protein kinase), protéine indispensable à la polymérisation de l'actine (Kamada et al., 2005). Chez les mammifères, mTORC2 active la PKC- $\alpha$  qui régule le cytosquelette d'actine (Sarbasov et al., 2004).

#### **8.4. Pertinence de l'inhibition de mTOR en cancérologie**

Au vue du rôle central de la protéine mTOR dans ces nombreux mécanismes cellulaires, elle est vite devenue une cible thérapeutique de premier choix. Grâce à son identification par la rapamycine, des

analogues de ce macrolide bactérien (aussi appelés rapalogues) ont été développés dans le but de l'inhiber.

#### **8.4.1. Dans les cancers non endocrines**

Dans la plupart des cancers, la voie de signalisation mTOR peut être dérégulée par des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs, ainsi que par certains microARNs (Oneyama et al., 2011; Shaw and Cantley, 2006). Ces dérégulations aboutissent majoritairement à l'hyperactivation de cette voie de signalisation et induisent plusieurs changements bénéfiques au sein de la cellule tumorale, dont la stimulation de la synthèse protéique via p70S6K et 4EBP1, l'augmentation de l'expression de gènes glycolytiques via HIF-1 $\alpha$  qui favorise l'effet Warburg, caractéristique des cellules tumorales ou encore l'inhibition de l'autophagie.

De façon intéressante, aucune mutation de mTOR n'a été mise en évidence à ce jour. Néanmoins, des altérations génétiques peuvent toucher un grand nombre de ses partenaires et régulateurs. Ces altérations peuvent survenir sur des acteurs membranaires (notamment les RTKs) ou cytoplasmiques situés en amont de mTOR (PI3K, PTEN, Akt, Ras ou encore Raf). Par exemple, l'IGF-1R, récepteur de l'IGF1, est très souvent surexprimé dans de nombreux types tumoraux, et est associé à un mauvais pronostic (He et al., 2010; Wu et al., 2013). Cela est aussi le cas pour l'EGFR, dont les mutations ou amplifications conduisent, entre autre, au développement de glioblastomes ou de tumeurs pulmonaires (Arteaga, 2006; Benito et al., 2010).

Parmi les acteurs cytoplasmiques de la voie mTOR, le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains est *PI3KCA*, qui code pour la sous-unité catalytique de la PI3K (Samuels and Waldman, 2010). On recense des mutations de *PI3KCA* dans les cancers de la prostate, les carcinomes hépatocellulaires et dans les glioblastomes. On trouve ensuite le suppresseur de tumeur PTEN, dont l'inactivation est retrouvée dans de nombreuses pathologies tumorales (Simpson and Parsons, 2001).

Ces hyperactivations de l'axe PI3K/Akt/mTOR peuvent être appréciées par l'étude des niveaux de phosphorylation des deux effecteurs de mTORC1, 4EBP1 et particulièrement p70S6K. En effet, une parfaite correspondance entre l'état d'activation de mTOR et la phosphorylation de p70S6K est retrouvée dans de nombreux cancers (Menon and Manning, 2008).

La rapamycine, inhibiteur naturel de mTOR, est déjà utilisée lors de greffes pour ses propriétés immunosuppressives. Son mécanisme d'action sur mTOR n'est pas totalement élucidé mais on sait que cette molécule se lie à la protéine FKBP12, indispensable à l'activation de mTORC1, et induit l'inhibition de l'activité de mTOR. Cette action inhibitrice de la rapamycine est spécifique du complexe mTORC1, et ne cible pas mTORC2 (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004). Même si

certaines études montrent qu'une exposition prolongée à la rapamycine de certains types cellulaires induit aussi une inhibition de mTORC2, ces effets semblent restreints à certains tissus (Sarbasov et al., 2006).

Deux principaux rapalogues ont été développés en tant que molécules anti-cancéreuses : l'évérolimus (RAD001, Afinitor) et le temsirolimus (CCI-779, Torisel) et de nombreux essais cliniques confirment actuellement leurs propriétés anti-tumorales. En 2007, la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé la mise sur le marché du temsirolimus pour le traitement du carcinome rénal à cellules claires de stade avancé. Plus récemment, c'est l'utilisation de l'évérolimus chez les patients atteints de sclérose tubéreuse de Bourneville qui a été autorisée. Néanmoins, les très nombreux essais cliniques en cours utilisant les rapalogues montrent des résultats globalement modestes, même si ceux-ci sont positifs dans certains cancers, en particulier dans certains types tumoraux résistants aux chimiothérapies conventionnelles (Wander et al., 2011).

Le succès limité des rapalogues peut s'expliquer par la présence d'un grand nombre de boucles de rétrocontrôle qui semblent limiter l'efficacité clinique des rapalogues. Le rétrocontrôle négatif principal est exercé par p70S6K sur IRS (détaillé dans la section 8.2.1). mTORC1 peut aussi agir directement sur IRS pour l'inhiber par phosphorylation (Tzatsos and Kandrор, 2006). De plus, de nombreuses études montrent que la rapamycine n'inhibe que partiellement la phosphorylation de 4EBP1 (Choo et al., 2008; Nyfeler et al., 2011). Une dernière limite réside dans le fait que les rapalogues sont peu cytotoxiques. En effet, l'inhibition seule de mTORC1 ne semble pas suffisante, et mTORC2 est toujours capable d'activer Akt, responsable de l'activation de mécanismes anti-apoptotiques.

Ces limites ont conduit au développement d'inhibiteurs dits « de seconde génération », qui vont cibler le site de fixation de l'ATP du domaine kinase des deux complexes mTORC1 et mTORC2. Du fait des redondances structurelles des domaines catalytiques de mTOR et des PI3Ks, certains de ces nouveaux inhibiteurs peuvent inhiber l'activité de ces deux acteurs comme le BEZ235 (Maira et al., 2008).

#### **8.4.2. Dans les TNE-GEPs**

Les TNE-GEPs constituent un groupe de tumeurs pour lesquelles l'utilisation des rapalogues semble particulièrement indiquée. En effet, la surexpression de nombreux éléments de la voie PI3K/Akt/mTOR est fréquemment retrouvée chez ces tumeurs, notamment ceux du système IGF-1. L'expression de ce facteur de croissance, de ces récepteurs et de protéines de liaison associées est effectivement retrouvée dans les TNE-GEPs (Wulbrand et al., 2000). De plus, l'expression de ce récepteur est corrélée à l'agressivité de gastrinomes (Furukawa et al., 2005). Dans les tumeurs

endocrines pancréatiques sporadiques, une baisse de l'expression de TSC2 et PTEN (deux régulateurs négatifs de la signalisation mTOR) est fréquemment observée et est corrélée à un mauvais pronostic (Missiaglia et al., 2010).

De manière générale, de nombreuses études rapportent une suractivation de l'axe mTOR dans les TNE-GEPs (Kasajima et al., 2011; Shida et al., 2010). Une étude récente portant sur une série de 195 patients porteurs de TNE-GEPs, dont une majorité d'origine intestinale, montre que les expressions de mTOR et de ses deux effecteurs sont associées à un mauvais pronostic. De façon intéressante, l'expression d'Akt et de l'effecteur p70S6K phosphorylé est plus importante dans les TNE-GEPs intestinales par rapport aux tumeurs pancréatiques. Dans l'ensemble de la série considérée, les niveaux d'expression de la PI3K, de mTOR et de phospho-4EBP1 sont corrélés à l'index Ki67. De plus, une analyse statistique multi-variée indique que les expressions de mTOR, phospho-p70S6K et phospho-4EBP1 sont corrélées avec une diminution de la survie globale (Qian et al., 2013).

Les études précliniques utilisant l'évérolimus et conduites sur des cellules tumorales endocrines sont plutôt rares. Ce rapalogue induit la baisse de la prolifération des cellules tumorales pancréatiques humaines BON *in vitro*, via l'inhibition de p70S6K, ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire (Zitzmann et al., 2007). Des effets anti-tumoraux similaires de l'évérolimus sont observés sur la lignée tumorale  $\beta$ -pancréatique INS1 (Grozinsky-Glasberg et al., 2008). Une autre étude montre que l'injection de rapamycine réduit le volume tumoral chez des souris greffées en sous-cutané avec les cellules BON (Moreno et al., 2008). Des données similaires ont été obtenues avec des modèles cellulaires intestinaux chez lesquels la rapamycine ou l'évérolimus induisent une baisse de la sécrétion de VEGF, ainsi que des effets anti-tumoraux *in vitro* et *in vivo* (Bollard et al., 2013; Couderc et al., 2011; Villaume et al., 2010). Récemment, un groupe rapporte que l'inhibition combinée des voies de signalisations PI3K/mTOR et MAPKinase, dans un modèle endocrine pancréatique, permet la diminution de la croissance cellulaire et ainsi que du potentiel métastatique (Djukom et al., 2013).

Néanmoins, certaines études pointent les limites de l'évérolimus quant à son activité anti-proliférative, puisque cet inhibiteur est responsable de la levée du rétrocontrôle exercé par p70S6K sur IRS1 (Zitzmann et al., 2007). Les auteurs préconisent d'utiliser l'évérolimus en combinaison avec des inhibiteurs d'autres voies de signalisation, telle que la voie des MAPK (Zitzmann et al., 2010) (Figure 7).

Si on s'intéresse aux études cliniques, on s'aperçoit qu'elles ne concernent presque qu'exclusivement les tumeurs endocrines pancréatiques. Pour celles-ci, une étude clinique de phase III a montré des résultats prometteurs. En effet, la survie sans progression est augmentée de 2,4 fois chez les patients traités à l'évérolimus par rapport au groupe placebo (11 mois vs 4,6 mois). Néanmoins, le taux de réponse objective (réduction du volume tumoral) reste très faible, environ 5% (Yao et al., 2011b). L'inhibiteur induit aussi une baisse de l'hypersécrétion hormonale chez les patients présentant un

syndrome fonctionnel (Fiebrich et al., 2011; Kulke et al., 2009), ainsi qu'une diminution des marqueurs angiogéniques (Yao et al., 2013).

La réponse des tumeurs endocrines avancées de l'intestin moyen (et présentant une hypersécrétion hormonale) à l'évérolimus a été évaluée dans une étude clinique de phase II, dans laquelle les patients recevaient l'octréotide, combiné ou non à l'inhibiteur de mTOR. La combinaison des deux agents a permis d'augmenter la survie sans progression par rapport à l'octréotide seul (16,4 mois vs. 11,3 mois) (Pavel et al., 2011).

L'utilisation de l'évérolimus est approuvée en Mai 2011 pour le traitement des patients présentant une tumeur endocrine pancréatique progressive et non résécable. Des autorisations de prescription hors AMM (autorisation de mise sur le marché) permettent aussi d'utiliser cet agent dans d'autres types de TNE-GEPs. Néanmoins, les effets de cet inhibiteur restent modestes, et des résistances peuvent apparaître chez les patients. Cela semble en partie dû à la levée du rétrocontrôle négatif exercé par p70S6K sur IRS1, et qui aboutit à une suractivation de AKT (Sun et al., 2005a; Tabernero et al., 2008), ainsi que de la voie des MAPKinases (Svejda et al., 2011) (Figure 7).

A noter qu'une étude montre que l'inhibition de Akt conduit à une réduction de la croissance de modèles cellulaires de TNE-GEPs, *in vitro* et *in vivo* (Gloesenkamp et al., 2012b).

## **Seconde Partie - Vers l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans la progression des TNE-GEPs**

Malgré l'approbation de l'évérolimus, inhibiteur de mTOR, par la FDA en 2011 pour le traitement des tumeurs endocrines pancréatiques, son efficacité thérapeutique reste limitée. Cela semble être dû, en partie à la levée d'un rétrocontrôle négatif exercée par un effecteur de la protéine mTOR (Tabernero et al., 2008) et à l'activation compensatoire de signalisations annexes comme celle médiée par la voie des MAPKinases (Svejda et al., 2011). Même si l'utilisation combinée de l'évérolimus avec un inhibiteur de la PI3K permet de restaurer l'efficacité thérapeutique de l'inhibiteur de mTOR, notamment dans le cancer du sein (Chen et al., 2013), ces combinaisons d'inhibiteurs ou les inhibiteurs ciblant plusieurs kinases simultanément restent à évaluer dans les TNE-GEPs en termes de mode d'administration (combinaisons, séquences...) et d'évaluation des effets secondaires. En parallèle de ces études, il semble donc tout à fait pertinent de rechercher d'autres cibles thérapeutiques et/ou biomarqueurs afin de compléter l'arsenal thérapeutique des TNE-GEPs. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires favorisant l'invasion locale et la dissémination métastatique de ces tumeurs est un prérequis à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans ce contexte une étude a été conduite au laboratoire sur un modèle murin de xéno greffe orthotopique (voir quatrième partie, section 2.2.2) par analyse protéomique. La comparaison des protéomes de tumeurs non invasives et invasives a permis d'identifier la protéine CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) (article 2). Cette famille de protéines, les CRMPs, sont très majoritairement décrites pour leur rôle dans le développement du système nerveux, et notamment en tant qu'effecteur principal de la voie de la sémaphorine 3A (Charrier et al., 2003). Du fait de leur fonction, et de façon générale, les protéines de la famille des sémaphorines sont regroupées en une superfamille de protéines appelée facteurs de guidage axonal (FGAs, qui regroupent aussi les nétrines, les éphrines et les protéines Slit/Robo) (Chédotal et al., 2005). Ces facteurs de guidage axonal sont aussi impliqués dans la morphogenèse de nombreuses structures épithéliales dont le pancréas et le réseau vasculaire (Hinck, 2004; Lai Wing Sun et al., 2011). Il n'est donc pas aberrant que les FGAs soient aussi impliqués en pathologie tumorale, notamment dans l'invasion locale, la dissémination métastatique, mais aussi dans les modifications du microenvironnement tumoral et dans la modulation de l'angiogenèse (Adams and Eichmann, 2010).

De façon étonnante, et malgré les similitudes phénotypiques et fonctionnelles partagées par les cellules endocrines avec les cellules nerveuses, un très faible nombre d'études porte sur l'implication des FGAs dans les TNE-GEPs. En effet, et malgré le fait que cellules endocrines et cellules nerveuses ne partagent pas la même origine embryonnaire, quelques ressemblances les rapprochent : comme les cellules nerveuses, les cellules endocrines contiennent des vésicules synaptiques, synthétisent et sécrètent des neuropeptides (somatostatine, cholécystokinine par exemple) ; et ces deux types

cellulaires expriment des marqueurs neuroendocrines communs tels que la N-CAM et la synaptophysine.

Les altérations de certaines FGAs pourraient donc jouer des rôles clés dans la progression tumorale des TEN-GEPs, et notamment dans l'acquisition d'un phénotype migratoire par les cellules endocrines tumorales. A ce stade, il est important de rappeler que le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) n'est que très peu renseigné dans les TNE-GEPs, contrairement à d'autres adénocarcinomes plus classiques où la TEM est mieux caractérisée. Dans les TNE-GEPs, parmi les marqueurs classiquement associés à la TEM, seule la  $\beta$ -caténine, Snail1 et Foxc2 (Forkhead box protein C2) semblent être impliqués (Galván et al., 2013; Hervieu et al., 2006).

Les seules évidences en faveur d'une implication des FGAs, et plus particulièrement des molécules de la famille des sémaphorines, sont rapportées dans les tumeurs neuroendocrines du poumon. En effet, la perte d'expression sémaphorine 3F concerne 50% des tumeurs neuroendocrines de haut grade du poumon (Brambilla et al., 2000). Dans ce type tumoral, l'expression des récepteurs aux sémaphorines (neuropilines) est retrouvée (Lantuéjoul et al., 2003). De plus, l'implication d'un autre FGA, impliqué dans la signalisation des sémaphorines, est retrouvée dans ces tumeurs neuroendocrines du poumon. Il s'agit de la protéine CRMP5 (collapsin response mediator protein 5) qui est décrite comme un marqueur d'agressivité spécifique de cette pathologie tumorale (Meyronet et al., 2008). Dans les tumeurs neuroendocrines de la sphère digestive, seule l'expression de la neuropiline-2 été rapportée. La neuropiline-2 est exprimée dans les cellules endocrines normales tout le long du tractus digestif (appendice, intestin grêle, duodénum, estomac et côlon). Les auteurs précisent que, dans le côlon, les cellules positives pour ce récepteur sécrètent la sérotonine et que son expression est perdue dans les tumeurs carcinoïdes (Cohen et al., 2001). Cette perte de la neuropiline-2 dans les tumeurs n'a cependant pas été confirmée par d'autres études, ni par les travaux du laboratoire. Ce récepteur est aussi exprimé dans le compartiment endocrine du pancréas, et plus précisément par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans, sécrétant le glucagon. Dans les tumeurs endocrines pancréatiques, les auteurs détectent une forte expression de la neuropiline-2, sans association avec le caractère fonctionnel ou non de la lésion (Cohen et al., 2002). Pour finir, les récepteurs de l'éphrine A ont été mis en cause dans la progression tumorale dans le modèle de souris RIP-Tag. En effet, les insulinomes développés par les souris RIP-Tag présentent une expression élevée de l'éphrine A1. L'injection de formes solubles de plusieurs récepteurs de l'éphrine A chez ces souris permet d'inhiber la progression tumorale, ainsi que la diminution de la densité vasculaire des lésions (Brantley et al., 2002; Cheng et al., 2003). De plus, une autre éphrine, l'éphrine B3, est exprimée par les cellules endocrines pancréatiques lors de la seconde vague de différenciation, participant ainsi au développement du compartiment endocrine du pancréas (Villasenor et al., 2012).



Tous ces arguments sont donc en faveur de l'intérêt de l'étude des FGAs dans la progression des TNE-GEPs. Actuellement, et parmi l'ensemble des FGAs, ce sont les protéines de la famille des sémaphorines qui font l'objet de travaux avancés dans le domaine de la cancérologie.

## **Troisième Partie - Les sémaphorines**

## **1. Généralités**

Les sémaphorines (SEMA) constituent une grande famille de protéines sécrétées ou associées à la membrane qui sont conservées, tant en termes de structure que de fonction, dans des espèces aussi diverses que nombreuses. Ces protéines ont d'abord été décrites pour leur rôle dans le guidage axonal lors du développement du système nerveux (notamment dans les phénomènes d'attraction et/ou de répulsion des neurones, au niveau des cônes de croissance). Par la suite, ce sont leurs fonctions dans le système immunitaire et dans les processus cancéreux qui ont été mises à jour et qui seront détaillées ici.

La modulation de phénomènes biologiques aussi divers résulte de mécanismes signalétiques complexes médiés par les sémaphorines via leur liaison à deux types majeurs de récepteurs, les neuropilines et les plexines.

### **1.1. Découverte**

La première sémaphorine, la SEMA1A, alors appelée fascicline IV, a été identifiée en 1992 dans le système nerveux de la sauterelle pour son rôle dans la fasciculation axonale (Kolodkin et al., 1992). L'année suivante, la sémaphorine la mieux caractérisée à ce jour, la SEMA3A (nommée alors collapsine) est purifiée à partir du cerveau de poulet, dans lequel elle induit la rétraction axonale des cônes de croissance (Luo et al., 1993).

Durant les années suivantes, les séquences codantes pour différentes sémaphorines sont identifiées chez le nématode, les insectes, les crustacés, les vertébrés et les virus. Des noms différents leur sont alors attribués, créant ainsi des problèmes d'homogénéité. En 1999, une nomenclature est alors adoptée au niveau international, et toutes ces protéines sont regroupées sous le nom de sémaphorines (Semaphorin Nomenclature committee, 1999). Le terme « sémaphorine » vient du mot sémaphore (du grec sema : signe et phoros : qui porte) qui désignait un poste de guet installé sur la côte dont le but était de surveiller les attaques ennemies et de donner l'alerte par signaux optiques, sous Napoléon 1<sup>er</sup>. A l'heure actuelle, la famille des sémaphorines compte environ 21 membres chez les mammifères, 5 chez la drosophile. Ces membres sont regroupés en 8 classes (I-VII).

### **1.2. Les 8 classes**

Parmi les 8 classes qui regroupent l'ensemble des sémaphorines, on distingue les classes I et II chez les invertébrés, les classes III à VII chez les vertébrés, la classe V chez les virus. Les membres des

classes 2 et 3 sont des protéines sécrétées, tandis que les autres membres sont ancrés aux glycosylphosphatidylinositols (GPI, classe 7) ou transmembranaires (classes 1, 4, 5 et 6) (Figure 8).

### **1.3. Localisation chromosomique**

Les gènes codant pour les sémaphorines sont repartis sur différents chromosomes. Par exemple, le chromosome 1 code pour les SEMA6C et 4A, le chromosome 2 pour les SEMA4F et 4C tandis que le chromosome 3 porte les gènes codant pour les SEMA3B, 3F, 3G et 5B (Tableau 5).

## **2. Structure**

Les nombreux membres de la famille des sémaphorines présentent des structures très différentes mais partagent une partie commune, constituée par le peptide signal et le domaine « sema », qui a une taille d'environ 500 acides aminés (Kolodkin et al., 1993). La structure tertiaire de ce domaine est proche de celle des intégrines, suggérant ainsi des inter-relations potentielles. Ce domaine est retrouvé dans les plexines et les RTKs MET et RON, deux récepteurs impliqués dans des voies médiant l'invasion cellulaire (Angeloni et al., 2004; Gherardi et al., 2003). Cette séquence sema peut être séparée en deux domaines, le domaine sema à proprement parler, et un plus petit domaine riche en cystéine, retrouvé chez les plexines et les intégrines. Ce dernier, appelé domaine CRD (cystein rich domain), MRS (methionin related sequence) ou PSI (plexin-semaphorin-integrin domain), favorise la dimérisation des protéines (Kong-Beltran et al., 2004; Kozlov et al., 2004).

A la suite des domaines sema et PSI, des différences de structure sont observées en fonction de la classe de sémaphorine considérée : un domaine immunoglobulin-like (Ig-like) caractérise les classes 2, 3, 4 et 7, tandis qu'on retrouve une série d'acides aminés carboxyterminaux basiques chez les membres de la classe 3 et plusieurs motifs thrombospondine chez ceux de la classe 5. Pour finir, la classe 7 contient un groupement GPI, nécessaire à son ancrage membranaire (Figure 8).

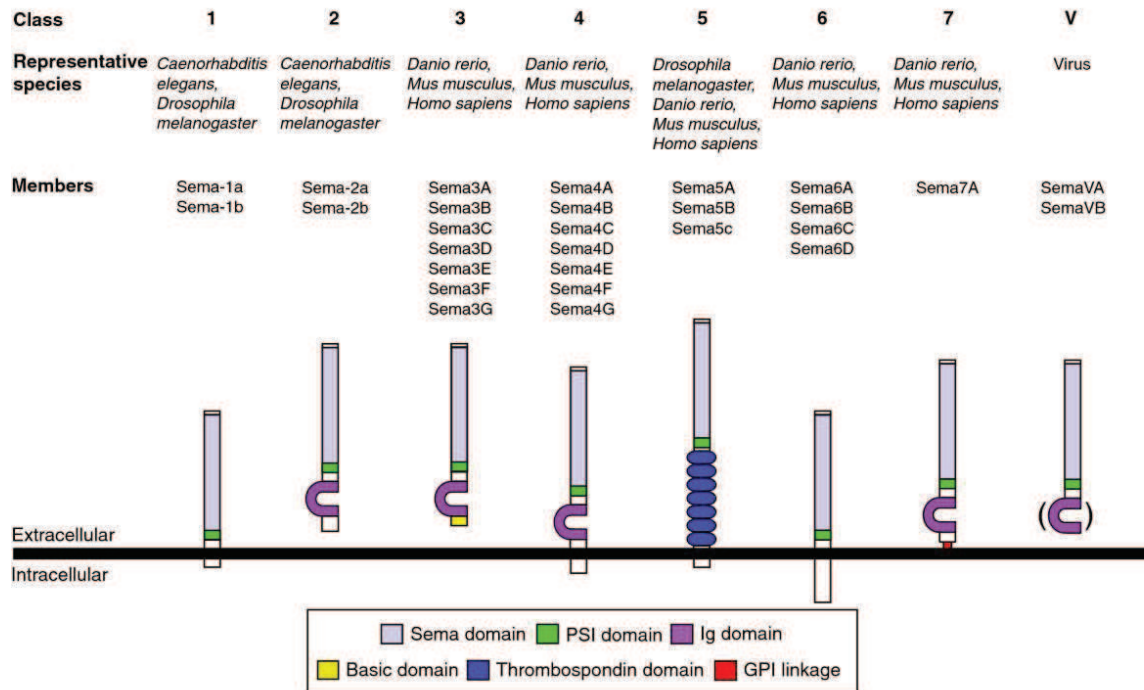
## **3. Signalisation**

Les sémaphorines sont capables de médier de nombreuses voies de signalisation intracellulaires et d'induire de nombreux effets différents, qui peuvent être parfois opposés. Ces signalisations vont dépendre du contexte cellulaire, des récepteurs ainsi que des co-récepteurs exprimés par le type cellulaire considéré. A cela viennent s'ajouter des partenaires intracytoplasmiques qui vont complexifier la réponse cellulaire aux sémaphorines.

Chromosome	Localisation	Gène	Chromosome	Localisation	Gène
1	1q21.2	SEMA6C	7	7p12.1	SEMA3A
	1q22	SEMA4A		7q21.11	SEMA3D, SEMA3E
	1q32.2	PLXNA2		7q21-q31	SEMA3C
2	2p13.1	SEMA4F		7q32.3	PLXNA4
	2q33.3	NRP2	9	9q22.2	SEMA4D
3	3p21.31	PLXNB1	10	10p12	NRP1
	3p21.3	SEMA3F, SEMA3B		10q24.31	SEMA4G
	3p21.1	SEMA3G	12	12q23.3	PLXNC1
	3q21.1	SEMA5B	15	15q21.1	SEMA6D
	3q21.3	PLXNA1		15q22.3-q23	SEMA7A
	3q22.1	PLXND1		15q25	SEMA4B
5	5p15.2	SEMA5A	19	19p13.3	SEMA6B
	5q23.1	SEMA6A	22	22p13.3	PLXNB2
			X	Xq28	PLXNA3, PLXNB3

**Tableau 5 : Localisation chromosomique des sémaphorines, des neuropilines et des plexines.**

Malgré la présence de domaines conservés, les différents membres de la famille des sémaphorines, neuropilines et plexines sont codés par différents gènes, portés par différents chromosomes humains (d'après Nasarre et al., 2010).



**Figure 8 : Les huit classes de sémaphorines : membres et structure.**

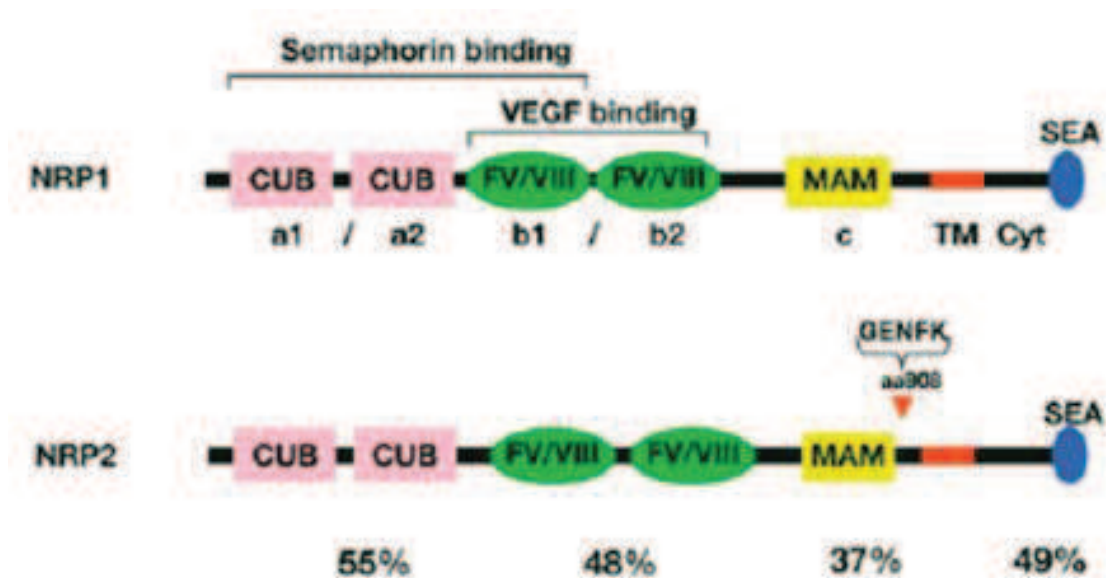
Les sémaphorines sont regroupées en huit classes, dont deux concernent les invertébrés, alors que cinq sont retrouvées chez les vertébrés et une chez les virus. Ces protéines possèdent un domaine Sema conservé, et peuvent être transmembranaires, sécrétées ou ancrées à la membrane selon la famille considérée. (Yazdani and Terman et al, 2006)

### 3.1. Partenaires membranaires

#### 3.1.1. Neuropilines

La première neuropiline (NRP) a été identifiée en 1987 dans le *tectum* (partie dorsale du mésencéphale) du xénope et appelée antigène A5 (Takagi et al., 1987, 1991). Chez les vertébrés, la famille des NRPs compte deux membres, NRP-1 et NRP-2, qui présentent une homologie de séquence en acides aminés égale à 44% (Chen et al., 1997). Ces deux récepteurs sont codés par les chromosomes 10 et 2, respectivement (Tableau 5).

Ces deux membres partagent six grands domaines qui sont nécessaires et suffisants à la liaison d'un ligand : (1) un peptide signal en N-terminal, (2) les domaines a1a2, constitués en réalité de deux domaines CUB (calcium binding C1r/C1s/Uegf/Bmp-1), (3) les domaines b1b2, constitués de deux domaines d'homologie aux facteurs de coagulation V/VIII-like (Kiedziarska et al., 2007), (4) le domaine c ou MAM (Meprin/A5-antigen/ptp-Mu), (5) une hélice transmembranaire simple et (6) un domaine intracellulaire court (Gaboriaud et al., 2011). Le domaine a1 est nécessaire à l'interaction avec le domaine sema des sémaphorines de classe 3 (Gu et al., 2002; Koppel et al., 1997), tandis que le domaine b1 est essentiel à la liaison du domaine C-terminal du VEGF et des SEMA3 (Starzec et al., 2007; Teesalu et al., 2009). De plus, les domaines b1 et b2 interagissent de façon physique pour permettre l'interaction avec l'héparine (Vander Kooi et al., 2007). Le domaine MAM n'est pas nécessaire à la liaison avec le ligand, mais est indispensable pour induire la signalisation intracellulaire (Nakamura et al., 1998) notamment en favorisant la dimérisation des NRPs entre elles (Chen et al., 1998). Ces domaines extracellulaires sont reliés à un court domaine intracellulaire par une hélice simple qui présente un fort potentiel de dimérisation. Le rôle de cette hélice simple dans l'induction d'une signalisation semble aussi primordial que celui du domaine MAM (Roth et al., 2008). Pour finir, le domaine cytoplasmique (court puisque de 44 acides aminés pour NRP-1 et 43 pour NRP-2) contient un domaine SEA qui peut interagir avec la séquence consensus PDZ (Postsynaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens protein 1) (Figure 9). Cette séquence est retrouvée dans les protéines GIPC (GAIP interacting protein, C terminus), qui semblent être des protéines scaffold impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. (Cai and Reed, 1999; Katoh, 2002). Il a été admis pendant longtemps que le domaine cytoplasmique ne possédait pas d'activité fonctionnelle, et qu'une interaction des neuropilines avec les plexines était nécessaire et obligatoire pour médier la signalisation induite par les sémaphorines. Néanmoins, quelques études récentes suggèrent le contraire. En effet, des études portant sur un modèle de souris déficientes pour ce domaine cytoplasmique montrent que ce dernier est nécessaire au remodelage artérioveineux (Fantin et al.,



**Figure 9 : Structure des neuropilines.**

Les deux neuropilines sont composées d'un tandem de domaines CUB, d'un tandem de domaines d'homologie aux facteurs de coagulation V/VII, d'un domaine MAM, d'une hélice transmembranaire (TM) et d'une partie intracytoplasmique (Cyt) contenant le domaine SEA. La neuropiline-2 se distingue par l'insertion de cinq acides aminés (GENFK) indiqués par la flèche orange. Les sites de liaison aux sémaphorines et au VEGFs sont indiqués, ainsi que les pourcentages d'homologie entre les différents domaines des deux récepteurs. (Adapté de Pellet-Many et al., 2008)

TM : domaine transmembranaire ; Cyt : domaine cytoplasmique



2011). Plus récemment, son rôle est démontré dans le recrutement du VEGFR2 et la morphogénèse artérielle dépendante du VEGF-A (Lanahan et al., 2013).

Il existe des variants d'épissage de NRP-1 et -2 : les formes épissées les mieux caractérisées sont issues de l'inclusion de plusieurs introns entre les domaines b2 et MAM. Ces introns contiennent un codon stop et vont donc conduire à la production de neuropilines solubles. Certains de ces variants présentent une activité biologique, tandis que d'autres non (Gagnon et al., 2000; Rossignol et al., 2000). Les neuropilines étant aussi des récepteurs au VEGF, ces formes solubles semblent pouvoir moduler l'angiogenèse développementale. En effet, certaines formes solubles modifiées de NRP-1 peuvent inhiber la liaison du VEGF-A à la NRP-1. De la même façon, le domaine b1b2 soluble est capable d'inhiber la liaison de la SEMA3A à NRP-1 (Parker et al., 2012).

En plus des SEMA3 et du VEGF, les neuropilines peuvent aussi fixer d'autres ligands tels que l'HGF (Hepatocyte growth factor), certains FGFs (Fibroblast growth factor) ou le TGFβ1 (Transforming growth factor beta 1) (Grandclement et al., 2011; Sulpice et al., 2008; West et al., 2005).

De plus, les neuropilines peuvent être affectées par des modifications post-traductionnelles (impliquant des groupements glycosaminoglycanes, héparane sulfate, chondroïtine sulfate et acide polysialique, ainsi que des N-glycosylations) (Pellet-Many et al., 2008; Rey-Gallardo et al., 2010).

### **3.1.2. Plexines**

Les plexines sont des récepteurs transmembranaires très conservés qui régulent une grande variété de mécanismes cellulaires. Les sémaphorines interagissent directement avec ces récepteurs, sauf les SEMA3 qui nécessitent la fixation aux neuropilines. Neuf membres répartis en quatre familles ont été décrits chez les vertébrés : plexine-A(1-4), plexine-B(1-3), plexine-C1 et plexine-D. Ces récepteurs possèdent des structures similaires entre eux et des séquences communes avec leurs interactants comme les sémaphorines. Coté extracellulaire, on trouve notamment un domaine sema (environ 600 acides aminés), des répétitions du domaine PSI et du domaine IPT (immunoglobulin-plexin-transcription) qui tient son nom du fait que les plexines présentent des homologies de structure avec les immunoglobulines et certains facteurs de transcription (Bork et al., 1999). Le domaine intracellulaire est sous-divisé en trois segments C1, C2 et V1. Ces segments sont très importants d'un point de vue fonctionnel et signalétique puisqu'ils contiennent des domaines RBD (Rho GTPase binding domain) et qu'ils permettent aux plexines d'agir comme des GAPs. En effet, les domaines C1 et C2 sont responsables de l'inhibition de l'activité de certaines RhoGTPase comme R-Ras ou RhoA. Dans le cas de la plexine-B1, l'inhibition de R-Ras par l'activité GAP est responsable de l'activation de PTEN et de la répulsion axonale de neurones de l'hippocampe (Oinuma et al., 2010). Le domaine V1 va permettre aux plexines A1 et B1 d'interagir avec d'autres Rho GTPases, telles que Rac, Rnd1 ou

RhoD (Oinuma et al., 2004). D'autres motifs spécifiques sont retrouvés en fonction de la plexine considérée. Par exemple, la plexine-A1 arbore une séquence de trois acides aminés (lysine-arginine-lysine) qui s'associe avec la protéine FARP2 (FERM domain containing GEF), responsable, de façon indirecte, de l'effet répulsif de la SEMA3A sur les neurones (Toyofuku et al., 2005). Les plexines-B contiennent un domaine PDZ (acides aminés thréonine-aspartate-leucine) qui permet l'interaction avec les protéines PDZ-RhoGEF et LARG (Leukemia associated RhoGEF) (Aurandt et al., 2002; Perrot et al., 2002) (Figure 10).

### 3.1.3. Autres co-récepteurs à activité tyrosine kinase

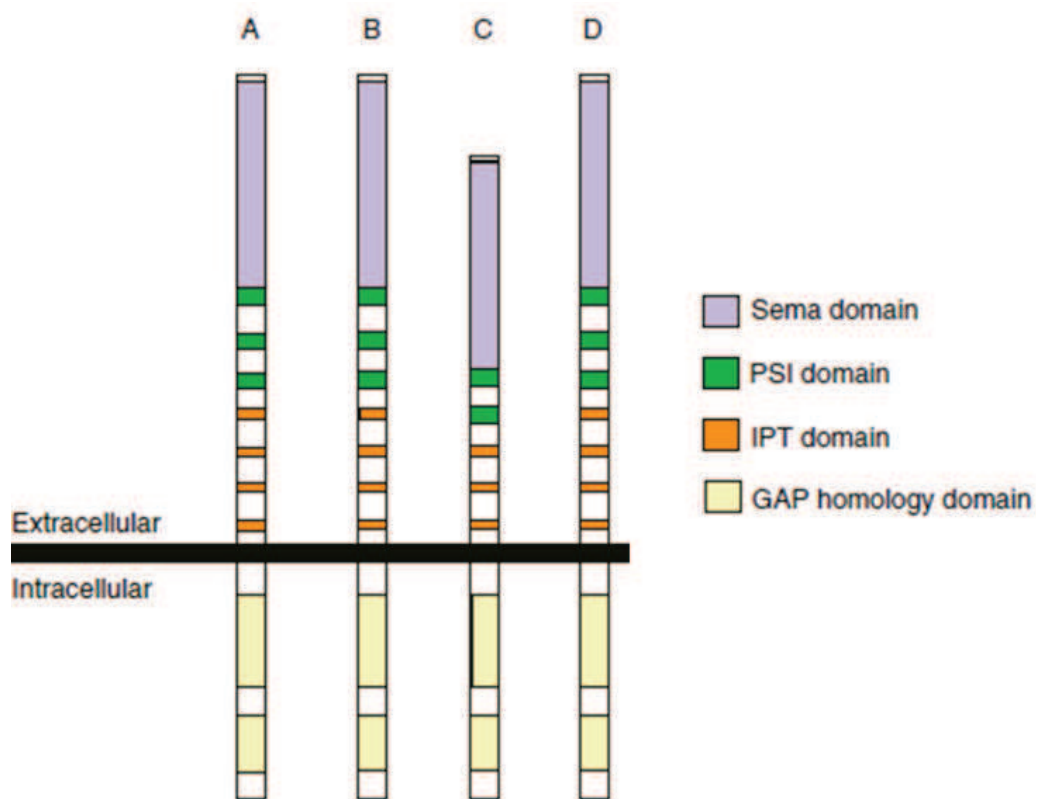
Après liaison d'une sémaphorine à ses récepteurs neuropilines et/ou plexines, d'autres RTKs peuvent être recrutés et participer à la signalisation SEMA-induite. C'est notamment le cas des RTKs OTK, Met, ErbB-2 et VEGFR-2.

**OTK** (Off-track) est une glycoprotéine 60 kDa qui peut interagir avec les plexines A, et qui possède un rôle dans la signalisation induite par la sema1-a (présente chez les invertébrés) (Whitford and Ghosh, 2001). Néanmoins, ce RTK apparent ne possède pas d'activité tyrosine kinase fonctionnelle à cause d'une mutation constitutive. Il agirait en réalité comme un recruteur d'autres protéines kinases telles les Rho GTPases pour médier la signalisation de sema1-a chez la drosophile ou celle de la sema6D chez le poulet (Toyofuku et al., 2004).

**Met** est un RTK fonctionnel qui possède un domaine sema, une séquence PSI, un domaine IPT et un domaine immunoglobulin-like. Ce RTK fixe le HGF (Hepatocyte growth factor), via une probable interaction entre le domaine sema du HGF et le domaine Ig-like de Met (Basilico et al., 2008). L'association de Met avec la plexine B1 est nécessaire pour médier la signalisation de la SEMA4D, impliquée dans la migration des neurones exprimant la GnRH-1 (gonadotropin hormone-releasing hormone-1) (Giacobini et al., 2008).

**ErbB-2** (ou HER-2) est un RTK qui fixe différents facteurs de croissance tels le EGF, le TGF $\alpha$ , la bétacelluline ou encore la neuréguline. Dans le cancer du sein, l'association d'ErbB2 avec la plexine-B1 est de mauvais pronostic, et favorise le développement de métastases (Worzfeld et al., 2012).

Le **VEGFR-2** (KDR/Flk1) est le récepteur majeur du VEGF-A. Durant le développement du système nerveux, le VEGFR-2 est indispensable à la neurogenèse et à la croissance axonale (Raab and Plate, 2007). Certains de ces processus sont médiés par le VEGFR-2 en réponse à la SEMA3E. En effet, la stimulation par la SEMA3E de cellules HEK293T induit la formation d'un complexe plexine D1/NRP-1/VEGFR-2 qui conduit à la phosphorylation du récepteur au VEGF et à l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt nécessaire à la croissance axonale (Bellon et al., 2010).



**Figure 10 : Structure des quatre sous-familles de plexines.**

Coté extracellulaire, les plexines présentent un domaine sema, des répétitions des domaines PSI et IPT. Coté intracellulaire, on trouve des sites de liaison aux RhoGTPases, ainsi que des domaines GAPs. (Yazdani and Terman, 2006)

Un autre récepteur du VEGF, le **VEGFR-1** (Flt-1), est capable d'interagir avec NRP-2, lorsque ces deux récepteurs sont transfectés dans des cellules endothéliales aortiques de porc (Gluzman-Poltorak et al., 2001). Dans la lignée tumorale colorectale HCT-116, dans laquelle le VEGFR-1 est le seul VEGFR exprimé, l'inhibition de l'expression de NRP-2 induit une diminution de l'activation du VEGFR-1, rendant ainsi les cellules plus sensibles à l'apoptose (Gray et al., 2008).

### **3.2. Partenaires intracytoplasmiques et effecteurs**

#### **3.2.1. Protéines tyrosine kinases intracellulaires**

En plus des quelques co-récepteurs qui vont moduler la réponse cellulaire aux sémaphorines, certaines protéines cytoplasmiques, principalement des tyrosine kinases, sont aussi impliquées dans la signalisation sous-jacente. Parmi celles-ci, on trouve les protéines Fyn et Src qui s'associent aux plexines après stimulation par une sémaphorine.

La kinase **Fyn** est capable de s'associer aux plexines-A (Sasaki et al., 2002). Le rôle fonctionnel de Fyn en réponse à la SEMA3A semble être d'activer la cascade de phosphorylation initiée par la Cdk5, impliquée dans la modulation de la dynamique du cytosquelette (Yamashita et al., 2007). Lors du développement du cervelet, la kinase Fyn est essentielle à la signalisation induite par la SEMA3A pour opérer une parfaite arborisation axonale (Cioni et al., 2013).

La kinase **Src**, quant à elle s'associe préférentiellement avec la plexine B1 (Basile et al., 2005). Durant la mise en place du système nerveux, Src est responsable de la mise en place des commissures, qui sont des points de jonction entre certaines zones du cerveau. En effet, dans les neurones commissuraux antérieurs, la SEMA3B active Src et les axones commissuraux sont attirés par cette sémaphorine ; tandis que pour les neurones commissuraux postérieurs, l'activation de SRC n'est pas retrouvée et la SEMA3B exerce alors un effet répulsif sur les axones de ces neurones (Falk et al., 2005).

#### **3.2.2. CRMPs**

Les protéines CRMPs (collapsin response mediator protein, aussi connues sous le terme de Unc-33-like proteins (Ulip), dihydropyrimidinase-related proteins (DRP) ou TUC (TOAD/Ulip/DRP)), et particulièrement CRMP2, ont été identifiées comme des protéines cytosoliques de 62 kDa surexprimées durant la neurogenèse, et parallèlement comme les médiateurs et effecteurs centraux de la signalisation de la SEMA3A (Goshima et al., 1995). Cette protéine participe à la différenciation neuronale et sa séquence codante est proche du gène *unc-33* de *C. elegans*, codant pour une

protéine elle-même impliquée dans la croissance axonale (Minturn et al., 1995). De manière générale, les CRMPs sont impliquées dans la navigation, l'élongation et la spécification axonale.

Cinq gènes codant les CRMPs (*CRMP1-5*) ont été identifiés chez les vertébrés. Les quatre premiers membres (*CRMP1-4*) possèdent une homologie de séquence d'environ 75% entre eux, et de seulement 50% par rapport à *CRMP5*. Dans le cerveau, ces isoformes interagissent entre-elles via la formation de complexes hétérotétramériques, avec des affinités variables de certaines isoformes pour d'autres (Wang and Strittmatter, 1997). Leur domaine C-terminal présente des caractéristiques communes à celui des protéines liant la tubuline telles que tau et MAP (microtubule-associated protein) (Stenmark et al., 2007).

C'est d'ailleurs en tant que modulateurs-clés de la dynamique du cytosquelette que sont majoritairement décrites les CRMPs. Par exemple, il est démontré que *CRMP2* lie la tubuline *in vitro* et *in vivo* dans le cerveau, et plus précisément qu'il favorise l'assemblage des hétérodimères de tubuline entre eux, permettant ainsi la croissance axonale (Fukata et al., 2002). Ainsi, le signal de rétractation axonale induit par la *SEMA3A* serait dû à une altération de la dynamique des microtubules imputable aux protéines CRMPs. En effet, les CRMPs peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui vont réguler les interactions avec leurs partenaires. Outre la désamination, l'oxydation ou l'o-glycosylation, c'est la phosphorylation de nombreux résidus présents au niveau de la partie C-terminale qui est la mieux caractérisée. De nombreuses études rapportent que le statut de phosphorylation des CRMPs est modifié en fonction des stimuli et des interactants, afin de réguler leur affinité pour la tubuline. Ces mécanismes abordés dans le paragraphe suivant traitant de la signalisation induite par la *SEMA3A* et ses conséquences sur la migration cellulaire.

Néanmoins, le rôle des CRMPs n'est pas restreint à la signalisation induite par la *SEMA3A*. En effet, l'acide lysophosphatidique ainsi que l'éphrine A5 sont aussi capables d'induire la rétraction axonale de façon CRMP-dépendante, en faisant intervenir la Rho kinase (Arimura et al., 2005).

De plus, certaines études suggèrent que l'ARNm des CRMPs est sujet à l'épissage alternatif, aboutissant ainsi à l'ajout d'une séquence en N-terminal de la protéine (forme longue des CRMPs, ou LCRMPs) (Leung et al., 2002). Sur le plan de la biologie tumorale, cette séquence est importante puisqu'elle lui permettrait d'interagir avec le cytosquelette et de promouvoir la migration cellulaire (Morgan-Fisher et al., 2013). De plus, LCRMP1 est associée à un mauvais pronostic et à l'apparition de métastases chez des patients atteints de tumeurs pulmonaires (Pan et al., 2010). Il semble donc que ces différentes formes d'épissage présentent des rôles opposés dans la régulation de la migration des cellules tumorales. De plus, les effets pro-tumoraux de LCRMP1 peuvent être inversés par *CRMP1* (Pan et al., 2011). Une étude plus récente du même groupe montre que l'augmentation des propriétés invasives de cellules tumorales pulmonaires par LCRMP-1 est dépendante de sa phosphorylation par GSK-3 $\beta$  (Wang et al., 2012).

La forme non-épissée des CRMPs est aussi impliquée dans la progression tumorale. Par exemple, l'expression de la protéine CRMP4 est associée au développement métastatique dans le cancer pancréatique (Hiroshima et al., 2012). De la même façon, CRMP5 est décrit comme un marqueur spécifique des carcinomes neuroendocrines de haut grade (Meyronet et al., 2008).

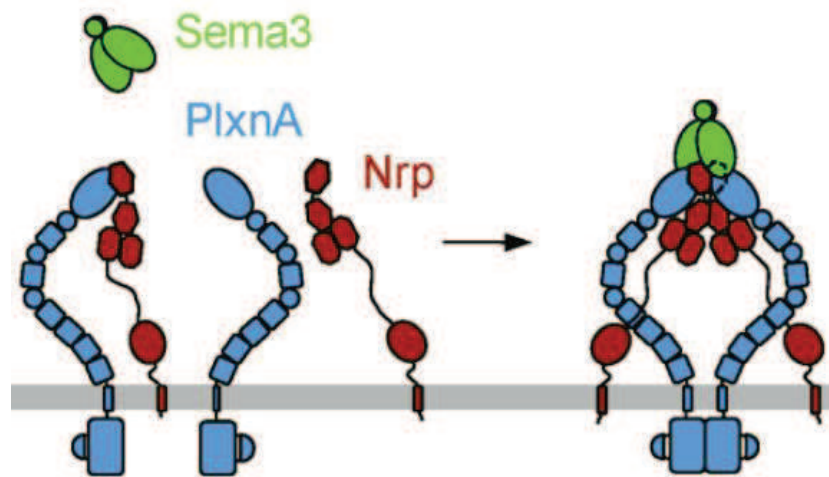
### **3.3. Signalisation de l'axe SEMA3/Neuropiline/Plexine/CRMP : effets sur la migration cellulaire**

La fixation de la SEMA3A au domaine a1 de NRP-1 va induire la dimérisation de la sémaphorine et la formation d'un complexe SEMA3A/NRP-1/plexine-A, lequel regroupe la SEMA3 dimérisée, deux NRP-1 et deux copies de plexine-A. Les deux neuropilines permettent de maintenir une fragile interaction entre la SEMA3 et la plexine (Janssen et al., 2012) (Figure 11). De façon plus précise, il semble que le clivage de la SEMA3A par une furine est indispensable à la fixation au domaine a1 de NRP-1. La fixation à NRP-1 fait en réalité intervenir deux domaines de la SEMA3A : le domaine C-terminal qui lie le domaine b1 de la neuropiline, ainsi que le domaine sema qui lie le domaine a1 (Guo et al., 2013). La dimérisation de la sémaphorine induit ensuite un changement conformationnel de la plexine qui favorise l'activité GAP du récepteur (Wang et al., 2013). Les mécanismes aboutissant à l'activation complète de la plexine sont complexes et font intervenir la protéine MICAL et différentes GTPases (Hung and Terman, 2011; Püschel, 2007).

Après activation, la plexine va ensuite recruter une protéine CRMP, ainsi que des kinases comme Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5), GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3- $\beta$ ) et Fyn ou encore Fes (Yamashita and Goshima, 2012). Ces kinases sont capables de phosphoryler plusieurs résidus de la région C-terminale des CRMPs et constituent donc d'importants médiateurs de la signalisation induite par la SEMA3A (Mitsui et al., 2002; Sasaki et al., 2002) (Figure 12).

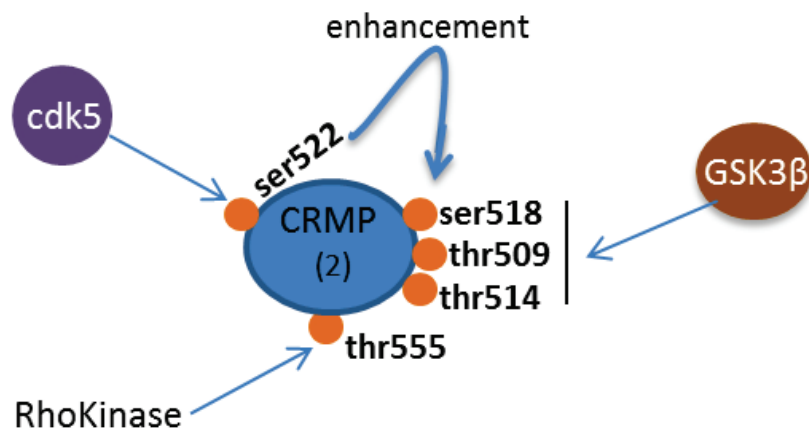
En effet, la co-expression de Fes et de la plexine-A1 induit la contraction des cellules COS (modèle non neuronal), suggérant ainsi que les plexines pourraient être activées en absence de SEMA3A. De façon intéressante, NRP-1 est capable de bloquer l'interaction plexine-A1/Fes, blocage réversible par SEMA3A (Mitsui et al., 2002).

De plus, les plexines-A sont constitutivement liées à la kinase Fyn et la stimulation par la SEMA3A entraîne l'activation de cette kinase Fyn, qui permet le recrutement de Cdk5 et l'activation de son activité kinase. Les protéines CRMP1, 2, 4 et 5 sont toutes phosphorylées par Cdk5 au niveau de la sérine 522 en réponse à la SEMA3A (Uchida et al., 2005). La kinase Fyn est aussi capable de phosphoryler CRMP2 au niveau de la tyrosine 32 (Uchida et al., 2009), ainsi que CRMP1 au niveau de la tyrosine 504 (Buel et al., 2010)



**Figure 11 : Modèle d'interaction entre une sémaphorine de classe 3 et ses récepteurs.**

La liaison d'une sémaphorine de classe 3 permet de stabiliser l'interaction entre une neuropiline et une plexine, puis de recruter un second couple plexine-neuropiline. La formation de ce complexe permet l'activation de la plexine. (Janssen et al., 2012)



**Figure 12 : Modulation de l'état de phosphorylation des protéines CRMPs :  
exemple de CRMP2.**

La protéine CRMP2 est phosphorylée par cdk5 au niveau de la sérine 522. Cette phosphorylation est nécessaire pour permettre celle de GSK3 $\beta$  sur les résidus sérine 518, thréonine 509 et 514. Le résidu thréonine 555 est phosphorylé indépendamment par la Rho kinase. Ces phosphorylations induisent une diminution des capacités des CRMPs à lier la tubuline.



La phosphorylation par Cdk5 est nécessaire pour que s'opèrent les phosphorylations suivantes, par GSK-3 $\beta$ , au niveau des résidus sérine 518, thréonines 509 et 514 (décrites seulement pour CRMP2 et 4) (Brown et al., 2004; Tan et al., 2013).

Les CRMPs sont connues pour intervenir dans le transport des dimères de tubuline durant la croissance des microtubules, notamment en liant certaines MAPs (microtubule-associated proteins) telles que la dynéine, la kinésine ou la protéine Numb (Arimura et al., 2009; Fukata et al., 2002; Kawano et al., 2005).

Ces phosphorylations de CRMPs semblent responsables d'une diminution de l'affinité des CRMPs pour les hétérodimères de tubuline, et donc de l'altération de la dynamique des microtubules. En effet, la phosphorylation de CRMP2 sur la thréonine 514 par GSK-3 $\beta$  induit une baisse de sa liaison à la tubuline. Au contraire, une forme de CRMP2 non-phosphorylable au niveau de la thréonine 514 promeut la croissance neuronale (Yoshimura et al., 2005).

#### **4. Rôles biologiques des sémaphorines**

Chez les vertébrés, la première sémaphorine (SEMA3A) est découverte en 1993 pour son rôle dans le collapse des cônes de croissance d'axones sensoriels chez le poulet. Son rôle a donc naturellement été initialement renseigné dans les mécanismes de guidage axonal. Puis son importance a été décrite, entre autres, dans le système immunitaire, ainsi qu'en pathologie tumorale.

##### **4.1. Guidage axonal**

Le terme de guidage axonal regroupe les phénomènes et mécanismes mis en jeu pour permettre aux axones émis par les neurones de trouver leurs cellules cibles, que ce soit dans un contexte développemental ou dans un cas de repousse axonale suite à une lésion. La plupart des données renseignant le rôle des sémaphorines dans le guidage axonal proviennent de modèles de souris invalidées pour le gène de la SEMA3A.

Dans ces souris déficientes pour la SEMA3A, les projections neuronales de certains nerfs périphériques (spinaux et du système nerveux sympathique) sont totalement désorganisées (Taniguchi et al., 1997). Décrites initialement comme des protéines de répulsion axonale, les sémaphorines se sont ensuite révélées comme des molécules bifonctionnelles avec des rôles de répulsion et d'attraction (Polleux et al., 2000). Lors du développement du système nerveux, certaines sémaphorines de classe 3 ont une action essentiellement répulsive, et permettent aux neurones migrant exprimant les récepteurs adéquates de ne pas se retrouver dans un endroit inapproprié. Par exemple, dans le cerveau embryonnaire, les interneurons GABAergiques doivent atteindre le cortex

sans coloniser le striatum. Pour ce faire, le striatum exprime et sécrète les SEMA3A et 3F pour repousser ces interneurons (Marín et al., 2001). Néanmoins, certains membres sont aussi capables d'exercer des effets doubles. C'est notamment le cas de la SEMA3D qui agit comme un chimioattractant ou un chimiorépulsif en fonction des neuropilines exprimées par les axones cibles. En effet, des neurones exprimant seulement NRP-1 seraient repoussés par la SEMA3D, tandis que ceux exprimant NRP-1 et NRP-2 seraient attirés par celle-ci (Wolman et al., 2004).

D'autres modèles de souris KO ont permis de détailler le rôle d'autres sémaphorines et de leurs récepteurs dans le guidage axonal. C'est le cas des souris déficientes pour la SEMA3F qui présentent des défauts de développement du système limbique ou encore des souris déficientes pour NRP-2 qui présentent des aberrations développementales au niveau des nerfs crâniens et de la commissure antérieure (Chen et al., 2000; Sahay et al., 2003).

#### 4.2. Système immunitaire

En plus de leurs rôles dans la mise en place du système nerveux via le guidage axonal, certaines sémaphorines possèdent aussi un rôle dans l'immunité. Ces sémaphorines sont appelées « sémaphorines immunes » et regroupent 4 membres décrits, **SEMA4D**, **SEMA4A**, **SEMA6D** et **SEMA7A**, dont les actions sont cruciales dans les phénomènes de réponse immunitaire, de l'initiation de la réponse aux processus finaux d'inflammation.

Cette fonction immunitaire a d'abord été décrite dans les lymphocytes B. En effet, ces cellules expriment constitutivement la **SEMA4D** à un faible niveau basal (Delaire et al., 1998). En dépit de ce faible niveau d'expression, la SEMA4D va être surexprimée en réponse à différents stimuli immunitaires comme l'exposition au lipopolysaccharide (LPS) (Kumanogoh et al., 2000). Cette activité biologique est retrouvée chez l'homme et la souris : l'expression exogène de SEMA4D dans des lymphocytes B humains induit l'agrégation et la survie de ces derniers (Hall et al., 1996), tandis que les souris recombinantes pour cette sémaphorine présentent une prolifération exacerbée des lymphocytes B stimulés par le LPS (Kumanogoh et al., 2000). Contrairement au système nerveux où la SEMA4D se lie à la plexine B1, cette dernière se lie au récepteur CD72 dans le cas d'interaction entre cellules lymphoïdes. CD72 phosphorylé fonctionne comme un régulateur négatif des lymphocytes B (Adachi et al., 2001). La liaison de la SEMA4D à CD72 va bloquer sa phosphorylation et lever la régulation négative des cellules B.

Contrairement à la SEMA4D qui agit sur les lymphocytes B, la **SEMA4A** va moduler directement la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T. Ces cellules expriment constitutivement la SEMA4A qui est surexprimée lors d'une stimulation des lymphocytes T (Kumanogoh et al., 2002). D'autre part, la SEMA4A est aussi exprimée par les cellules dendritiques (cellules présentatrices

d'antigènes), et plusieurs études montrent que cette sémaphorine contribue à l'activation des lymphocytes T via des interactions entre lymphocytes T et cellules dendritiques (Kumanogoh et al., 2002, 2005).

Une autre sémaphorine, la **SEMA6D**, régule plus spécifiquement la fonction des cellules dendritiques. En effet, la stimulation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse par de la SEMA6D recombinante induit la production de cytokines comme l'interleukine-12 (IL-12), qui favorise ensuite la production d'interféron-gamma et de TNF- $\alpha$  par les cellules NK (natural killer). Cette production d'IL-12 est dépendante de la liaison de la SEMA6D à la plexin-A1 puisque des cellules dendritiques déficientes pour la plexine-A1 présentent une activité atténuée en réponse à la SEMA6D (Takegahara et al., 2006).

La **SEMA7A** intervient dans les phases plus tardives de l'immunité médiée par les lymphocytes T (activation des macrophages par les lymphocytes T effecteurs). Cette SEMA7A est exprimée par les lymphocytes T activés et va stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages via l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  présente sur ces cellules. De ce fait, les souris déficientes pour la SEMA7A ne présentent pas de réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T (Suzuki et al., 2007). Une autre étude *in vitro* montre que la SEMA7A est capable d'attirer les monocytes par chimioattraction, de façon beaucoup plus efficace que les chimiokines canoniques (Monocyte Chemoattractant Protein 1, par exemple) (Holmes et al., 2002).

De façon intéressante, certaines de ces sémaphorines immunes sont aussi impliquées en cancérologie. La plupart des données existantes à ce propos concernent le SEMA4D dont l'expression corrèle avec la progression et la présence de métastases dans les adénocarcinomes pancréatiques. Cette sémaphorine n'est pas exprimée par les cellules tumorales mais par les lymphocytes T et B présents dans le stroma tumoral, pointant au passage le rôle potentiellement déterminant du stroma dans le développement tumoral (Kato et al., 2011). Dans un modèle murin de tumeur mammaire, elle est retrouvée dans les macrophages infiltrant la tumeur (Sierra et al., 2008). Des données plus anciennes prouvent que la SEMA3D inhibe la croissance des lymphocytes, dénotant ainsi une dualité pro- et anti-tumorale des sémaphorines en général (section 4.3) (Dorfman et al., 1998).

### **4.3. Biologie tumorale**

En plus des fonctions des sémaphorines dans le développement du système nerveux et dans la réponse immunitaire, un rôle de ces protéines dans les processus tumoraux a été mis en évidence à la fin des années 1990-début des années 2000. En 1996, une équipe constate que le gène de la SEMA3B est localisé sur le chromosome 3p21.3, région dont la délétion est fréquente dans un certain type de tumeurs pulmonaires (Sekido et al., 1996). Cinq ans plus tard, le même groupe montre que la

réexpression de la SEMA3B inhibe la croissance et induit l'apoptose dans un modèle cellulaire de tumeurs pulmonaires (Tomizawa et al., 2001). Les sémaphorines commencent alors à être qualifiées de « gènes suppresseurs de tumeurs ». Néanmoins, ce rapprochement entre sémaphorines et suppresseurs de tumeurs tend à disparaître au vu de la dualité fonctionnelle de ces protéines vis-à-vis des mécanismes tumoraux. En effet, il existe des sémaphorines pro- ou anti-tumorales. Certaines peuvent être pro- et anti-tumorales selon le type tumoral considéré ou selon les partenaires membranaires avec lesquelles elles interagissent.

Néanmoins, les mécanismes signalétiques induits par les sémaphorines et aboutissant à la modulation du cytosquelette (via les protéines CRMPs) dans les cellules neuronales n'ont pas été extrapolés, ni clairement décrits dans un modèle cellulaire non neuronal. Cependant, ces mécanismes pourraient être en partie semblables. En effet, la transfection simultanée de la SEMA3A, de la plexine-A1 et des CRMPs dans des cellules non neuronales (COS-7) montre que ces trois acteurs sont capables d'interagir ensemble et d'induire la rétraction de ces cellules (Deo et al., 2004).

#### **4.3.1. Sémaphorines pro-tumorales**

Même si les sémaphorines ont longtemps été considérées comme une nouvelle classe de gènes suppresseurs de tumeurs, de nombreuses études ont depuis mis en lumière la fonction pro-tumorale de certains membres de cette superfamille. Deux membres des sémaphorines sont considérés comme clairement pro-tumoraux : la SEMA6D et la SEMA5A.

La **SEMA6D** est une protéine ancrée à la membrane. Dans un modèle cellulaire de mésothéliome, la fixation de la SEMA6D à la plexine-A1 conduit au recrutement et à l'activation du VEGFR-2, induisant une réponse pro-angiogénique comparable à celle induite par le VEGF (Catalano et al., 2009). De plus, une forte expression de la SEMA6D est retrouvée dans les cancers gastriques, dans lesquels elle semble associée à l'angiogenèse (Zhao et al., 2006).

La **SEMA5A** est aussi ancrée à la membrane cellulaire, et elle utilise la plexine-A3 comme récepteur. Une surexpression de ce membre a été rapportée dans des carcinomes pulmonaires non à petites cellules, ainsi que des tumeurs pancréatiques et gastriques (Lu et al., 2010; Sadanandam et al., 2010). Plus récemment, il a été démontré que le fragment extracellulaire de la SEMA5A était bien responsable de l'inhibition de la croissance tumorale, mais, de façon intrigante, entraînait simultanément une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales et l'apparition de métastases. Les auteurs suggèrent que cette ambiguïté fonctionnelle pourrait s'expliquer par le fait que la SEMA5A soluble fixerait la plexine-B3, également exprimée par les cellules utilisées dans l'étude. Cette interaction induirait une boucle de régulation autocrine impliquant la phosphorylation de ERK et favorisant l'apparition de métastases (Sadanandam et al., 2012).

#### 4.3.2. Sémaphorines anti-tumorales

A l'exception de la SEMA3E (dont la dualité fonctionnelle est abordée dans la partie suivante), les sémaphorines de classe 3 possèdent majoritairement des propriétés anti-tumorale et anti-angiogénique. En effet, et de manière générale, les SEMA3 sont inversement corrélées à l'agressivité dans de nombreuses pathologies tumorales comme celles affectant le sein ou le système nerveux (Sabag et al., 2012; Staton et al., 2011; Zhou et al., 2012c).

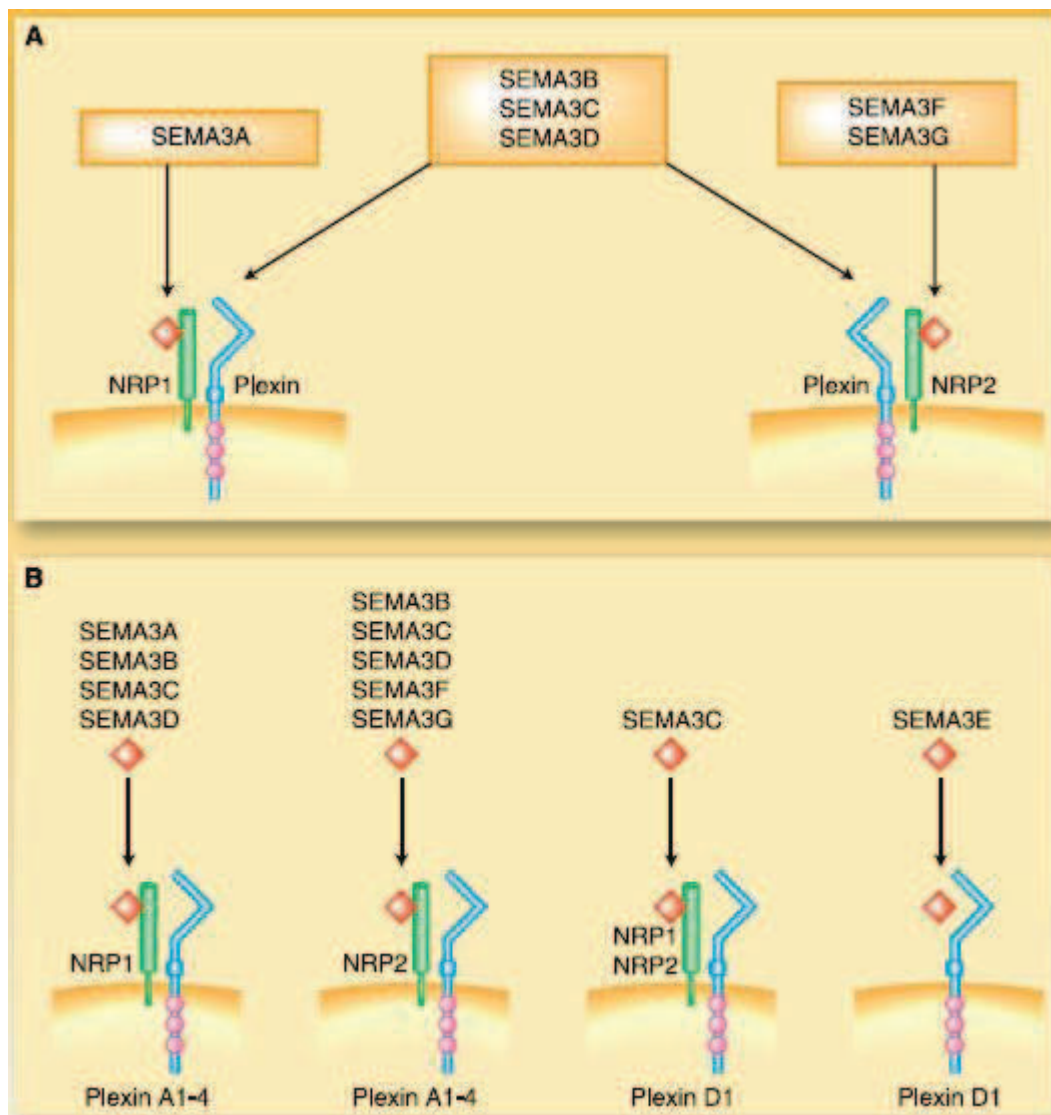
L'implication des sémaphorines de classe 3 en cancérologie sera détaillée dans la section 5, notamment à travers les exemples de deux de ces membres les mieux décrits, la SEMA3A et la SEMA3F.

#### 4.3.3. Cas particuliers : dualité pro- et anti-tumorale

Certaines sémaphorines ont un rôle ambivalent par rapport à la progression tumorale. En effet, la SEMA4D et la SEMA3E peuvent induire des signaux pro-tumoraux et/ou anti-tumoraux en fonction du système tumoral considéré, ainsi que des partenaires auxquels elles s'associent.

La **SEMA4D** est transmembranaire et son domaine extracellulaire peut être clivé par la métalloprotéinase matricielle MT1 (membrane type 1), surexprimée dans de nombreuses cellules tumorales (Strongin, 2010). Cette forme clivée et soluble conserve les caractéristiques fonctionnelles de la SEMA4D entière et promeut l'angiogenèse et la progression tumorale de carcinomes à cellules squameuses, et ce de façon dépendante de sa fixation à la plexine-B1 (Basile et al., 2004). Le même groupe montre que cette sémaphorine est sous le contrôle de HIF-1 $\alpha$  et favorise l'angiogenèse de concert avec le VEGF ainsi que la croissance tumorale (Zhou et al., 2012a, 2012b). Dans d'autres contextes, la SEMA4D fixe les plexines-B1 et -B2, ce qui entraîne la formation d'un complexe avec le RTK ErbB-2 (erythroblastic leukaemia viral oncogene homologue 2). C'est le cas dans les tumeurs du sein, où ce complexe favorise la migration des cellules et le développement de métastases. De façon surprenante, l'association du complexe SEMA4D-Plexin-B avec Met (un autre RTK) conduit à une inhibition de la migration (Swiercz et al., 2008). Ces données éclairent sur l'extrême complexité des interactions entre les sémaphorines et leurs récepteurs, où la présence ou l'absence d'un interactant particulier peut inverser une réponse cellulaire.

Un autre exemple de cette dualité fonctionnelle est celui de la **SEMA3E**, qui lie la plexine-D1 (Figure 13). En effet, certaines études montrent que la SEMA3E est anti-tumorale, notamment dans des cellules de mélanomes où elle diminue la dissémination métastatique *in vivo* (Roodink et al., 2008). Plus récemment, il a été démontré que la SEMA3E inhibe l'angiogenèse en fixant la plexine-D1 : cette interaction résulte en la déstructuration des points focaux d'adhésion initiés par



**Figure 13 : Les sémaphorines de classe 3 et leurs récepteurs.**

Les sémaphorines de classe 3 lient les neuropilines et les plexines. Chaque sémaphorine 3 a une affinité spécifique pour l'une ou l'autre des neuropilines. Certains membres peuvent lier les deux neuropilines (A). L'association avec une plexine est aussi dépendante de la sémaphorine 3 considérée. A noter, le cas particulier de la sema3E qui lie directement la plexine D1. (Gaur et al., 2009)

les intégrines (via la protéine Arf6), conduisant ainsi à la rétractation des filopodes endothéliaux et à une moindre mobilité des cellules endothéliales (Sakurai et al., 2010). Par opposition à ces données, l'étude de Christensen montre, en 2005, que la SEMA3E présente des propriétés pro-tumorales après clivage par des convertases de pro-protéines de la famille des furines (Christensen et al., 2005). A noter que ce type de convertases est fréquemment surexprimé dans les carcinomes et cellules métastatiques (Artenstein and Opal, 2011; Bassi et al., 2005). Deux autres études de Casazza précise le rôle pro-tumorale de la SEMA3E : cette sémaphorine est clivée par la furine, puis lie la plexine-D1, recrute ErbB-2 et engendre une augmentation de l'invasion, de la migration transendothéliale et du potentiel métastatique des cellules tumorales. Les auteurs ont alors développé une forme non clivable de la SEMA3E qui ne permet pas le recrutement de ErbB2, résultant en un fort effet anti-tumoral de cette forme clivée (Casazza et al., 2010, 2012).

Même si de nombreuses études suggèrent fortement un effet pro-tumoral du clivage de certaines sémaphorines par les furines, on ne peut absolument pas généraliser ce concept puisque, là encore, on trouve une exception. En effet, le fragment extracellulaire soluble de la SEMA6A semble être un inhibiteur de l'angiogenèse, lui suggérant un rôle d'inhibiteur de la progression tumorale (Dhanabal et al., 2005).

## 5. Implication des sémaphorines de classe 3 et de leurs récepteurs en pathologie tumorale

### 5.1. Les sémaphorines de classe 3

Globalement, l'expression des sémaphorines de classe 3 est inversement corrélée à la progression tumorale, mis à part la SEMA3E (qui semble à la fois pro- et anti-tumorale) et la SEMA3C (dont les rares études rapportent un effet pro-tumoral) (Tableau 6). La fixation à une neuropiline ou à une plexine varie en fonction de la SEMA3 considérée (Figure 13).

Comme détaillé précédemment, ce sont les SEMA3A et 3F qui sont les mieux décrites à ce jour, tant sur la plan des effets biologiques, que de la signalisation intracellulaire. Néanmoins, si les signalisations induites sont bien décrites dans le système nerveux, peu de données sont disponibles à ce sujet pour les cellules tumorales. Les études portant sur les sémaphorines de classe 3 et sur leur rôle dans la tumorigenèse et la progression tumorale décrivent, dans la plupart des cas, les effets fonctionnels des sémaphorines, sans véritablement renseigner sur les signalisations sous-jacentes, particulièrement sur l'implication de l'axe SEMA3/NRPs/plexine/CRMPs (mis à part les quelques études concernant les LCRMPs).

Les premières mises en évidence du rôle potentiel de la **SEMA3A** dans la pathologie tumorale datent des années 2000. En effet, une étude s'intéressant à la relation entre microenvironnement et cellules

Gène	Variation - Cancer
<b>SEMA3A</b>	Diminution - Sein Diminution - Méningiome Diminution - Mésothéliome
<b>SEMA3B</b>	Perte et diminution - Poumon Diminution - Mélanome Diminution - Foie Diminution - Sein Diminution - Ovaire
<b>SEMA3C</b>	Augmentation - Poumon Augmentation - Ovaire Augmentation - Sein Augmentation - Gliome Augmentation - Estomac
<b>SEMA3D</b>	Diminution - Gliome
<b>SEMA3E</b>	Augmentation - Sein Diminution - Mélanome Augmentation - Côlon, Rectum Augmentation - Ovaire
<b>SEMA3F</b>	Perte et diminution - Poumon Diminution - Ovaire Diminution - Sein Diminution - Prostate Diminution - Vessie Diminution - Mélanome
<b>SEMA3G</b>	Perte - Mésothéliome

Gène	Variation - Cancer
<b>NRP1</b>	Augmentation - Sein Augmentation - Poumon Augmentation - Foie
<b>NRP2</b>	Augmentation - Pancréas Augmentation - Poumon Augmentation - Ovaire
<b>PLEXINE-A1</b>	Diminution - Sein
<b>PLEXINE-A2</b>	Augmentation - Sein
<b>PLEXINE-A3</b>	Diminution - Sein Diminution - Ovaire
<b>PLEXINE-A4</b>	Mutation - Mélanome
<b>PLEXINE-D1</b>	Augmentation - Mélanome Augmentation - Côlon, Rectum Augmentation - Col de l'utérus

**Tableau 6 : Variation d'expression des sémaphorines de classe 3 et de leurs récepteurs dans différents cancers.**

Mis à part les cas particuliers des sema 3C et 3E, l'expression des sémaphorines de classe 3 est inversement corrélée à la progression tumorale. Pour les neuropilines, une augmentation de leur expression est associée à la progression tumorale. Pour les plexines, la situation est variable en fonction du membre considéré.



nerveuses montrent que la balance SEMA3A/VEGF module la migration de certains progéniteurs neuronaux via la liaison à un récepteur commun, le VEGFR-1 (Bagnard et al., 2001). Les études se concentrent donc ensuite sur le rôle de la SEMA3A dans les mécanismes régulés par le VEGF. Par exemple, les travaux de Catalano *et al.*, en 2004, confirment le rôle de la SEMA3A dans le rétrocontrôle négatif de la prolifération induite par le VEGF dans des cellules mésothéliales normales et tumorales (Catalano et al., 2004). Par la suite, et étant donné que les SEMA3 et certaines isoformes du VEGF entrent en compétition pour la liaison aux neuropilines, beaucoup d'études se sont intéressées à la modulation de l'angiogenèse tumorale par la SEMA3A (Appleton et al., 2007). Sur le plan développemental, les SEMA3A et 3F agissent de façon concertée pour inhiber l'angiogenèse, via l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales (Guttman-Raviv et al., 2007). La SEMA3A contrôle la mobilité endothéliale en modulant l'activation de certaines intégrines et ainsi l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire (Serini et al., 2003). Sur le plan pathologique, différents modèles animaux (notamment le modèle RIP-Tag2) confirme l'implication des SEMA dans l'angiogenèse tumorale. Dans ce modèle, la réexpression de la SEMA3A induit une diminution de la vascularisation tumorale (Maione et al., 2009). Dans d'autres modèles murins, l'injection systémique de SEMA3A diminue l'angiogenèse et la croissance tumorale (Casazza et al., 2011). De plus, l'injection conjointe de SEMA3A et de molécules anti-angiogéniques (sunitinib ou anticorps anti-VEGFR) permet de réduire la résistance tumorale aux thérapies anti-angiogéniques (Maione et al., 2012). L'hypothèse la plus probable pour expliquer ces effets est la suivante : l'utilisation de drogues anti-angiogéniques permet de normaliser la vascularisation tumorale, engendrant ainsi un meilleur apport en nutriment et en oxygène à la tumeur, mais aussi une meilleure délivrance des molécules thérapeutiques (Goel et al., 2012; Serini et al., 2013). De même, une baisse de l'hypoxie au sein des tumeurs malignes limiterait le développement métastatique.

En plus des propriétés anti-angiogéniques de la sémaphorine3A, de nombreux travaux lui confèrent des effets anti-tumoraux plus directs. Dans des cellules de tumeurs du sein, la SEMA3A augmente l'expression de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , conduisant ainsi à la réduction des capacités invasives des cellules. A noter que les auteurs détectent des défauts architecturaux du réseau d'actine, ainsi qu'une diminution du nombre de lamellipodes (Pan et al., 2009). Dans un modèle murin de mélanome, elle inhibe la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Chakraborty et al., 2012).

Dans les tumeurs de la prostate, la SEMA3A montre des effets anti- et pro-tumoraux. De façon intéressante, certaines études notent une corrélation entre l'expression de la SEMA3A et les facteurs de mauvais pronostic (Song et al., 2012; Yacoub et al., 2009). De plus, les travaux de Herman montrent que la SEMA3A diminue les capacités invasives et adhésives des cellules tumorales de prostate, via une régulation positive de certaines protéines d'adhésion (E-cadhérine et intégrines- $\alpha$ ) (Herman and Meadows, 2007).

L'autre sémaphorine la mieux décrite, la **SEMA3F** possède aussi des actions anti-tumorales. Clonée en 1996, cette sémaphorine lie NRP-2 avec une plus grande affinité que NRP-1 selon une étude *in vitro* ( $K_d \approx 0,1$  et  $1$  nM respectivement) (Chen et al., 1997; Roche et al., 1996; Xiang et al., 1996). C'est dans les tumeurs pulmonaires que le rôle de la SEMA3F est le plus renseigné. En effet, son expression est diminuée dans les tumeurs comparée au tissu pulmonaire sain, et cette perte d'expression est associée à un mauvais pronostic et pourrait permettre de favoriser la signalisation induite par le VEGF (Brambilla et al., 2000; Lantuéjoul et al., 2003). Les effets antagonistes de la SEMA3F et du VEGF sont d'ailleurs démontrés dans les tumeurs mammaires. En opposition au VEGF, la stimulation des cellules tumorales mammaires par la SEMA3F engendre une diminution de la formation de lamellipodes de façon NRP-dépendante. De façon intéressante, l'effet de la SEMA3F sur la morphologie cellulaire est dépendant des deux neuropilines, montrant ainsi qu'une cellule peut répondre à la SEMA3F via NRP-1 si elle n'est pas équipée de NRP-2. Les auteurs précisent le mécanisme signalétique sous-jacent, impliquant la protéine Rac1 dans la rétractation cellulaire (Nasarre et al., 2003). De façon plus précise, la SEMA3F induit une réponse anti-migratoire de cellules très mobiles exprimant NRP-2, contrairement à des cellules peu mobiles exprimant NRP-1. Chez ces dernières, la SEMA3F induit tout de même des changements moléculaires au niveau du cytosquelette puisque les auteurs rapportent une perte de contact cellulaire et une délocalisation de la E-cadhérine, associée à une baisse de la prolifération (Nasarre et al., 2005). Le rôle anti-tumoral de la SEMA3F dans les tumeurs pulmonaires est aussi validé *in vivo*. En effet, la SEMA3F inhibe le potentiel tumorigène d'une lignée tumorale pulmonaire après greffe sous-cutanée chez la souris. Cet effet suppresseur de tumeur de la SEMA3F semble dû, en partie, à une diminution de l'activation de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , ainsi qu'à une inhibition de la voie de signalisation des MAPKinases (Kusy et al., 2005a). A noter que le VEGF est capable d'activer l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  dans les cellules endothéliales, et que cette activation est antagonisée par la SEMA3F, renforçant ainsi les rôles opposés de certaines SEMA3 et du VEGF (Serini et al., 2003). En termes de signalisation, la SEMA3F, en plus des MAPKinases, est responsable de l'inhibition de l'axe AKT-STAT3, aboutissant à la diminution de la synthèse de HIF-1 et de VEGF dans des lignées tumorales pulmonaires (Potiron et al., 2007).

Dans une autre étude utilisant un modèle murin, la croissance tumorale est inhibée par la SEMA3F. De façon intéressante les auteurs montrent que l'intron 1 du gène de la SEMA3F possède une séquence de liaison à p53, suggérant que la SEMA3F est une cible transcriptionnelle directe de p53 et qu'elle pourrait être donc un effecteur anti-angiogénique de ce suppresseur de tumeur (Futamura et al., 2007). De plus, il a été démontré que la SEMA3F est transcriptionnellement réprimée par ZEB-1 (Zinc finger E-box-binding homeobox 1), un répresseur transcriptionnel impliqué notamment dans la dédifférenciation cellulaire et dans la répression de marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine. Dans les tumeurs pulmonaires, ZEB-1 est capable de lier directement le promoteur de la SEMA3F (au

niveau de sites E-box conservés) et d'inhiber la synthèse de cette dernière (Clarhaut et al., 2009). Ces observations sont à mettre en miroir avec le fait que ZEB-1 est impliqué dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse, qui joue un rôle clé dans la progression tumorale (Sánchez-Tilló et al., 2012). De plus, un autre groupe montre que le récepteur ROR $\alpha$  (retinoid orphan nuclear receptor alpha) régule directement la transcription de la SEMA3F, et associe la baisse d'expression de ROR $\alpha$  et de SEMA3F avec l'invasion de cellules tumorales mammaires (Xiong et al., 2012). Le facteur de transcription SOX4 semble aussi être capable de moduler la transcription des sémaphorines de classe 3 via sa liaison directe au promoteur des sémaphorines 3A, 3B, 3C, 3E mais aussi des plexines A2 et D1 (Huang et al., 2012).

Par ailleurs, la caractérisation du promoteur de la sema3F montre que la méthylation d'une zone particulière de ce dernier conduit à la répression transcriptionnelle du gène et ainsi à la perte d'expression de la protéine. L'utilisation de la trichostatine A, inhibiteur de certaines histones déacétylases (enzymes recrutées par les protéines liant les groupements méthyles de l'ADN), suffit à stimuler sa synthèse (Kusy et al., 2005b).

La fonction de suppresseur de tumeur de la SEMA3F est par ailleurs démontrée dans d'autres types de néoplasies. Dans le cancer colorectal, une étude confirme son action inhibitrice sur l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et note qu'elle permet de sensibiliser la lignée cellulaire HT29 à deux agents chimiothérapeutiques (5-FU et oxaliplatine) (Zheng et al., 2009). Une seconde étude du même groupe rapporte la perte d'expression SEMA3F dans les tumeurs colorectales malignes, et que sa surexpression inhibe la croissance et le développement tumoral dans un modèle murin de xénotransgreffe (Wu et al., 2011).

D'autres évidences impliquent la SEMA3F dans les tumeurs endométriales, de l'ovaire (Joseph et al., 2010; Nguyen et al., 2011), ainsi que dans les gliomes. Dans ces derniers, la SEMA3F est responsable du collapse du cytosquelette de façon dépendante de l'inactivation de la GTPase RhoA, nécessaire à l'intégrité du cytosquelette. Les auteurs précisent que ce collapse est dépendant du recrutement par la plexine A1 de la tyrosine kinase ABL2 (Shimizu et al., 2008).

De façon intéressante, une étude récente suggère que les SEMA3A et 3F pourraient avoir un effet pro-tumoral indirect. En effet, un groupe a corrélé la présence des SEMA3A et 3F avec une diminution de l'innervation sympathique dans des polypes colorectaux. Les auteurs suggèrent que la répulsion des fibres sympathiques est due aux sémaphorines 3A et 3F, et qu'en conséquence la concentration en noradrénaline dans l'environnement est diminuée. Cette faible concentration en noradrénaline, hormone décrite comme antiproliférative, serait responsable de la croissance des polypes (Graf et al., 2012; Pullar et al., 2006).

## 5.2. Neuropilines et plexines

L'implication des **neuropiline-1 et-2** et des **plexines** dans les mécanismes de progression tumorale ont fait l'objet de nombreux travaux.

Le rôle de **NRP-1** dans les processus tumoraux est suggéré en 2000. L'étude de Ding montre que l'expression de NRP-1 est induite par l'EGF et corrélée à l'augmentation du grade tumoral d'astrocytomes (Ding et al., 2000). D'autres travaux démontrent une corrélation entre l'expression de ce récepteur et l'augmentation de l'angiogenèse tumorale (Fakhari et al., 2002; Miao et al., 2000). De façon générale, NRP-1 est considérée comme une protéine pro-tumorale dans de nombreux types tumoraux comme les carcinomes rénaux et hépatocellulaires, les tumeurs pancréatiques et gastrointestinales et les mélanomes (Cao et al., 2008; Fukahi et al., 2004; Hansel et al., 2004; Ruffini et al., 2013; Xu and Xia, 2013).

Très récemment a été mise en évidence une propriété particulière de NRP-1 : les peptides capables de lier ce récepteur sont très vite internalisés par la cellule. Etant donné que NRP-1 est exprimé ou surexprimé par une très grande variété de cellules tumorales, ce récepteur pourrait constituer une cible thérapeutique de choix. En effet, en 2009, l'étude de Teesalu visait à détecter des peptides de pénétration cellulaire (CPP, cell penetrating peptide) à partir d'une banque de peptides phagiques. Les auteurs ont remarqué qu'une grande proportion des CCPs présentait un motif consensus KXXR/K à leur extrémité C-terminale et que ces CCPs pouvaient lier le domaine b1 de NRP-1 (au niveau d'une poche électro-négative) (Teesalu et al., 2009). Les quelques études qui ont suivi cette découverte ont montré que des peptides arborant ce motif consensus permettait un meilleur ciblage des cellules tumorales. Par exemple, la co-administration d'un tel peptide améliore l'efficacité thérapeutique de différentes petites molécules comme la doxorubicine, ou d'anticorps monoclonaux comme le trastuzumab (anti-ERBB2). A noter que les agents thérapeutiques et le peptide n'ont pas besoin d'être couplés. De plus, les effets secondaires sont diminués par rapport aux mêmes agents utilisés en monothérapie (Sugahara et al., 2010). NRP-2 peut aussi être lié par les CCPs, mais avec une affinité plus faible (Roth et al., 2011). NRP-2 pourrait donc servir de porte d'entrée à des agents anticancéreux dans des structures n'exprimant pas ou peu NRP-1. C'est le cas, par exemple, des vaisseaux lymphatiques tumoraux qui n'expriment pas NRP-1 mais de grandes quantités de NRP-2 (Yuan et al., 2002). Cette internalisation peptidique dépendante des neuropilines se fait par voie endosomale, puis les peptides sont transportés de façon active dans la cellule et non par diffusion simple. Les mécanismes précis régulant cette internalisation restent à élucider (Teesalu et al., 2013). De même, **NRP-2** présente un rôle pro-tumoral dans de nombreux cancers tels les carcinomes colorectaux, les tumeurs gastriques, mammaires et pulmonaires (Gray et al., 2008; Kim et al., 2009; Nasarre et al., 2013; Yasuoka et al., 2009). Le blocage de NRP-2 par un anticorps qui cible

spécifiquement les domaines b1/b2 permet de bloquer l'interaction VEGF-C/NRP-2 et VEGFR/NRP-2, et ainsi de diminuer la dissémination métastatique dépendante des vaisseaux lymphatiques (Caunt et al., 2008). Dans les cellules tumorales pulmonaires, l'induction d'une TEM par le TGF $\beta$ 1 s'accompagne d'une augmentation de l'expression de NRP-2 (Nasarre et al., 2013). Dans des lignées cellulaires de tumeurs gastriques, NRP-2 permet la stabilisation de la  $\beta$ -caténine, un acteur participant à la TEM. *In vivo*, son inhibition réduit la croissance tumorale (Samuel et al., 2011). De façon intéressante, une étude précédente a mis en évidence que 40% des patients atteints de tumeurs gastriques présentaient un gain du nombre de copies d'ADN au niveau de la région chromosomique 2q33, où est localisé *NRP-2* (Tsukamoto et al., 2008).

Les **plexines** font aussi l'objet de nombreuses études en cancérologie. Une des premières évidences est établie en 2002 avec la plexine-B1. Les auteurs montrent, pour la première fois, que cette plexine peut interagir avec un RTK (met) et qu'elle participe au contrôle de la migration de progéniteurs hépatiques, suggérant ainsi un rôle potentiellement extensible aux cellules tumorales (Giordano et al., 2002). Plus récemment, la perte de plexine-C1 est démontrée comme étant un évènement précoce présidant à la progression de mélanomes. En effet, la surexpression de la plexine-C1 réduit la migration de cellules tumorales de mélanomes, via une diminution de l'activité de R-Ras (Chen et al., 2013). Un dernier exemple concerne la plexine-A4. Une étude de 2011 montre qu'elle favorise la progression et l'angiogenèse tumorale. Les auteurs montrent que la plexine-A4 est nécessaire à la prolifération induite par le FGF et par le VEGF dans des cellules endothéliales. Ils précisent que cette plexine s'associe au VEGFR-2 pour promouvoir la signalisation VEGF-dépendante. Par ailleurs, l'inhibition de son ligand, la SEMA6B, induit des effets similaires (Kigel et al., 2011).

## **Quatrième Partie - Les modèles d'étude des TNE-GEPs**

La grande variété des types cellulaires composant la population endocrine de la sphère digestive a longtemps été un frein à l'étude moléculaire et clinique des TNE-GEPs. Ainsi, le développement de lignées cellulaires et de modèles murins a permis une grande avancée dans la compréhension des TNE-GEPs.

## 1. Lignées cellulaires

### 1.1. Humaines

#### *Lignées pancréatiques*

Actuellement la lignée humaine la plus utilisée est la lignée **BON**, qui est dérivée d'une métastase ganglionnaire d'une tumeur endocrine pancréatique. Les cellules BON expriment la chromogranine A et sécrètent la pancréastatine, la neurotensine, la sérotonine et la bombésine (Evers et al., 1991; Parekh et al., 1994). Elles sont tumorigènes *in vivo* chez la souris nude. Les cellules ont été utilisées, entre autres, pour mieux comprendre le rôle du gène *NEM1*, ainsi que les mécanismes d'action de l'évérolimus et des analogues de la somatostatine, *in vitro* et *in vivo* (Lopez-Egido et al., 2009; Moreno et al., 2008; Zitzmann et al., 2007).

Une autre lignée pancréatique disponible est la lignée **QGP-1** qui a été obtenue à partir d'un carcinome pancréatique et qui sécrète la somatostatine, la calcitonine, la pancréastatine (Funakoshi et al., 1990; Ichiki et al., 1986; Iguchi et al., 1990; Kaku et al., 1980). Les lignées BON et QGP-1 sont sensibles au danusertib, un inhibiteur des kinases Aurora (impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire) *in vitro* et *in vivo* (Fraedrich et al., 2012).

La dernière lignée pancréatique humaine est la lignée **CM** issue d'une ascite d'un patient atteint d'un insulinome malin avec métastases hépatiques. Les cellules CM ont d'abord été caractérisées comme phénotypiquement proches des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Baroni et al., 1999). Plus récemment, ce phénotype  $\beta$ -pancréatique a été critiqué notamment car aucune sécrétion d'insuline par les cellules CM n'a pu être détectée et que la lignée présente des instabilités chromosomiques importantes, conduisant à la conclusion que la lignée CM n'était pas un modèle valable de cellules  $\beta$  (Gragoli, 2008). En plus de l'évérolimus, les cellules CM montrent une réponse antiproliférative à un inhibiteur de la protéine chaperonne HSP90 (heat shock protein 90) et au gefitinib, un inhibiteur de l'EGFR (Gloesenkamp et al., 2012a; Höpfner et al., 2003) (Tableau 7).

#### *Lignées intestinales*

Parmi les lignées humaines endocrines intestinales, on trouve la lignée **GOT1** qui provient d'une tumeur carcinoïde de l'iléon obtenue après transplantation chez la souris nude d'une culture

Nom	Origine	Sécrétion
<b>BON</b>	Métastase ganglionnaire d'une tumeur endocrine pancréatique	Chromogranine A, pancréastatine, neurotensine, sérotonine, bombésine
<b>QGP-1</b>	Carcinome pancréatique	Somatostatine, calcitonine, pancréastatine
<b>CM</b>	Insulinome malin avec métastases hépatiques	Insuline*
<b>GOT1</b>	Tumeur carcinoïde de l'iléon obtenue chez la souris après transplantation de cellules issues d'une métastase hépatique	Chromogranine A, synaptophysine, sérotonine, substance P, somatostatine
<b>KRJ-1</b>	Tumeur carcinoïde iléale	Chromogranine A, substance P, sérotonine
<b>P-ST5, L-ST5, H-ST5</b>	Tumeurs carcinoïdes des cellules de l'iléon (tumeur primaire(P), métastases d'un ganglion lymphatique (L) et hépatique (H))	Chromogranine A, sérotonine
<b>CNDT2<sup>#</sup></b>	Tumeur carcinoïde de l'iléon	Chromogranine A, synaptophysine, sérotonine
<b>LCC-18</b>	Tumeur carcinoïde de l'iléon	Synaptophysine, Vasoactive intestinal peptide
<b>NCI-H716<sup>¶</sup></b>	Adénocarcinome peu différencié du caecum	Chromogranine A, glucagon-like peptide 1
<b>HC45, HC49</b>	Tumeurs carcinoïdes de l'iléon et du rectum, respectivement	Chromogranine A, synaptophysine

**Tableau 7 : Les lignées tumorales neuroendocrines digestives d'origine humaine.**

\*Sécrétion discutée ; <sup>#</sup> Phénotype endocrine discuté ; <sup>¶</sup> Lignée ampicrine



primaire de cellules issues d'une métastase hépatique. Les cellules GOT1 expriment la CgA et sécrètent la synaptophysine, la sérotonine, la substance P et la somatostatine. De plus, elles expriment les cinq récepteurs de la somatostatine, permettant leur étude en scintigraphie (Kölby et al., 2001; Nilsson et al., 2004). *In vivo*, les tumeurs induites par les cellules GOT1 ont été utilisées pour tester la thérapie métabolique (Oddstig et al., 2012).

Une autre lignée d'origine intestinale est la lignée **KRJ-1**, issue d'une tumeur carcinoïde iléale. Ces cellules sont proches des cellules entérochromaffines, expriment la CgA et sécrètent la substance P et la sérotonine (Modlin et al., 2006). Elles ont permis l'étude d'analogues de la somatostatine et de la rapamycine (Kidd et al., 2007; Svejda et al., 2011). Actuellement, elles sont majoritairement utilisées pour étudier la synthèse et de la sécrétion de la sérotonine par les cellules entérochromaffines (Damen et al., 2013; Haugen et al., 2012).

Trois autres lignées tumorales ont été dérivées à partir de tumeurs carcinoïdes des cellules entérochromaffines de l'iléon: **P-STS** (tumeur primaire), **L-STS** (métastase d'un ganglion lymphatique) et **H-STS** (métastases hépatiques). Ces trois lignées ont un potentiel tumorigène lorsqu'elles sont greffées chez des souris nude et sécrètent la sérotonine et la CgA. De plus, elles forment spontanément des sphéroïdes en culture, permettant ainsi d'avoir des conditions de croissance plus proches du comportement tumoral observé *in situ* (Pfragner et al., 2009).

Une autre lignée est issue d'une tumeur carcinoïde de l'iléon, la lignée **CNDT2**. Ces cellules sont capables de former des colonies en agar mou et présentent un potentiel tumorigène après greffe chez la souris nude. Les caractéristiques endocrines sont conservées *in vitro* et *in vivo* avec expression de CgA, synaptophysine et des récepteurs à la somatostatine (SSTR1 et 2), et sécrétion de sérotonine. A noter que les CNDT2 expriment le VEGFR-1, IGFR-1, NRP-1 et pas NRP-2 (Van Buren et al., 2007). L'authenticité endocrine de ces cellules reste néanmoins discutée.

Une autre lignée de tumeurs carcinoïdes a été développée, à partir du côlon cette fois, la lignée **LCC-18**. Les cellules expriment la synaptophysine et sécrètent le VIP (vasoactive intestinal peptide) et le glucagon. L'obtention de cette lignée semble avoir été favorisée par le fait que les cellules expriment l'oncogène c-Myc. Les caractéristiques endocrines de la lignée sont préservées après transplantation chez le rat nude (Lundqvist et al., 1991). Néanmoins, le modèle cellulaire ne présente pas de réponse antiproliférative à l'interféron *in vivo* (Elvin et al., 1994). Plus récemment, cette lignée est utilisée pour étudier les mécanismes sous-jacents de l'inflammation et la maladie de Bowel (Dlugosz et al., 2011; Selleri et al., 2008).

Une autre lignée, peu utilisée, est la lignée **NCI-H716** qui est dérivée d'un adénocarcinome peu différencié du caecum. Cette lignée semble amphicrine (terme s'appliquant plutôt à une glande présentant des structures exocrines et endocrines, comme le pancréas) et elle devient endocrine lorsqu'elle est greffée chez la souris athymique. En effet, seulement 1% des cellules expriment la CgA

*in vitro*, tandis que cette proportion monte à 50% dans les xénogreffes. De plus, elles expriment les récepteurs à la gastrine, la sérotonine et la somatostatine, ainsi que le GLP-1 (de Bruïne et al., 1992; Reimer et al., 2001). La différenciation endocrine des NCI-H716 peut être activée par des composants de la matrice extracellulaire et par la co-culture avec des fibroblastes (de Bruïne et al., 1993). Actuellement, cette lignée est utilisée dans quelques études s'intéressant aux mécanismes régulant la sécrétion de GLP-1 (Chen et al., 2012; Daoudi et al., 2011; Mulherin et al., 2011).

Pour finir, deux lignées ont été développées à partir de TNE-GEPs humaines : les lignées **HC45** et **HC49** qui sont dérivées, respectivement, de tumeurs carcinoïdes de l'iléon et du rectum. Après isolation des cellules à partir des tumeurs primaires, elles ont été immortalisées par transfection avec un adénovirus recombinant exprimant l'antigène T du SV40. Les cellules HC45 et HC49 expriment la synaptophysine, la CgA, l'EGFR et certains récepteurs à la somatostatine (SSTR2 pour les deux lignées, SSTR5 seulement chez HC45). Les deux lignées répondent à l'octréotide et au gefitinib (inhibiteur de l'EGFR) par une baisse de prolifération (Stilling et al., 2007) (Tableau 7).

## 1.2. Souris et autres rongeurs

### ***Lignées pancréatiques***

Un certain nombre de lignées murines est aussi disponible. Parmi les lignées d'origine pancréatique, c'est la lignée **INS1** qui est la plus utilisée, pour sa qualité de modèle de cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ces cellules ont été isolées à partir d'un insulinome radio-induit chez le rat. Elles possèdent des caractéristiques morphologiques et sécrétoires proches des cellules  $\beta$  notamment en termes de synthèse et de sécrétion d'insuline. Plusieurs clones sont issus de la lignée parentale, et c'est le clone INS1E qui est le plus utilisé car les cellules INS1E présentent une plus forte sécrétion d'insuline en réponse au glucose, les rapprochant plus d'un état  $\beta$ -pancréatique (Asfari et al., 1992). Le phénotype  $\beta$  des cellules INS1 leur confère un intérêt dans l'étude de la régulation de l'insuline, et des altérations menant au développement du diabète (Caton et al., 2013; Okamoto et al., 2012). De plus, elles sont aussi largement utilisées pour l'étude du syndrome NEM1 (Bazzi et al., 2008; Zhang et al., 2012). Un autre clone, INS-r3, présente une forte sécrétion de VEGF, induisant ainsi une forte vascularisation des tumeurs induites par ces cellules dans un modèle de greffe chez la souris nude (Poncet et al., 2009).

Une autre lignée disponible est la lignée **RIN**. Plusieurs clones (RIN-m et RIN-r) ont été dérivés d'un insulinome radio-induit chez le rat, suivi par des transplantations en série. Les lignées RIN-m et RIN-r ont été respectivement maintenues chez une souche consanguine de rat et la souris nude. Ces clones présentent des caractéristiques globalement similaires, notamment en termes de sécrétion de somatostatine et d'insuline, et de potentiel tumorigène chez l'animal (Gazdar et al., 1980). Comme

les INS1, ces lignées sont majoritairement utilisées dans des travaux *in vitro* pour étudier les régulations de l'insuline et de la somatostatine (Amiranoff et al., 1990; Bruzzone et al., 2008; L'Amoreaux et al., 2010).

On peut aussi citer la lignée **MIN6**, établie à partir d'une tumeur pancréatique développée chez une souris transgénique exprimant l'antigène T du SV40 et le promoteur de l'insuline (Miyazaki et al., 1990). Ces cellules conservent les caractéristiques  $\beta$ -pancréatiques puisqu'elles sécrètent de l'insuline en réponse à une stimulation par le glucose, jusqu'à un certain nombre de passages (Ishihara et al., 1993; O'Driscoll et al., 2006). Néanmoins, une étude de 2009 note l'expression d'autres hormones, comme le glucagon, la somatostatine et le polypeptide pancréatique, relativisant ainsi le phénotype purement  $\beta$ -pancréatique des MIN6 (Nakashima et al., 2009). Ces cellules sont principalement utilisées pour comprendre les mécanismes mis en jeu dans la sécrétion d'insuline et le métabolisme glucidique (Syed et al., 2013). Cultivées dans un système 3D puis transplantées chez des souris diabétiques, les MIN6 sont capables de réduire l'hyperglycémie (Tanaka et al., 2013).

Une autre lignée murine pancréatique à disposition est la lignée **AR42J**, dérivée d'une tumeur pancréatique induite chimiquement par l'azasérine (Jessop and Hay, 1980). Cette lignée, tumorigène chez la souris athymique, est de phénotype amphicrine. En effet, cette lignée est définie comme une lignée acinaire pancréatique mais peut, sous certaines conditions, se différencier en cellules endocrines. Les cellules AR42J présentent un phénotype acinaire puisqu'elles expriment différentes enzymes digestives, leurs récepteurs ainsi que des récepteurs aux glucocorticoïdes, permettant la régulation des voies de sécrétion. Ces cellules présentent aussi des caractéristiques endocrines, même sans induction de la différenciation notamment la présence de vésicules neuroendocrines qui stockent des neurotransmetteurs (Rosewicz et al., 1994). Cultivée en présence de dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse), ces cellules maintiennent un phénotype acinaire, tandis qu'une différenciation endocrine est obtenue en traitant les cellules avec la bétacelluline et l'activine A. Néanmoins la traitement bétacelluline + activine A induit la différenciation de seulement 10% des AR42J en cellules produisant de l'insuline (Mashima et al., 1996). Les travaux actuels utilisent les AR42J comme un modèle cellulaire proche de l'état progéniteur pancréatique et visent à mieux comprendre les mécanismes de différenciation pancréatique (Lima et al., 2012; Lin et al., 2013a).

Deux autres modèles cellulaires  $\alpha$  et  $\beta$  pancréatiques sont disponibles : les lignées  **$\alpha$ TC** et  **$\beta$ TC**. Les  $\alpha$ TC sont issues d'un adénome développé chez une souris transgénique exprimant l'antigène T du SV40 sous le contrôle du promoteur du préproglucagon (Hamaguchi and Leiter, 1990). La lignée parentale  $\alpha$ TC sécrète le glucagon mais aussi de grandes quantités d'insuline et douze clones ne produisant pas d'insuline ont été établis ( $\alpha$ TC 1-12). Les  $\alpha$ TC sont utilisées comme modèle  $\alpha$ -pancréatique, notamment pour l'étude de mécanismes régulant la sécrétion de glucagon (Chertow et al., 1996; Flock et al., 2005).

Les cellules  $\beta$ TC proviennent d'une souris semblable, mais chez laquelle l'antigène T du SV40 est placé sous le contrôle du promoteur de l'insuline. Elles sécrètent de l'insuline et présente une très faible expression du glucagon (Hamaguchi and Leiter, 1990).

Pour finir avec les modèles pancréatiques, une dernière lignée est disponible, bien que très peu usitée : la lignée In-R1-G9. Ces cellules sont issues de la lignée **IN-111-R1**, dérivée d'un insulinome obtenu chez le hamster. Les cellules In-R1-G9 ont été ensuite isolées après clonage de la lignée IN-111-R1 et sélection de clones sécrétant le glucagon (Takaki et al., 1986). Cette lignée ne fait plus l'objet de publications scientifiques depuis la fin des années 2000, et a été majoritairement utilisée pour étudier la régulation de la sécrétion de glucagon (Chen and Ostenson, 2004; Flodgren et al., 2007) (Tableau 8).

### ***Lignées intestinales***

Les modèles cellulaires tumoraux endocrines non-pancréatiques d'origine murine sont seulement au nombre de deux, la lignée STC-1 et la lignée GluTag.

La lignée **STC-1** a été isolée à partir d'une tumeur de l'intestin grêle développée chez une souris double-transgénique portant plusieurs transgènes : le promoteur de l'insuline (RIP) lié à l'antigène T du SV40 (Tag) ou à l'antigène t du polyomavirus (PyST) (souris RIP1Tag2/RIP2PyST1) (Rindi et al., 1990). Les cellules STC-1 conservent la capacité à sécréter différentes hormones par rapport à la tumeur initiale, notamment le GLP (glucagon-like peptide), le GIP (gastric inhibitory peptide), la somatostatine, la neurotensine, la substance P et la cholécystokinine (Abello et al., 1994; Kieffer et al., 1995; Mangel et al., 1993; Rindi et al., 1990). L'étude de la régulation de la sécrétion de cholécystokinine par les STC-1 fait d'ailleurs fait l'objet de très nombreuses études depuis les années 1990. Cette lignée est tumorigène chez le rat immunodéprimé et la souris nude (Dumortier et al., 2000; Pourreya et al., 2008). Les STC-1 sont sensibles à l'interféron- $\gamma$ , auquel elles répondent par une baisse de prolifération consécutive à un arrêt du cycle cellulaire et à l'induction de mécanismes apoptotiques (Höpfner et al., 2004). Elles sont aussi un bon modèle cellulaire pour étudier les effets anti-tumoraux de l'évérolimus (inhibiteur de mTOR) (Bollard et al., 2013; Couderc et al., 2011). Pour finir, cette lignée sécrète le VEGF, les rapprochant ainsi des TNE-GEPs dont une des propriétés est d'être richement vascularisées (Góth et al., 2003; Villaume et al., 2010).

La lignée **GluTag** est issue d'une tumeur endocrine du côlon développée chez une souris transgénique exprimant le gène du glucagon et l'antigène T du SV40 (souris GluTag) et maintenue chez des souris par transplantations successives. Ces cellules expriment le glucagon, différentes formes du GLP-1 et la cholécystokinine (Brubaker et al., 1998; Drucker et al., 1994). Cette lignée a été utilisée de façon intensive pour l'étude de la synthèse et la sécrétion de la cholécystokinine et du GLP-1. Par ailleurs, une étude a montré que les GluTag présentaient des caractéristiques

Nom	Origine	Sécrétion
<b>INS1</b>	Insulinome radio-induit chez le rat	Insuline
<b>RIN</b>	Insulinome radio-induit chez le rat	Insuline, somatostatine
<b>MIN6</b>	Tumeur pancréatique développée chez une souris transgénique	Insuline, glucagon, somatostatine, polypeptide pancréatique
<b>AR42J<sup>⌘</sup></b>	Tumeur pancréatique induite chimiquement par l'azasérine	Enzyme exocrine, amylase
<b><math>\alpha</math>-TC, <math>\beta</math>-TC</b>	Adénomes développés chez une souris transgénique	Glucagon ( $\alpha$ -TC) Insuline, Glucagon ( $\beta$ -TC)
<b>IN-111-R1</b>	Insulinome obtenu chez le hamster	Glucagon
<b>STC-1</b>	Tumeur de l'intestin grêle développée chez une souris transgénique	Glucagon-like peptide, somatostatine, gastric-inhibitory peptide, cholécystokinine
<b>GluTag</b>	Tumeur du côlon développée chez une souris transgénique	Glucagon, glucagon-like peptide; cholécystokinine

**Tableau 8 : Les lignées tumorales neuroendocrines digestives développées chez les rongeurs.**

<sup>⌘</sup> Lignée amphicine

fonctionnelles très proches des cellules L (cellules entéroendocrines de l'iléon et du côlon spécialisées dans la sécrétion de glucagon), notamment en termes de réponse au glucose et de profils d'expression des récepteurs à glucose et autres hormones (Reimann et al., 2008). Les cellules GluTag sont tumorigènes chez la souris nude (Bollard et al., 2013; Couderc et al., 2011) et semblent plus différenciées que les STC-1, en termes de réponse sécrétoire à différents sécrétagogues (substances biologiques stimulant la sécrétion d'hormones par une glande endocrine) (Drucker et al., 1994) (Tableau 8).

## **2. Modèles animaux**

### **2.1. Modèle spontané de carcinome gastrique**

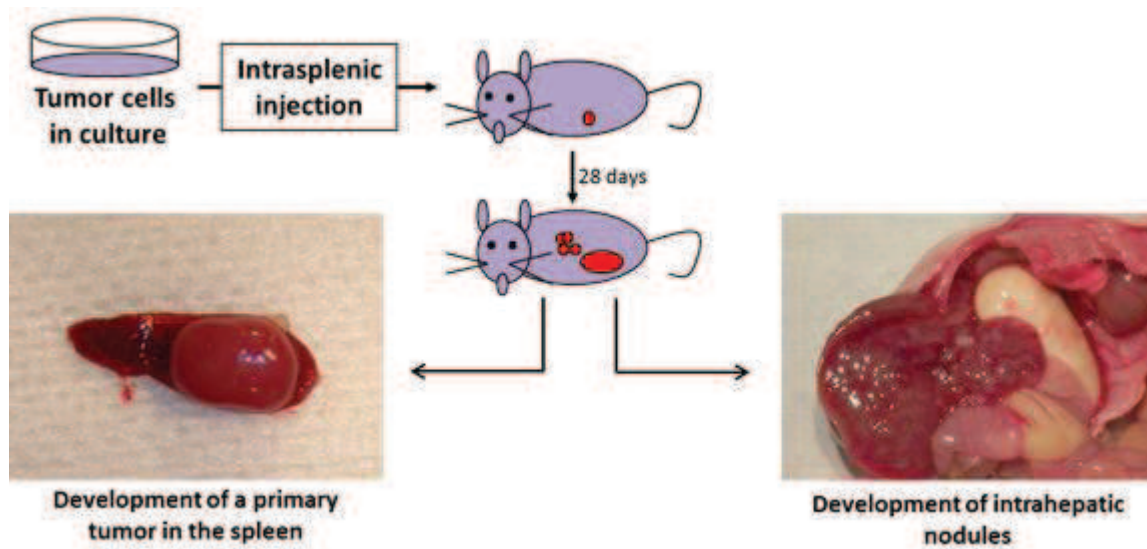
Bien que très peu utilisée, il convient de noter l'existence d'une espèce de rongeur qui développe spontanément des carcinomes de l'estomac. Cette espèce de rongeurs est appelée rat du Natal ou *Mastomys natalensis*. Parmi les nombreuses maladies développées par ce rongeur, on trouve des tumeurs carcinoïdes chez 60% des mâles et 30% des femelles. Ces tumeurs sécrètent de l'histamine et gardent leurs particularités histologiques après transplantation chez d'autres *Mastomys*, lesquels meurent d'ulcères gastriques lorsque que la tumeur atteint une taille supérieure à 1 cm (Oettle 1957; Snell and Stewart, 1975). La dernière étude utilisant ce rongeur et s'intéressant aux tumeurs carcinoïdes date de 2002 : les auteurs montrent que l'inoculation de la bactérie *Helicobacter pylori* chez *Mastomys natalensis* permet de diminuer le développement des lésions néoplasiques (Koga et al., 2002).

### **2.2. Modèles de xénogreffe chez la souris**

Les deux modèles de xénogreffe chez la souris utilisés au laboratoire existent déjà pour différents types tumoraux. Nous les avons adaptés et validés pour les TNE-GEPs.

#### **2.2.1. Modèle murin de dissémination intrahépatique**

Pour mimer la dissémination hépatique des cellules tumorales, un modèle murin de xénogreffe est utilisé au laboratoire. L'injection de cellules tumorales dans la rate de souris athymique permet le développement d'une tumeur primaire solide, la dissémination des cellules vers le foie et le développement extemporané et ultérieur de nodules intrahépatiques via le système porte (Pourreyron et al., 2008) (Figure 14). Au laboratoire, ce modèle a été utilisé avec les lignées



**Figure 14 : Le modèle de dissémination intrahépatique.**

L'injection des cellules tumorales dans la rate de souris athymique permet le développement d'une tumeur primaire solide et la dissémination vers le foie, via le système porte.

intestinales STC-1 et GluTag, ainsi que les lignées pancréatiques INS 1E et INS r3 pour étudier l'effet anti-tumoral de l'inhibition de mTOR (Bollard et al., 2013; Couderc et al., 2011 et données non-publiées). Utilisé avec la lignée endocrine pancréatique humaine BON, ce modèle reproduit le syndrome carcinoïde, ainsi que les atteintes cardiaques associées (notamment de la valve tricuspide) observées chez les patients (Musunuru et al., 2005).

### **2.2.2. Modèle murin de xélogreffe orthotopique caecale**

Un second modèle de greffe a été mis au point au laboratoire dans le but de reproduire le plus fidèlement les différentes étapes de l'histoire naturelle observée en pathologie humaine, notamment la croissance locale, l'invasion locale, la dissémination ganglionnaire et hépatique (Poncet et al., 2009). Ce modèle comprend deux étapes dont : (1) l'obtention d'une tumeur solide après injection sous-cutanée des cellules tumorales chez une souris athymique, puis (2) récupération de la tumeur sous-cutanée et greffe d'un fragment au niveau de la séreuse de la paroi caecale d'une nouvelle souris athymique. Le développement tumoral qui s'ensuit respecte une cinétique bien définie : entre deux et quatre semaines, la tumeur reste confinée à la séreuse, puis infiltre la musculature propre et la sous-muqueuse entre quatre et six semaines, pour finalement envahir la muqueuse et induire le développement de métastases dans le foie à partir de huit semaines (Figure 15).

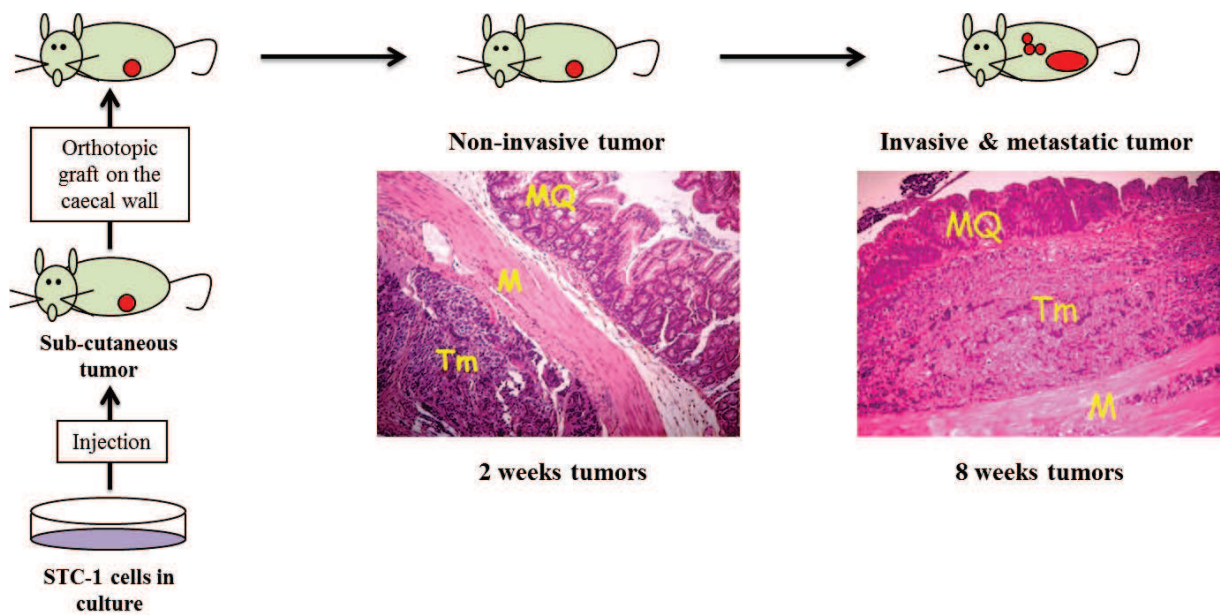
Ce modèle original a été utilisé pour mener une étude protéomique. L'objectif était de connaître les protéines dont l'expression était modifiée au cours de la progression tumorale et ainsi de détecter de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou facteurs pronostiques (données non publiées).

## **2.3. Modèles murins transgéniques**

### **2.3.1. Tumeurs pancréatiques**

Le modèle murin transgénique très largement utilisé pour l'étude des TNE-GEPs est le modèle RIP-Tag. Pour rappel, ces souris expriment le Tag (large T antigen) du SV40 placé sous le contrôle du promoteur de l'insuline. L'expression du Tag est ainsi effective spécifiquement dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques et va conduire à la prolifération anarchique de ce lignage et au développement de lésions tumorales, selon une chronologie bien définie. Le Tag est exprimé dès le 9<sup>ème</sup> jour embryonnaire dans la totalité des îlots de Langerhans. Il devient fonctionnel entre les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> semaines post-natales, étape durant laquelle 50 à 70% des îlots deviennent hyperplasiques. Ces îlots donnent lieu à des lésions hyperplasiques présentant des signes de néovascularisation dont certains





**Figure 15 : Le modèle de xéno greffe orthotopique caecale.**

L'injection des cellules tumorales en sous-cutanée permet l'obtention d'une tumeur primaire solide. La greffe de fragments issus de cette tumeur primaire dans la paroi caecale d'une nouvelle souris permet un développement tumoral dont la cinétique est bien définie : la tumeur reste confinée à la séreuse jusqu'à deux semaines, puis devient invasive et induit des métastases hépatiques à huit semaines.

Mq : Muqueuse ; Tm : Tumeur ; M : Musculeuse

évolueront, entre les 10<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> semaines, vers des adénomes encapsulés et des carcinomes invasifs (Hager and Hanahan, 1999; Hanahan, 1985) (Figure 16).

Ce modèle a été très largement utilisé pour l'étude des mécanismes de progression des tumeurs neuroendocrines pancréatiques, et particulièrement pour l'étude de l'angiogenèse. Il a permis, entre autres, de décrire le développement du réseau vasculaire tumoral pendant la progression ainsi que les facteurs impliqués (Ryschich et al., 2002).

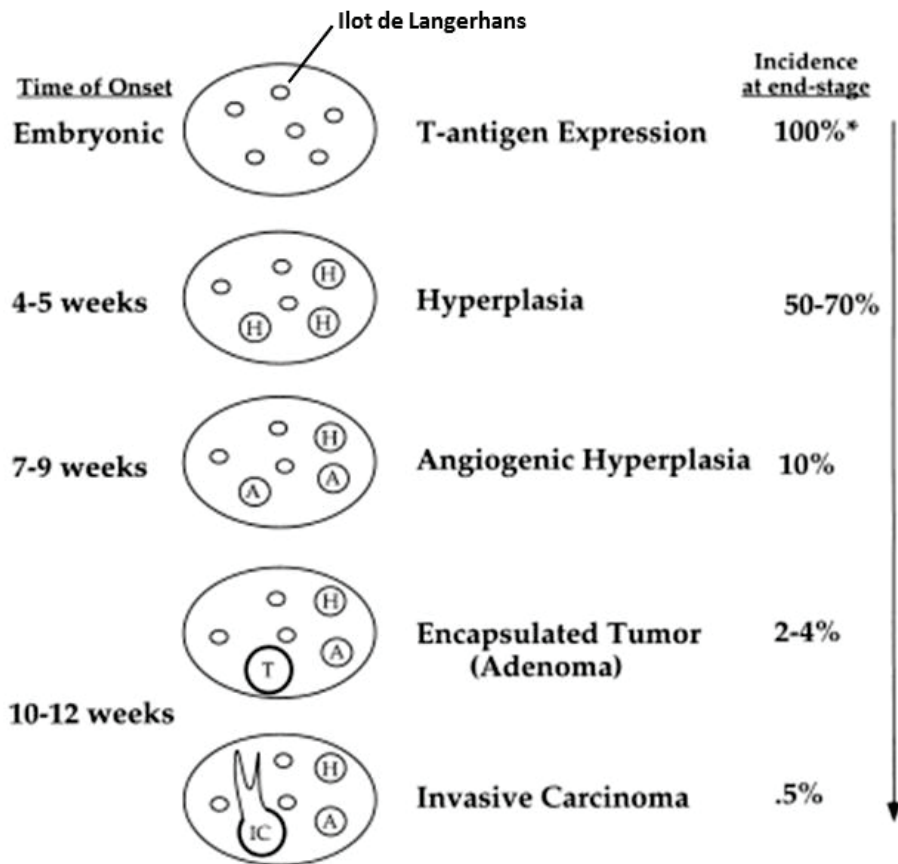
Certains variants du modèle RIP-Tag ont permis le développement de tumeurs neuroendocrines carcinoïdes du tractus digestif, et l'isolement des lignées intestinales STC-1 et GluTag (Drucker et al., 1994; Grant et al., 1991; Rindi et al., 1990). En ce sens, le modèle a été utilisé dans des études précliniques pour tester des inhibiteurs de l'angiogenèse, tels que le sorafénib (Fendrich et al., 2012). De plus, un modèle bioluminescent a été développé à partir du modèle RIP-Tag, grâce au croisement de souris RIP-Tag avec des souris RIP-Tag-IRES-Luciférase. L'expression spécifique de la luciférase permet le suivi du développement tumoral de manière non invasive, par imagerie (Zumsteg et al., 2010).

### 2.3.2. Néoplasie endocrinienne multiple

L'étude du syndrome de prédisposition aux lésions endocrines NEM1 a été très majoritairement permise par le développement de souris transgéniques invalidées pour le gène *NEM1*, de façon totale ou conditionnelle.

Les premières études des souris KO pour le gène *NEM1* montrent que le phénotype *Nem1*<sup>-/-</sup> est léthal entre 11,5 et 13,5 jours pendant le développement embryonnaire. Néanmoins, les souris hétérozygotes *Nem1*<sup>+/-</sup> sont viables et présentent des caractéristiques cliniques proches de celles observées en pathologie humaine, dont le développement de lésions endocrines diverses notamment au niveau de la thyroïde, de l'hypophyse et de la région duodéno-pancréatique (Bertolino et al., 2003a; Crabtree et al., 2001).

La stratégie d'étude de la pathologie NEM1 s'est ensuite dirigée vers l'utilisation de modèle de KO conditionnel, permettant l'invalidation spécifique du gène *NEM1* dans un type cellulaire particulier. Il a été montré que l'invalidation de *NEM1* dans la parathyroïde induisait l'apparition de lésions tumorales dans cette glande (Libutti et al., 2003). Des études sur le pancréas arrivent aux mêmes conclusions : l'inactivation du gène *NEM1* est alors dirigée spécifiquement dans le pancréas exocrine par le facteur de transcription Pdx-1 ou dans le compartiment endocrine par le promoteur du gène codant l'hormone du type cellulaire considéré ; et cette inactivation récapitule le tableau clinique du syndrome NEM1 (Bertolino et al., 2003b; Shen et al., 2009, 2010).



**Figure 16 : Chronogramme de la tumorigenèse dans le modèle de tumeurs pancréatiques RIP-TAG.**

L'expression spécifique de l'antigène T du SV40 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques des souris RIP-Tag permet le développement d'hyperplasies, puis d'adénomes et de carcinomes invasifs. (Hager and Hanahan, 1999)

## **Objectifs du travail**

Malgré les progrès récents dans les traitements des TNE-GEPs, majoritairement imputables à l'essor des thérapies ciblées, de nouvelles pistes thérapeutiques sont nécessaires. En effet, les thérapies ciblées induisent des stabilisations de la pathologie tumorale, et les cas de rémissions restent rares. De plus, le développement de résistances, dont sont responsables des mécanismes moléculaires encore peu caractérisés, participe à la limitation de l'efficacité thérapeutique des thérapies ciblées.

Pour les TNE-GEPs, les tumeurs neuroendocrines d'origine pancréatique ont fait et font actuellement l'objet de nombreux essais cliniques visant à tester les agents de thérapies ciblées. Parmi ceux-ci, l'évérolimus et le sunitinib sont validés pour le traitement de ces tumeurs pancréatiques. En revanche, peu d'études concernent les TNE-GEPs de la sphère digestive, et particulièrement les carcinomes neuroendocrines gastroentéropancréatiques peu différenciés (pdCNE-GEPs) dont la faible incidence a tempéré les études précliniques et l'inclusion des patients dans des essais cliniques.

Nos travaux visent à élargir les thérapies ciblées existantes aux pdCNE-GEPs, ainsi qu'à diversifier l'arsenal thérapeutique destiné aux TNE-GEPs, particulièrement d'origine digestive, notamment en cherchant de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre stratégie s'articule autour de trois grands objectifs :

- **l'objectif premier** de ce travail est d'étudier le potentiel thérapeutique de l'évérolimus dans un sous-groupe particulier de TNE-GEPs, les carcinomes neuroendocrines gastroentéropancréatiques peu différenciés, grâce à l'utilisation des modèles précliniques cellulaires d'origine intestinale et colique.

- **le second objectif** est d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans une étape clé de la progression tumorale des TNE-GEPs, l'étape d'invasion locale qui conduit au développement métastatique. Pour cela, un modèle animal original, ainsi qu'une étude protéomique ont été mis en place pour détecter d'éventuelles protéines dont l'expression serait modulée pendant l'invasion locale des TNE-GEPs.

- **le troisième et dernier objectif** constitue la partie la plus importante de ce travail. En effet, nous évaluons le rôle de nouvelles voies de signalisation dans la progression des TNE-GEPs, pour ainsi détecter une ou plusieurs nouvelles cibles thérapeutiques et/ou marqueurs pronostiques.

## **Etudes expérimentales**

**Antitumor effect of everolimus in preclinical models of high grade gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas.**

Julien Bollard, Christophe Couderc, Martine Blanc, Gilles Poncet, Florian Lepinasse, Valérie Hervieu, Géraldine Gouysse, Carole Ferraro-Peyret, Noura Benslama, Thomas Walter, Jean-Yves Scoazec, Colette Roche.

*Publié dans Neuroendocrinology. 2013;97(4)*

L'arsenal thérapeutique destiné aux TNE-GEPs bien différenciées s'est élargi durant la dernière décennie, en partie grâce à l'émergence des thérapies ciblées. Ces progrès n'ont néanmoins pas profité à un sous-groupe particulier de TNE-GEPs, les carcinomes neuroendocrines gastroentéropancréatiques peu différenciés (pdCNE-GEPs). Ces tumeurs de haut grade constituent, dans la plupart des cas, une urgence thérapeutique. Depuis de nombreuses années, le traitement de première ligne a peu évolué et réside en une chimiothérapie combinant la cisplatine et l'étoposide (Mitry et al., 1999; Moertel et al., 1991). Des études plus récentes ont testé diverses associations (paclitaxel + carboplatine + étoposide ; carboplatine + vincristine + étoposide ; irinotécan + cisplatine) mais leurs bénéfices thérapeutiques restent similaires au traitement standard (Hainsworth et al., 2006; Olsen et al., 2012; Ramella Munhoz et al., 2013). Une étude portant sur quelques patients montre que le témozolomide pourrait être utilisé en seconde ligne après échec du standard cisplatine + étoposide (Welin et al., 2011).

Même si ces traitements chimiothérapeutiques induisent de bons taux de réponse (42% à 67% en moyenne), la survie médiane globale n'excède pas 19 mois et les récurrences sont importantes.

A ce jour, les patients atteints de pdCNE-GEPs ont été exclus des essais cliniques visant à évaluer le bénéfice des thérapies ciblées, malgré quelques données favorables.

En effet, un cas clinique récent rapporte une diminution de la taille des métastases hépatiques chez un patient atteint d'une tumeur endocrine peu différenciée du pancréas, ayant refusé la chimiothérapie et traité par sunitinib (Lin et al., 2013b). A noter que le sunitinib est actuellement évalué dans une étude clinique de phase II chez des patients atteints de pdCNE-GEPs. En 2012, c'est un patient atteint d'une tumeur peu différenciée (tumeur primaire non localisée) qui a répondu à une combinaison témozolomide + bévécizumab après échec de la première ligne (Lindholm et al., 2012).

Parmi ces thérapies ciblées, l'inhibition de mTOR n'a jamais été évaluée dans ce sous-groupe de TNE-GEPs, malgré le grand nombre d'essais cliniques conduits sur les tumeurs bien différenciées.

Pourtant, quelques études rapportent une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans les pdCNE-GEPs (Catena et al., 2011; Shida et al., 2010).

Notre étude propose d'étudier le potentiel thérapeutique de l'évérolimus dans des modèles précliniques de TNE-GEPs peu différenciées. Nos résultats montrent que mTOR et ses effecteurs (p70S6K et 4EBP1) sont exprimés dans des tumeurs peu différenciées humaines, ainsi que dans nos modèles cellulaires représentatifs de pdCNE-GEPs (STC-1 et GluTag). Le traitement de ces lignées avec l'évérolimus induit une inactivation complète de p70S6K et incomplète de 4EBP1. Lorsque ces cellules sont greffées chez la souris, le traitement des animaux par l'évérolimus induit une réduction de l'envahissement hépatique, corrélée à une baisse d'activité de mTOR *in situ*.

Ainsi, nous suggérons que la progression rapide des pdCNE-GEPs pouvait être due à une suractivation de l'axe PI3K/Akt/mTOR et nous montrons que l'inhibition de mTOR pourrait constituer une option thérapeutique pour le traitement de ces tumeurs.



# Antitumor Effect of Everolimus in Preclinical Models of High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinomas

Julien Bollard<sup>a</sup> Christophe Couderc<sup>a</sup> Martine Blanc<sup>a</sup> Gilles Poncet<sup>a, b</sup>  
Florian Lepinasse<sup>a, c</sup> Valérie Hervieu<sup>a, c</sup> Géraldine Gouysse<sup>c</sup>  
Carole Ferraro-Peyret<sup>a, c</sup> Noura Benslama<sup>a, b</sup> Thomas Walter<sup>a, b</sup>  
Jean-Yves Scoazec<sup>a, c</sup> Colette Roche<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Endocrine Differentiation and Tumorigenesis Laboratory, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, INSERM U1052-CNRS UMR5286, Université de Lyon, Faculté Laënnec, <sup>b</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Fédération des Spécialités Digestives and <sup>c</sup>Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service d'Anatomie Pathologique, Lyon, France

## Key Words

Poorly differentiated neuroendocrine tumors · Preclinical models · Animal model · mTOR · Everolimus

## Abstract

**Background/Aims:** While the range of therapeutic options for well-differentiated gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors has recently increased with the emergence of targeted therapies, such as mTOR inhibitors, there is no recent progress in the treatment of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas (PDNECs). Since PDNECs have been shown to strongly express mTOR pathway components, the aim of the present study was to assess the antitumor effect of the mTOR inhibitor everolimus in preclinical models of PDNECs. **Methods:** The expression of mTOR pathway components and their response to everolimus were assessed in two neuroendocrine cell lines: STC-1 and GluTag. A xenograft model of intrahepatic dissemination in the nude mouse, based on the intrasplenic injection of either STC-1 and GluTag tumor cells, was used. Animals were started on everolimus treatment 3 days after injection. The effects of treatment on tumor growth, proliferative capacities, apo-

ptosis and in situ expression of mTOR pathway components were assessed. **Results:** The expression of mTOR pathway components was comparable in STC-1 and GluTag cells and in human PDNECs and could be inhibited in vitro by everolimus. In vivo, the tumor volume of STC-1 and GluTag xenografts was significantly reduced in treated animals ( $6.05 \pm 1.84\%$  as compared to  $21.76 \pm 3.88\%$  in controls). Everolimus treatment also induced a significant decrease in Ki67 index and in the phosphorylation levels of the two major effectors of mTOR, p70S6K and 4E-BP1. **Conclusion:** Our experimental data suggest that mTOR inhibition could be considered a therapeutic option for high-grade gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

## Introduction

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP NETs) are a distinctive subset of malignant tumors retaining most of the structural, phenotypic and functional characteristics of normal endocrine cells of the digestive tract, which belong to the diffuse neuroendocrine cell sys-

KARGER

E-Mail karger@karger.com  
www.karger.com/nen

© 2013 S. Karger AG, Basel  
0028-3835/13/0000-0000\$38.00/0

Colette Roche  
INSERM U1052, Faculté de Médecine Laënnec  
7, rue Guillaume Paradin  
FR-69372 Lyon Cedex 8 (France)  
E-Mail colette.roche@inserm.fr

© S. Karger AG, Basel  
**PROOF Copy**  
**for personal**  
**use only**

ANY DISTRIBUTION OF THIS  
ARTICLE WITHOUT WRITTEN  
CONSENT FROM S. KARGER  
AG, BASEL IS A VIOLATION  
OF THE COPYRIGHT.

tem. Although GEP NETs are rare, their incidence and, above all, their prevalence are increasing [1]. The new WHO classification 2010 classifies GEP NETs into three main categories: NETs G1, NETs G2 and neuroendocrine carcinomas. NETs G1 and G2 are morphologically well differentiated tumors with respectively, low and intermediate proliferative capacities. Neuroendocrine carcinomas are defined as poorly differentiated tumors, with high proliferative capacities; the recent WHO classification now recognizes two types of GEP neuroendocrine carcinomas: the small cell and the large cell types [2].

GEP NETs raise difficult therapeutic problems. Surgical resection is the only curative treatment of localized primary NETs G1 and G2. Metastatic disease requires systemic treatments: the range of therapeutic options for well-differentiated NETs has recently dramatically increased, in particular with the emergence of targeted therapies, such as everolimus and sunitinib, which significantly improved progression-free survival in some subsets of NETs, such as pancreatic NETs [3, 4]. By contrast, there is no recent progress in the treatment of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas (PDNECs). The standard option for small cell neuroendocrine carcinomas remains a chemotherapy based on the combination of cisplatin and etoposide [5, 6]. However, the median survival remains very low, recurrence is constant and there is no consensus about the best strategy to adopt when a second line of treatment is required and feasible. Moreover, there is no consensus treatment for the rare and recently individualized large cell GEP neuroendocrine carcinomas.

It is therefore important to explore new therapeutic strategies for patients with GEP PDNECs. Very interestingly, Lindholm et al. [7] recently reported a response to temozolomide and bevacizumab in a patient with PDNEC, progressive on standard treatment by cisplatin and etoposide. This result not only supports the interest of the combination of temozolomide and bevacizumab as a therapeutic option, but also suggests that targeted therapies must not be neglected in PDNECs.

Everolimus is a mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor which inhibits the mTOR complex 1 (mTORC1) and the phosphorylation of its downstream effectors: p70S6kinase (p70S6K) and 4E-BP1. The mTOR pathway is a major mechanism of cellular growth and homeostasis. Its regulation is frequently altered in a large variety of tumors. mTOR thus appeared as a potential target for anticancer therapy, and its inhibition with everolimus has been approved for renal cell carcinoma treatment [8]. Several recent reports support a role for mTOR pathway in GEP NETs. In a large cohort of 99 GEP NETs,

Kasajima et al. [9] reported variations in mTOR expression and activity pattern related to tumor location and metastatic status. Downregulation or mutations of PTEN and TSC2, two key inhibitors of the mTOR pathway have been described in pancreatic NETs [10, 11], whereas rapamycin sensitivity was related to PI3kinase and PTEN mutations, as well as to the phosphorylation level of Akt [12]. Furthermore, in well-differentiated GEP NETs, two recent clinical trials reported extremely promising results with everolimus combined or not with octreotide [3, 13]. To date, since patients with PDNECs have been excluded from clinical trials, the effects of mTOR inhibitors have not been evaluated in these aggressive tumors. Interestingly, two recent studies have shown that high levels of phospho-mTOR are frequently detected in PDNECs [14, 15], which may lend some support to the therapeutic targeting of mTOR pathway in this tumor subset.

The aim of the present study was to assess the anti-tumor effect of everolimus in preclinical models of PDNECs, based on two neoplastic neuroendocrine cell lines xenografted in nude mice. We reported that everolimus exerted a strong antitumoral effect in these models, making mTOR inhibitors good candidates as therapeutic options alternative or additional to the currently recognized standard options.

## Material and Methods

### Human Tissue Samples

Tissue samples of GEP PDNECs were obtained from the collection of digestive NETs housed in the tumor tissue bank 'Tumorothèque des Hospices Civils de Lyon' (Lyon, France). Six cases were retrieved; their clinical and pathological characteristics are summarized in table 1.

### Cell Lines

The STC-1 cell line, a gift of G. Rindi (Department of Pathology and Laboratory Medicine, Roma, Italy), and the GluTag cell line, a gift of D. Drucker (Department of Medicine, Mt Sinai Hospital, Toronto, Ont., Canada), are derived from endocrine intestinal tumors developed in transgenic mice. Both cell lines retain the capacity to synthesize and secrete several neuroendocrine peptides [16, 17]. Cells were routinely cultured in DMEM supplemented with 5 or 10% fetal calf serum (FCS) (for, respectively, STC-1 or GluTag cells), 2 mM glutamine and antibiotics (100 UI/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin).

### Protein Analysis

Cells were seeded at a density of  $0.15 \cdot 10^6$  cells per well in 6-well plates and maintained 72 h under normal culture conditions. The medium was then replaced by 0.05% FCS-containing DMEM medium for 24 h. The growth factor IGF-1 (PeproTech, Rocky Hill, N.J., USA) and the mTOR signaling inhibitor everolimus (Selleck

**Table 1.** Clinical and pathological features in human patients

	Case No.					
	1	2	3	4	5	6
Sex	M	F	M	M	M	F
Age, years	61	60	64	68	68	38
Type of tissue material available	surgical specimen	biopsies	surgical specimen	surgical specimen	surgical specimen	surgical specimen
Tumor site	pancreas	rectum	cardia	duodenum	colon	appendix
Tumor size, mm	30	not assessed	75	100	35	20
Histological type	large cell	small cell	large cell	large cell	large cell	small cell
Mitotic index	5	6	8	6	5	6
Ki67 index, %	34	38	75	60	45	48
Chromogranin A	+	–	+	–	–	+
Synaptophysin	+	focal	+	+	+	+
N-CAM	+	+	+	+	+	+
Lymph node metastases	+	+	+	+	+	+

Chemicals, Houston, Tex., USA) were added for 24 h. Cells were then washed with cold PBS and lysed in cold solubilization buffer (pH 8) containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 2 mM EDTA, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 2 mM Orthovanadate, and 20 mM NaF. Cell lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 15 min at 4°C and the supernatant was stored at –80°C. Protein yield was quantified using the Bradford protein assay kit. Total protein lysates (20 µg) were separated by electrophoresis on a 7.5% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Billerica, Mass., USA). Saturation was performed in a 0.1% Tween 20 Tris-buffered saline solution containing 5% non-fat dry milk for 1 h. The membranes were hybridized with primary antibodies overnight at 4°C, washed and incubated with the corresponding immunoperoxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories; Beckman Coulter France, Roissy, France) for 1 h at room temperature. Immunodetection was performed using electrochemiluminescence (ECL Western Blotting Detection System; Covalab, Villeurbanne, France) and the Chemi-Doc XR5 machine (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France). Cross-detection between phosphorylated and total forms of the proteins of interest was avoided by stripping the membranes. Antibodies against phospho-mTOR<sup>ser2448</sup> (No. 2971), mTOR (No. 2972), phospho-p70S6K<sup>thr389</sup> (No. 9234) and p70S6K (No. 9202) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, Mass., USA). Antibodies against phospho-4E-BP1 and 4E-BP1 were from Epitomics (Burlingame, Calif., USA), Antibody against α-tubulin was from Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo., USA).

#### *In vivo Studies*

Four-week-old female Swiss nu/nu mice were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). The animals were maintained in a sterile environment and treated in accordance with ethical recommendations and guidelines of the Animal Welfare Committee of University Lyon 1. Animals were anesthetized prior to all surgical procedures. After surgery, animals were allowed to recover in a sterile atmosphere and were fed ad libitum with a sterile diet.

The xenografting procedure was as previously described [18, 19]. Briefly, 50 µl of a solution containing tumor cells adjusted to a final concentration of 5·10<sup>7</sup> cells/ml were injected into the spleen, from where they disseminated into the liver through the portal vein to form intrahepatic tumor nodules. Three days after cell injection, animals were randomized into treatment and control groups and received everolimus intraperitoneally at a dose of 1.5 mg/kg/day or vehicle only, until the end of the experiment. Animals were weighted twice a week, and sacrificed at day 28; livers were excised and prepared for histological analysis. A total of 48 mice were xenografted with STC-1 cells (24 controls, 24 treated) and 20 mice with GluTag cells (10 controls, 10 treated).

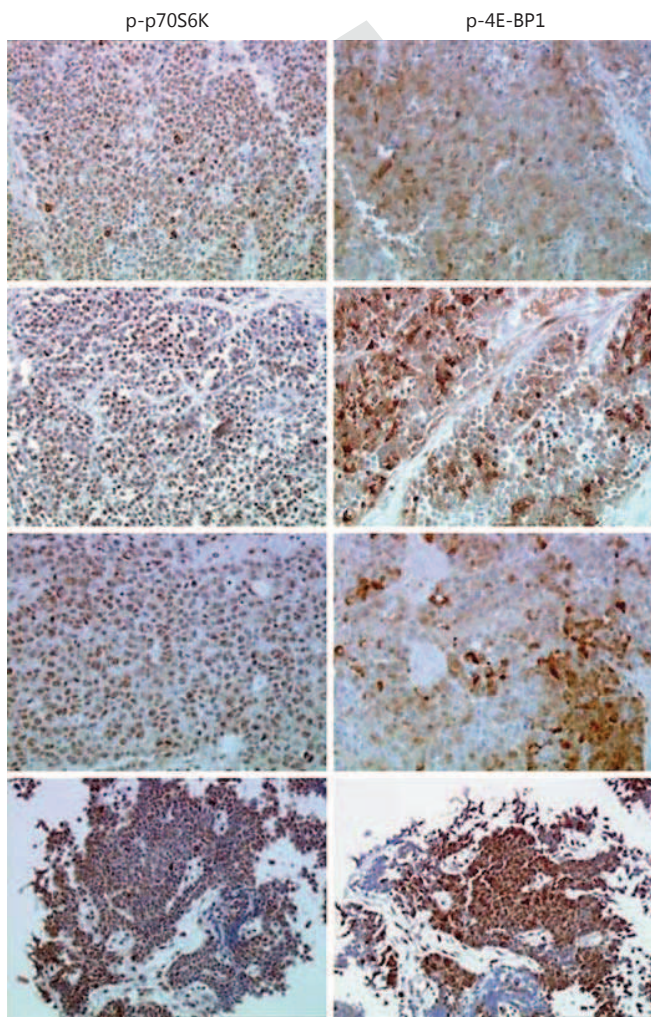
#### *Histologic Analysis and Morphometry*

Tissue samples of all animals were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. For histologic examination, 4-µm-thick sections were prepared according to conventional procedures, stained with hematoxylin-phloxin-safran and observed with a light microscope. The amount of intrahepatic tumor tissue was evaluated by morphometry (Histolab; Microvision Instruments, Evry, France). The total surface occupied by tumor tissue was defined as the sum of each individual lesion and was expressed as a percentage of the total surface of the corresponding reference tissue section. The same procedure was followed to determine the number of nodules and the mean nodule surface.

#### *Immunohistochemical Analysis*

Immunohistochemistry was performed using a panel of primary antibodies against phospho-mTOR<sup>ser2448</sup> (Abcam, Cambridge, UK), phospho-p70S6K (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA), phospho-4E-BP1 (Epitomics, Burlingame, Calif., USA), Ki67 (clone TEC3, Dako, Glostrup, Denmark) and active caspase 3 (R&D Systems, Lille, France).

Antigen retrieval was performed by incubating sections for 35 min in a citrate buffer (pH 6) preheated at 98°C. A standard horse-radish peroxidase staining procedure was followed using an appropriate biotinylated antibody and the EnVision™ detection kit



**Fig. 1.** p-p70S6K and p-4E-BP1 expression patterns in 4 cases of PDNECs. Immunoperoxidase.  $\times 120$ .

(Dako, Trappes, France). All sections were counterstained with Meyer's hematoxylin. Negative controls were achieved by omission of the primary antibody.

The proliferation index of tumor cells was determined by counting the number of nuclei positive for Ki67 antigen in 1,000 cells (at least 200 cells per nodule); the result was expressed as the percentage of labeled cells. The same method was applied for evaluating the percentage of cells expressing active caspase 3.

#### Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out with StatView (SAS Institute). Differences in viability and morphometric data were investigated by using the Mann-Whitney U test.  $p < 0.05$  was considered statistically significant. The results are shown as the mean  $\pm$  SEM.

## Results

### *Expression of mTOR Signaling Pathway in Human GEP PDNECs*

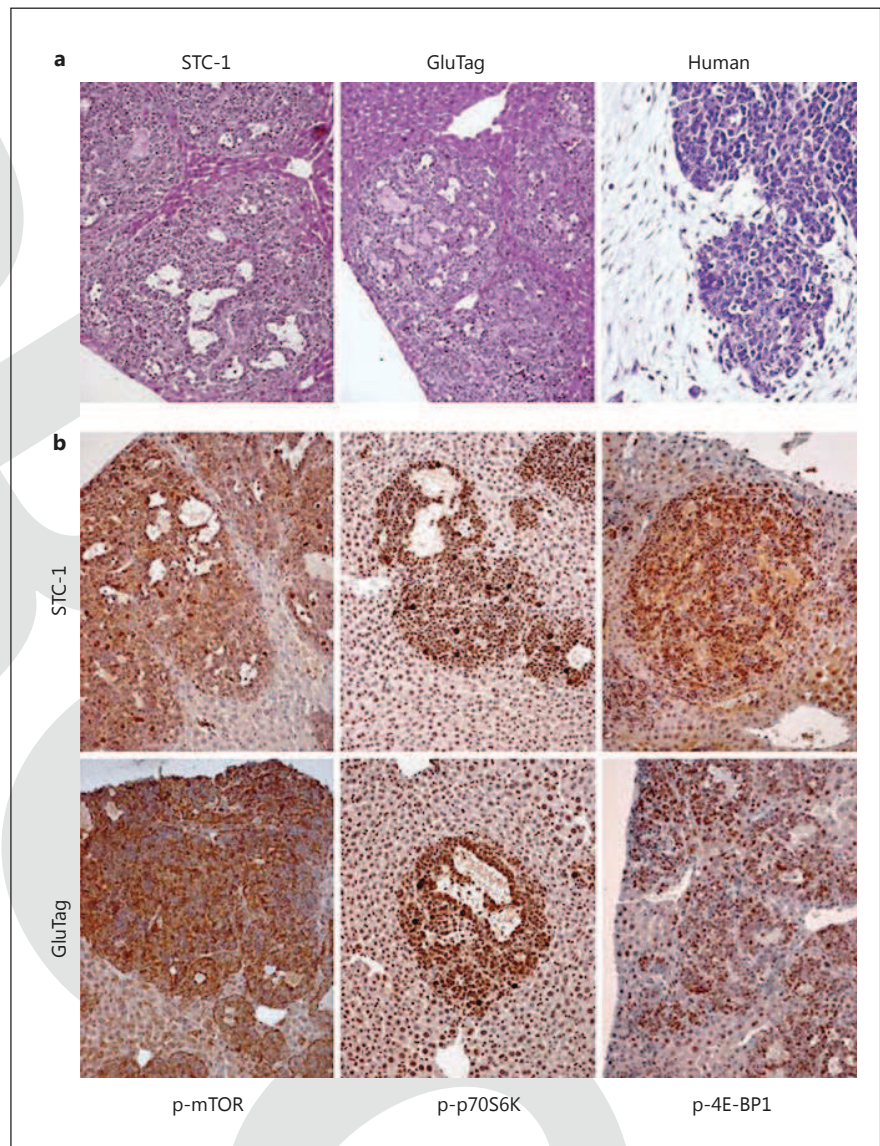
In the 6 cases of GEP PDNECs retrieved from our collection (table 1), we evaluated the apparent expression levels of the two major effectors of mTOR: phospho-p70S6K and phospho-4E-BP1 by immunohistochemistry. In all tumors examined, including 2 cases of small cell PDNECs and 4 cases of large cell PDNECs, the majority of neoplastic cells exhibited a strong expression of the two proteins. As illustrated in figure 1, phosphorylated p70S6K was detected in the nucleus of tumor cells, whereas the distribution of phosphorylated 4E-BP1 was nuclear and cytoplasmic.

### *STC-1 and GluTag Cell Lines Mimic PDNECs in vivo*

Among the various neuroendocrine cell lines used in the laboratory, we selected STC-1 and GluTag because the tumors derived from these cells xenografted to nude mice closely resemble human PDNECs. As shown in figure 2a, intrahepatic nodules derived from xenografted STC-1 and GluTag were formed by neoplastic cells with neuroendocrine morphology. Tumor nodules were made of solid sheets of neoplastic cells interspersed with small cystic spaces filled with red blood cells. Neoplastic cells were small- to medium-sized, with a high nucleo-cytoplasmic ratio, their cytoplasm was basophilic, and the nuclei were large with a granular, finely dispersed chromatin sometimes containing one or several small nucleoli. The overall architecture and cell morphology were therefore reminiscent of those observed in human GEP PDNECs.

We analyzed by immunohistochemistry the expression of phosphorylated forms of mTOR, 4E-BP1 and p70S6K in the intrahepatic nodules of xenografted mice. A strong expression of phosphorylated mTOR, p70S6K and 4E-BP1 was detected in both STC-1- and GluTag-derived intrahepatic nodules (fig. 2b). These results showed that the expression profile of the major effectors of the mTOR pathway in our experimental tumors was comparable to that observed in human GEP PDNECs. Furthermore, the Ki-67 index was  $52.0 \pm 4.2$  and  $30.5 \pm 2.4\%$  in STC-1- and GluTag-derived intrahepatic nodules, respectively, which is in the range usually observed in PDNECs.

These morphological and immunophenotypic observations confirmed that STC-1- and GluTag-derived tumors, despite some differences, such as the capacities of hormone secretion [16, 17], could be considered representative of human high grade GEP neuroendocrine neoplasms because of their morphology, functional properties, high proliferative capacities and rapid growth.



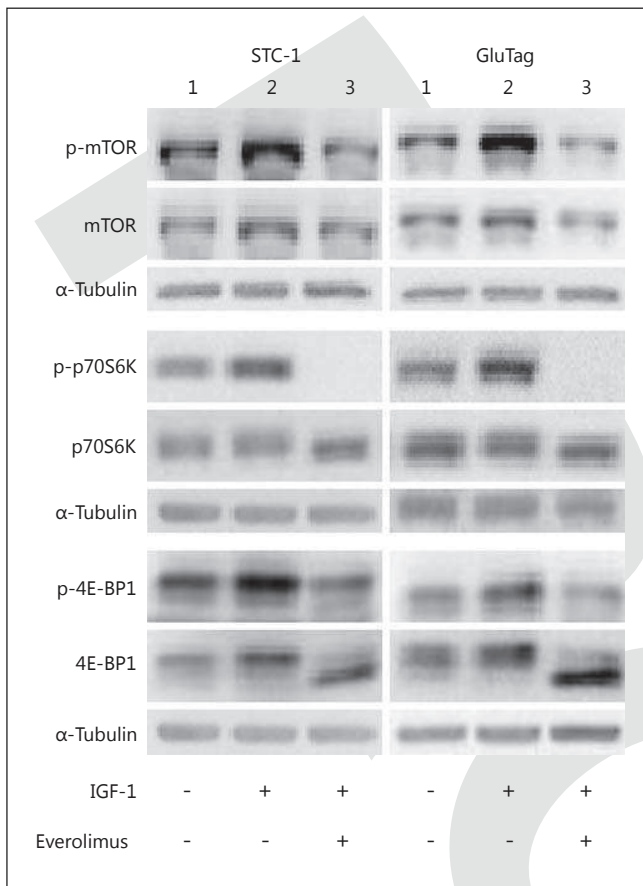
**Fig. 2.** STC-1 and GluTag cell lines mimic PDNECs. **a** Intrahepatic nodules induced after STC-1 or GluTag xenografts were closely related to human PDNEC. **b** STC-1- and GluTag-induced intrahepatic nodules strongly expressed phosphorylated forms of mTOR, p70S6K and 4E-BP1.  $\times 20$ .

#### *Effects of Everolimus on the mTOR Signaling Pathway in vitro*

We then verified that both cell lines constitutively express a functional mTOR pathway in vitro. The expression of total and phosphorylated forms of mTOR, p70S6K and 4E-BP1 was assessed by Western blotting after protein extraction on cells maintained in normal culture conditions. The proteins mTOR, p70S6K and 4EB-P1 were expressed and furthermore, highly phosphorylated in both STC-1 and GluTag cell lines (fig. 3, lane 1).

We then examined whether everolimus can inhibit the mTOR signaling pathway in STC-1 and GluTag

cells. To address this question, cells were treated with 3 nM exogenous IGF-1 to mimic the microenvironment conditions of the tumors. As shown in figure 3, lane 2, IGF-1 was able to increase the phosphorylation of mTOR, p70S6K and 4E-BP1. Everolimus (11 nM) reduced IGF-1-induced phosphorylation of mTOR to the basal level, whereas it induced complete abrogation of p70S6K and 4E-BP1 phosphorylation in both cell lines (fig. 3, lane 3). These results showed that everolimus totally inhibited the action of the effectors of mTOR in STC-1 and GluTag cells.



**Fig. 3.** Effect of everolimus on the mTOR pathway in STC-1 and GluTag cell lines by Western blot analysis after protein extraction. Lane 1: STC-1 and GluTag cells expressed high levels of mTOR, p-mTOR, p70S6K, p-p70S6K, 4E-BP1 and p-4EB-P1 in normal culture conditions. Lanes 2 and 3: the mTOR pathway was stimulated with IGF-1 (3 nM) and the effect of everolimus (11 nM) was assessed in the presence of IGF-1 at 24 h. IGF-1 promoted the phosphorylation of mTOR, p70S6K and 4E-BP1 in both STC-1 and GLUTag cells, whereas everolimus reversed the IGF-1-induced phosphorylation. Representative of at least three independent experiments.

#### Effects of Everolimus on Tumor Development in Xenograft Models

The effect of everolimus on the development of STC-1- and GluTag-derived intrahepatic tumor nodules was assessed in the experimental model of intrahepatic dissemination after intrasplenic injection of tumor cells [18, 19]. Everolimus treatment strongly inhibited tumor development in vivo. In STC-1-xenografted mice, the total tumor tissue surface evaluated to  $14.84 \pm 2.06\%$  in control animals was significantly reduced to  $2.51 \pm 0.6\%$  in treated

animals ( $p < 0.05$ ). Similar results were obtained in GluTag-xenografted mice: the total tumor surface was significantly decreased from  $21.76 \pm 3.88\%$  in control animals to  $6.05 \pm 1.84\%$  in treated animals ( $p < 0.05$ ) (fig. 4). As shown in figure 4, everolimus-induced reduction of tumor surface was the result of a decrease of the number of tumor nodules as well as their mean surface in both STC-1- and GluTag-xenografted mice.

Ki67 index determined in STC-1-derived intrahepatic nodules was  $52.0 \pm 4.2\%$  in control animals as compared to  $41.33 \pm 2.56\%$  in treated animals. Similar results were obtained in GluTag-derived intrahepatic nodules where Ki67 index was  $30.5 \pm 2.4\%$  in control animals as compared to  $20.44 \pm 0.95\%$  in treated animals. The differences were statistically significant ( $p < 0.05$ ). These results suggested that the reduction in tumor mass observed under everolimus was, at least in part, due to an in vivo antiproliferative effect of the drug. In contrast, no difference was observed in the percentage of cells expressing active caspase 3 between control and treated animals.

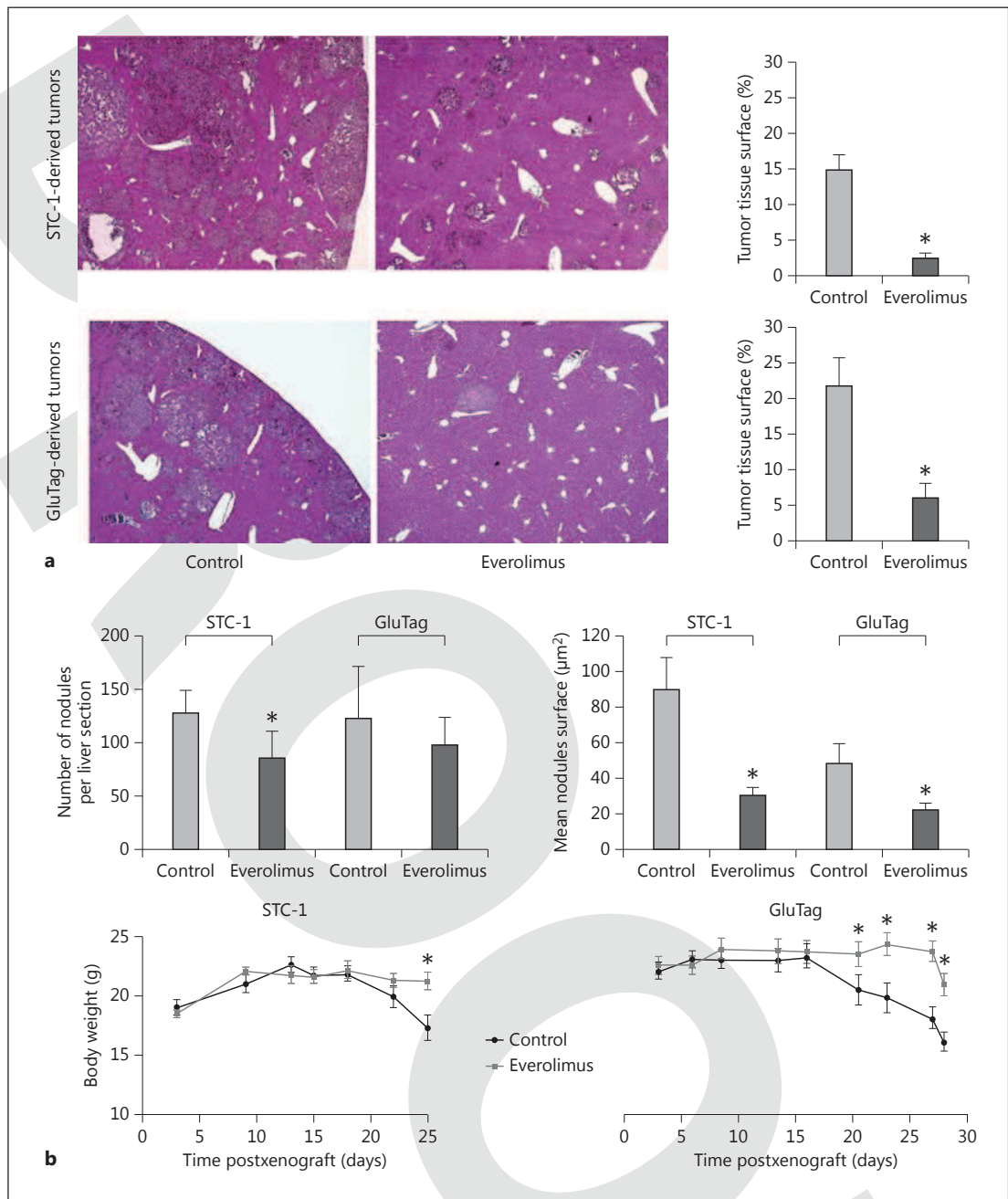
Interestingly, body-weight curves indicated a significant stabilization of the weight of treated animals, whereas control animals lost weight from day 18 in both experiments (fig. 4c, d). This result suggests that everolimus treatment may be able to improve the clinical status of the animals xenografted with either STC-1 or GluTag cells.

#### Antitumor Effect of Everolimus Was Correlated to the Inhibition of mTOR Signaling

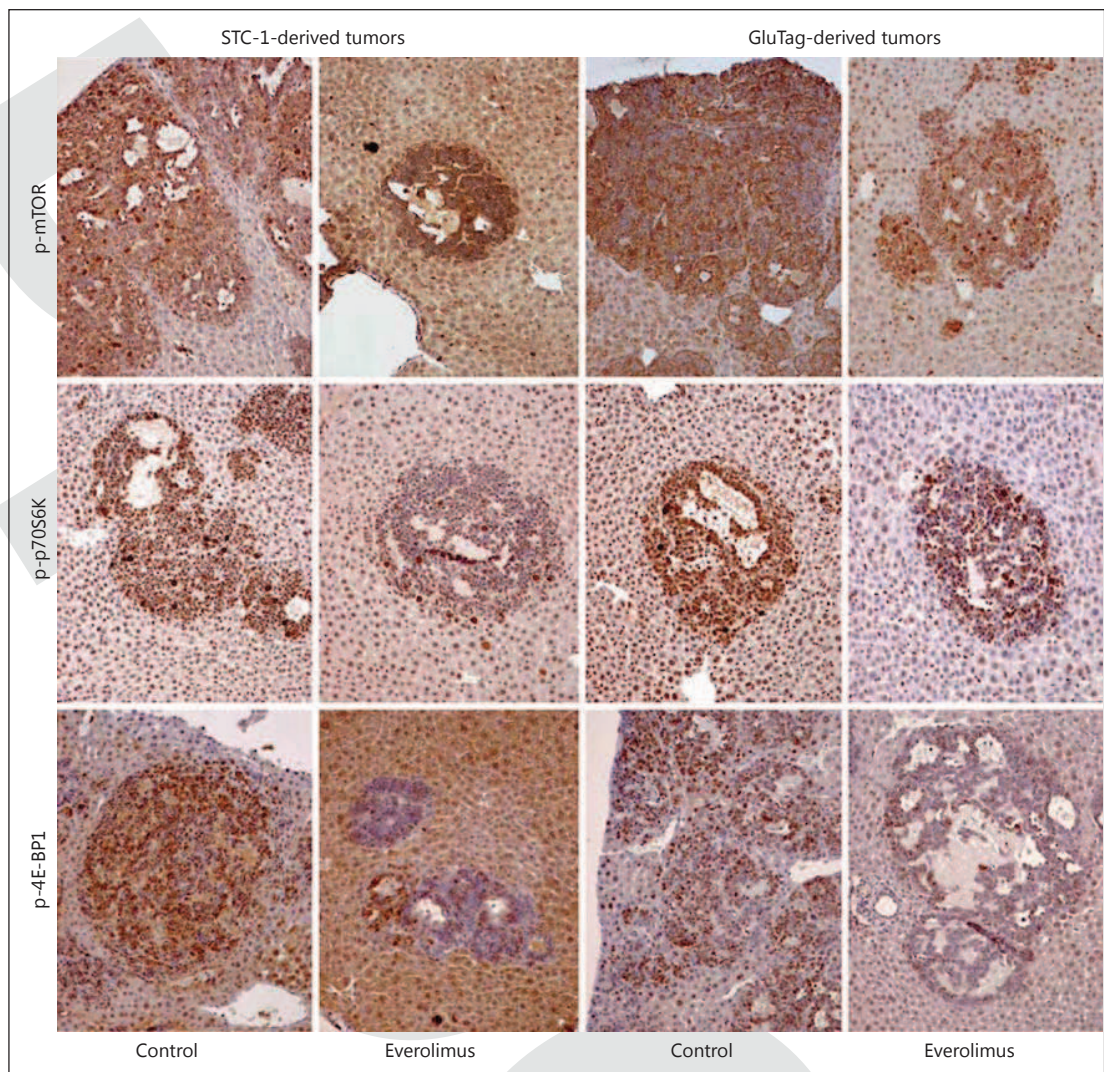
To assess whether the antitumor property of everolimus in vivo was associated with the inhibition of the mTOR signaling pathway, we analyzed by immunohistochemistry the expression of phosphorylated forms of mTOR, 4E-BP1 and p70S6K in the intrahepatic nodules of xenografted mice. While the expression of phospho-mTOR remained unchanged in treated mice, the apparent expression levels of phospho-4E-BP1 and phospho-p70-S6K were greatly reduced in everolimus-treated animals bearing both STC-1- and GluTag-derived tumors (fig. 5).

#### Discussion

PDNECs amount up to only 5–10% of GEP NETs and, while they may occur anywhere in the gastrointestinal tract, they predominate in the hindgut. The recent WHO classification recognized two distinct morphological subtypes: the small cell type and the large cell type. Despite the current treatments, based on the combination etopo-



**Fig. 4.** In vivo effects of everolimus in a xenograft model. Everolimus (1.5 mg/kg/day) or vehicle was administered to mice during 25–28 days following intrasplenic graft. **a** Histologic and morphometric analyses of intrahepatic tumors after STC-1 and GLUTag xenografts. Control liver displayed large intrahepatic nodules while only few small nodules invaded the liver of treated mice. HPS staining,  $\times 4$ . The total tumor tissue surface was significantly reduced upon everolimus treatment ( $* p < 0.05$ ). **b** Everolimus reduced the number of intrahepatic nodules as well as the surface of the nodules ( $* p < 0.05$ ). Everolimus treatment delayed the loss of weight observed in control mice from day 18, either in STC-1- or GluTag-xenografted mice.



**Fig. 5.** Effect of everolimus on the expression pattern of the mTOR pathway in STC-1- and GluTag-derived intrahepatic tumors: whereas the expression of p-mTOR remained stable, p-p70S6K and p-4EB-P1 expression was reduced by everolimus treatment.  $\times 20$ .

side-cisplatin, the prognosis of both subtypes is poor, with median survival durations in patients with localized, regional and distant disease of 34, 14 and 5 months, respectively [1]. It is therefore important to search for new therapeutic strategies in order to improve the efficacy of first- or second-line therapies for these very aggressive tumors. In this context, Lindholm et al. [7] described a dramatic response to a combination of temozolomide, an alkylating agent, and bevacizumab, a monoclonal antibody targeting tumor angiogenesis, after failure of cisplatin and etoposide. This study demonstrated the potential

antitumor effect of the anti-VEGF antibody bevacizumab combined with temozolomide. Other targeted therapies have never been evaluated in PDNECs.

The rarity of these tumors has so far hampered the development of clinical trials. In this context, we designed preclinical models of PDNECs on the basis of two tumor endocrine cell lines: STC-1 and GluTag. Tumors derived from STC-1 or GluTag cells xenografted to nude mice present strong morphological similarities with human PDNECs: overall architecture, cell morphology and high proliferative capacities. Some differences must be ac-



knowledge: STC-1 and GluTag cells retain capacities of hormone synthesis and secretion [16, 17], in contrast to most human PDNECs, and do not harbor *TP53* mutations, which are frequent in PDNECs [20]. Despite these functional and molecular differences, STC-1 and GluTag can be considered as representative of high grade human neuroendocrine neoplasms because of their high proliferative capacities and rapid growth.

Among targeted therapies, the antitumor activity of everolimus, an oral inhibitor of mTOR, was recently demonstrated in well-differentiated GEP NETs: the RADIANT 3 trial reported a significant increase of progression-free survival from 4.6 months with placebo to 11 months with everolimus in patients with advanced pancreatic NETs [3]. In patients with carcinoid syndrome, the combination of everolimus and octreotide had an almost significant effect on progression-free survival [13]. Recent observations in the literature supported a rationale to evaluate this therapy in patients with PDNECs. First of all, Shida et al. [14] compared the expression of phospho-mTOR between well-differentiated and poorly differentiated neuroendocrine neoplasms. The authors observed a high expression of phospho-mTOR in 67% of PDNECs, as compared to 27% of well-differentiated NETs and carcinomas. Secondly, Catena et al. [15] studied the expression of phospho-mTOR in a series of 36 patients diagnosed with PDNECs. A high expression of phospho-mTOR was observed in 80% of these tumors. Furthermore, in a phase II study evaluating the effect of temsirolimus (another mTOR inhibitor) in advanced neuroendocrine carcinomas, higher baseline levels of phospho-mTOR were predictive of tumor response and decrease in phospho-mTOR after temsirolimus treatment was associated with increased time to progression [21].

In the present study, we also demonstrated a strong expression of phospho-mTOR and its related effectors in several cases of PDNECs obtained from our tumor collection. Moreover, STC-1 and GluTag cell lines demonstrated a high activity of the mTOR pathway in vitro, which can be easily reduced by everolimus. We thus treated STC-1 and GluTag-xenografted mice with everolimus, and evaluated the antitumor effect of this mTOR inhibitor 4 weeks later. First of all, everolimus was able to reduce the weight loss induced by growing tumors, thus improving the clinical status of the animals. We cannot definitively exclude that this effect could be mediated, at least in part, through a decrease in hormone release from neoplastic cells, either indirectly through the reduction of tumor mass, or directly through an inhibitory effect of everolimus on hormone secretion, as described in some

clinical situations. This may be particularly the case for the two cell lines used in this study, since GLP-1, produced by STC-1 cells [16], and glucagon, produced by GluTag cells [17], are suspected to play a role in cancer cachexia and anorexia [22]. The differences observed between the body-weight curves of STC-1- and GluTag-bearing animals may be due to a major catabolic effect of glucagon or to a major hormone production.

At the tumor level, everolimus induced a decrease of the number of nodules as well as their mean surface, resulting to a dramatic decrease of the total tumor surface. This was concomitant with a clear decrease of the phosphorylation level of the two major effectors of mTOR, p70S6K and 4E-BP1, inside the tumor nodules. Our data suggest that this important reduction in tumor mass is due to a decrease in proliferation rather to an increase in apoptosis, since we found a significant decrease in Ki67 index between control and treated animals, but no difference in the percentage of cells expressing active caspase 3. Additional effects of everolimus treatment may be also involved, such as the antiangiogenic effect we previously observed with another mTOR inhibitor, rapamycin, in a comparable preclinical model [19].

Our results, together with those of the literature, strongly suggested that the rapid progression of PDNECs could be related to the high activity of the mTOR pathway in these tumor cells. The results obtained with preclinical models supported the potential interest of the mTOR inhibitors as effective anti-tumor agents for these highly malignant tumors. As suggested by the success of the combination bevacizumab and temozolomide [7], the use of the mTOR inhibitors should probably be considered in combination with other molecules such as chemotherapeutic agents or other targeted therapies. Indeed, a stronger efficacy should be obtained by targeting mTOR pathway at several levels, such as PI3kinase and mTOR levels, by using new inhibitors targeting both complexes mTORC1 and mTORC2, or by targeting several pathway simultaneously (mTOR and MAPkinase pathways) [23, 24]. If further clinical studies are now needed, our data suggest that mTOR inhibition could be considered a therapeutic option for high grade GEP NETs.

### Acknowledgements

The authors thank Nicolas Gadot and Armelle Paquet from the Anipath platform (Université de Lyon) for their assistance in histologic and morphometric analyses.

This study was supported by a grant from the Comité de la Drôme de la Ligue contre le Cancer (C.R.).

## References

- 1 Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey J-N, Rashid A, Evans DB: One hundred years after 'carcinoid': epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26:3063–3072.
- 2 Rindi G, Klimstra DS, Arnold R, Klöppel G, Bosman FT, Komminoth P, Perren A. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system; in Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (eds): *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Lyon, IARC, 2012, pp 13–14.
- 3 Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EGE, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K: Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364:514–523.
- 4 Raymond E, Dahan L, Raoul J-L, Bang Y-J, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen J-S, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzsniwski P: Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364:501–513.
- 5 Moertel CG, Kvols LK, O'Connell MJ, Rubin J: Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer* 1991;68:227–232.
- 6 Mitry E, Baudin E, Ducreux M, Sabourin JC, Rufié P, Aparicio T, Aparicio T, Lasser P, Elias D, Duvallard P, Schlumberger M, Rougier P: Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br J Cancer* 1999;81:1351–1355.
- 7 Lindholm DP, Eriksson B, Granberg D: Response to temozolomide and bevacizumab in a patient with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma. *Med Oncol* 2012;29:301–303.
- 8 Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A: Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008;372:449–456.
- 9 Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, Noske A, Stenzinger A, Sasano H, Dietel M, Denkert C, Röcken C, Wiedenmann B, Weichert W: mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 2011;18:181–192.
- 10 Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, delle Fave G, Pederzoli P, Croce CM, Scarpa A: Pancreatic endocrine tumours: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J Clin Oncol* 2010;28:245–255.
- 11 Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N: DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 2011;331:1199–1203.
- 12 Meric-Bernstam F, Akcakanat A, Chen H, Do K-A, Sangai T, Adkins F, Gonzalez-Angulo AM, Rashid A, Crosby K, Dong M, Phan AT, Wolff RA, Gupta S, Mills GB, Yao J: PIK3CA/PTEN mutations and Akt activation as markers of sensitivity to allosteric mTOR inhibitors. *Clin Cancer Res* 2012;18:1777–1789.
- 13 Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebwohl D, Jehl V, Wolin EM, Oberg K, Van Cutsem E, Yao JC: Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2011;378:2005–2012.
- 14 Shida T, Kishimoto T, Furuya M, Nikaido T, Koda K, Takano S, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Tanizawa T, Nakatani Y, Miyazaki M: Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:889–893.
- 15 Catena L, Bajetta E, Milione M, Ducceschi M, Valente M, Dominoni F, Colonna V: Mammalian target of rapamycin expression in poorly differentiated endocrine carcinoma: clinical and therapeutic future challenges. *Target Oncol* 2011;6:65–68.
- 16 Rindi G, Grant SG, Yiangou Y, Ghatei MA, Bloom SR, Bautch VL, Solcia E, Polak JM: Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol* 1990;136:1349–1363.
- 17 Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL: Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol* 1994;8:1646–1655.
- 18 Pourreyron C, Poncet G, Roche C, Gouysse G, Nejjari M, Walter T, Villaume K, Jacquier M-F, Bernard C, Dumortier J, Chayvialle J-A, Bachelot T, Scoazec J-Y: The role of angiogenesis in endocrine liver metastases: an experimental study. *J Surg Res* 2008;144:64–73.
- 19 Couderc C, Poncet G, Villaume K, Blanc M, Gadot N, Walter T, Lepinasse F, Hervieu V, Cordier-Bussat M, Scoazec J-Y, Roche C: Targeting the PI3K/mTOR pathway in murine endocrine cell lines: in vitro and in vivo effects on tumor cell growth. *Am J Pathol* 2011;178:336–344.
- 20 Rindi G, Bordi C: Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: aetiology, molecular pathogenesis and genetics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:519–534.
- 21 Duran I, Kortmanský J, Singh D, Hirte H, Kocha W, Goss G, Le L, Oza A, Nicklee T, Ho J, Birle D, Pond GR, Arboine D, Dancy J, Aviel-Ronen S, Tsao M-S, Hedley D, Siu LL: A phase II clinical and pharmacodynamic study of temsirolimus in advanced neuroendocrine carcinomas. *Br J Cancer* 2006;95:1148–1154.
- 22 Inui A: Cancer anorexia-cachexia syndrome. Are neuropeptides the key? *Cancer Res* 1999;59:4493–4501.
- 23 Albert S, Serova M, Dreyer C, Sablin M-P, Faivre S, Raymond E: New inhibitors of the mammalian target of rapamycin signaling pathway for cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:919–930.
- 24 Laplante M, Sabatini DM: mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;149:274–293.

**Mechanisms of local invasion in enteroendocrine tumors: identification of novel candidate proteins in an experimental mouse model by a proteomic approach and validation in human tumors.**

Christophe Couderc, Julien Bollard, Gilles Poncet, Stéphane Pourpe, Yohann Couté, Florian Lepinasse, Valérie Hervieu, Patrick Massoma, Nicolas Gadot, Jean-Charles Sanchez, Jean-Yves Scoazec, Jean-Jacques Diaz, Colette Roche.

*En cours de préparation*

Malgré l'essor des thérapies ciblées et des nombreux inhibiteurs qui font l'objet d'études précliniques et cliniques, les taux de réponse objective (rémission tumorale) dépassent rarement les 10% dans les TNE-GEPs. De plus, les toxicités engendrées par les molécules thérapeutiques ainsi que les résistances développées par les tumeurs limitent l'efficacité des thérapies ciblées. Même si les études actuelles visent à améliorer ces thérapies (notamment en termes de combinaisons et de séquences), et à mieux sélectionner les patients, il semble primordial d'accroître l'arsenal thérapeutique pour les TNE-GEPs, particulièrement pour les tumeurs neuroendocrines intestinales, que peu d'études précliniques et cliniques concernent.

Pour trouver de nouvelles cibles thérapeutiques ou marqueurs pronostiques, il semble pertinent de s'intéresser à l'étape-clé de la progression tumorale entéroendocrine, l'invasion locale. En effet, le caractère invasif d'une tumeur entéroendocrine est avéré lorsque les cellules tumorales franchissent la musculature propre, conduisant ainsi au développement de métastases. De plus, et contrairement aux adénocarcinomes gastro-intestinaux classiques, les TNE-GEPs ne présentent pas de marque de transition épithélio-mésenchymateuse (Hervieu et al., 2006), qui pourraient promouvoir l'invasion locale.

Pour étudier ce phénomène d'invasion locale, notre groupe a développé un modèle de xénogreffe orthotopique chez la souris athymique. Ce modèle permet l'obtention de tumeurs à différents stades d'invasion : après deux semaines post-greffe, la tumeur est non invasive tandis qu'à huit semaines, la tumeur a envahi la lamina propria et induit des métastases hépatiques (Poncet et al., 2009). Une étude protéomique a ensuite permis de détecter les protéines dont l'expression variait au minimum d'un facteur 2 entre les deux stades considérés. Certaines protéines candidates ont ensuite été sélectionnées et validées par immunohistochimie et western-blot sur les tumeurs expérimentales. Nous montrons une expression modifiée de sept protéines, toutes impliquées dans le maintien de la structure du cytosquelette, ou dans sa régulation. Parmi celles-ci, quatre ont fait l'objet d'une

validation sur des tumeurs entéroendocrines humaines : CRMP2, Tpm2, TCP1ε et 14.3.3γ. Les rôles de ces quatre protéines dans les mécanismes d'invasion locale des tumeurs entéroendocrines restent à préciser.

**Mechanisms of local invasion in enteroendocrine tumors: identification of novel candidate proteins in an experimental mouse model by a proteomic approach and validation in human tumors.**

Christophe Couderc<sup>1</sup>, **Julien Bollard**<sup>1</sup>, Gilles Poncet<sup>1,2</sup>, Yohann Couté<sup>3</sup>, Florian Lepinasse<sup>1,4</sup>, Valérie Hervieu<sup>1,4</sup>, Patrick Massoma<sup>1</sup>, Nicolas Gadot<sup>5</sup>, Jean-Charles Sanchez<sup>3</sup>, Jean-Yves Scoazec<sup>1,4</sup>, Jean-Jacques Diaz<sup>6</sup>, Colette Roche<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon UMR INSERM U1052, CNRS 5286, Equipe « Différenciation endocrine et tumorigenèse », Faculté Laënnec, F-69372 Lyon, France ; <sup>2</sup>Chirurgie Digestive, Hôpital Edouard Herriot, F-69437 Lyon, France ; <sup>3</sup>Département de biologie structurale et bioinformatique, Biomedical Proteomics Research Group, Centre Médical Universitaire, Genève, Suisse ; <sup>4</sup>Centre de Biologie et de Pathologie, Hôpital Edouard Herriot, F-69437 Lyon, France ; <sup>5</sup>Plateforme Anipath, Fédération de Recherche Santé Lyon-Est, Lyon, France ; <sup>6</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon UMR INSERM U1052, CNRS 5286, Equipe « Domaines nucléaires et pathologies » Centre Léon Bérard, F-69373 Lyon, France.

*Running title:* Mechanisms of endocrine tumor progression

*Correspondance:* Colette Roche  
INSERM U1052  
Faculté de Médecine Laënnec  
7 rue Guillaume Paradin  
69372 LYON Cedex 8, France  
[colette.roche@inserm.fr](mailto:colette.roche@inserm.fr)  
tel 33 478778603  
fax 33 478778780

*Disclosures:* The authors disclose no potential conflicts

*Financial support:* This study was supported by a grant from the Comité de la Drôme de la Ligue contre le Cancer (C.R)

## ABSTRACT

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are rare and heterogeneous neoplasms. One of the key events in GEP-NETs progression is the local invasion of surrounding tissue by tumor cells, thus paving the way for the development of metastases. Due to a poor knowledge of the molecular mechanisms leading to local invasion and dissemination, these tumors lack suitable biomarkers.

To gain further insights into the biological processes that drive GEP-NETs cells local invasion, we used an orthotopic xenograft mouse model reproducing local invasion and metastatic dissemination. A subcutaneous tumor was obtained by injection of GEP-NETs cells. Fragments of this tumor were grafted into the caecum wall of another mouse. The tumor progression followed a well-defined time course from a non-invasive stage at 2 weeks post-graft to an invasive one at 8 weeks. Tumor tissue samples of these 2 stages were recovered and subjected to a proteomic analysis. Proteins that displayed at least a 2-fold differential expression between the two stages were identified by spectrometry. We finally selected 4 candidate proteins (CRMP2, TCP1 $\epsilon$ , Tpm2 and 14-3-3 $\gamma$ ) which were then validated in both experimental tumors and human by immunohistochemistry and/or western-blot. These four proteins are known for their involvement in the cytoskeleton dynamic. This work identifies novel biomarkers of invasive stage in GEP-NETs defining thus a new potential class of protein whose therapeutic potential must be demonstrated.

*Keywords: GEP-NETs, proteomic, spectrometry, local invasion, cytoskeleton*

## INTRODUCTION

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are uncommon neoplasms, retaining most of the phenotypic and functional characteristics of the normal peptidergic endocrine cells present throughout the digestive tract. One of the main clinical problems raised by GEP-NETs is their highly variable behavior, which ranges from benign to high grade malignant and which, in most cases, cannot be accurately predicted from the histological appearance of neoplastic cells. In the digestive tract, it is recognized that one objective sign of malignancy is the appearance of local invasion, defined by the invasion of muscularis propria. The invasion of muscularis propria by neoplastic cells is an important step in the natural history of digestive GEP-NETs, since it is associated with an increased risk of regional and distant metastasis. This distinguishes GEP-NETs from gastro-intestinal adenocarcinomas, in which the risk of metastatic dissemination begins at a much lower depth of invasion, as soon as the epithelial basement membrane of the surface epithelium is disrupted and the lamina propria of the mucosal layer is colonized.

Recently, the mechanisms of tumor cell invasion have been the subject of intensive studies.<sup>1</sup> Several modalities have been described and the corresponding cellular and molecular events have been, at least in part, uncovered. They associate increased cell motility, cytoskeletal reorganization, matrix remodeling and changes in cell-cell and cell-matrix interactions. However, recent studies of tumor cell invasion have mainly focused on carcinomas and the mechanisms of local invasion in digestive GEP-NETs remain poorly known. Several distinctive characters suggest that they deserve specific attention. In contrast to adenocarcinomas, which are destructive and progress mainly through individual cell migration, digestive GEP-NETs usually respect the overall architecture of the muscle layers and progress according to a collective multicellular process, through small strands of neoplastic cells running between adjacent muscle cells or along nerve fibers. Moreover, no

evidence of epithelio-mesenchymal transition, frequently observed in conventional gastrointestinal adenocarcinomas, has been described in invasive GEP-NETs.<sup>2</sup> This strongly suggests that the cellular and molecular mechanisms of local invasion occurring in digestive GEP-NETs cannot be directly extrapolated from those operating in the much more common adenocarcinomas of the digestive tract.

To gain insight into the mechanisms of local invasion in digestive GEP-NETs, several strategies might be considered. Gene expression profiling may be useful to identify new molecular mechanisms, but the rarity of GEP-NETs hampers the constitution of large, homogeneous and representative series of human tumors. Moreover, most GEP-NETs are diagnosed at a locally invasive and often metastatic stage, making it impossible to study the early steps of tumor cell invasion. Finally, as for other tumors, the key molecular and cellular events involved in GEP-NET invasion are restricted in time and space and are therefore difficult to detect by using global analyses of molecules with short life span and low expression levels such as RNA. This likely explains why, so far, studies of gene expression profiles in GEP-NETs have provided no sufficient information accounting for the mechanisms of local invasion.<sup>3-8</sup>

We therefore decided to explore an alternative strategy. We used an experimental model of orthotopic neuroendocrine tumor xenograft making it possible to explore the initial steps, in an animal model, of the invasion of muscularis propria by tumor cells and performed a proteomic approach, in order to directly explore proteins which are relevant molecules from both the biological and the clinical points of view.<sup>9</sup> We then validated the candidate proteins suggested by the proteomic analysis of our experimental model in a series of human GEP-NETs.



## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and experimental animal model

The intestinal STC-1 cell line, a gift from Guido Rindi (Department of Pathology, Laboratory Medicine, Parma, Italy), is derived from an endocrine tumor developed in the small intestine of a double transgenic mouse.<sup>10</sup> STC-1 cell line was routinely cultured in DMEM supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 2 mmol.L<sup>-1</sup> glutamine and antibiotics (100 UI.mL<sup>-1</sup> penicillin plus 50 mmol.L<sup>-1</sup> streptomycin).

The xenografting procedure was performed as previously described.<sup>9</sup> Female athymic nu/nu CD-1 nude mice at 4 weeks of age were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). The animals were maintained in a sterile environment and treated in accordance with ethical recommendations and guidelines of animal welfare committee of University Lyon 1. Animals were anesthetized prior to all surgical procedures. After surgery, animals were allowed to recover in a sterile atmosphere and were fed ad libitum with a sterile diet.

Briefly, subcutaneous tumors were first obtained after injection of STC-1 cell suspensions. Two weeks later, small fragments of these tumors were then grafted in the adventitial layer of the caecal wall of nude mice and allowed to develop during 2 or 8 weeks. At the end of the experiment, the animals were sacrificed; the primary tumor at the site of grafting was resected under magnifying glasses and treated either for proteomic analysis or for Western blot and histological analysis. Lymph nodes and liver were also removed for further histological analysis.

## **Proteomic analysis**

### ***Tissue sample preparation***

Primary tumor samples were harvested in lysis buffer (8 M urea, 4% CHAPS and 40 mM Tris base) on ice. The lysate was centrifuged at 12000 rpm at 4°C for 5 min to remove cell debris. The supernatant was taken as extracted proteins and the protein concentration was determined by the Bradford method with BSA as standard.

### ***2-D electrophoresis (2-DE)***

First dimension isoelectric focusing was carried out using an EtanIPGphor isoelectric focusing system, as described by the manufacturer. The protein quantity used for each analytic gel was 100 µg. For rehydration, protein was diluted to 340 µl in a buffer containing 8 M Urea, 2% CHAPS, 0.5% ampholytes, 50 mM DTE, and 0.004% of bromophenol blue. Samples were loaded in immobilized pH 4-7 gradient (IPG) strips. After 1 h rehydration, the strips were focused at a temperature of 20°C using the IPGphor IEF apparatus (GE Healthcare, Orsay, France) using the following voltage settings: 20V for 13 h, 500 V for 1 h, 1000 V for 1 h, and 8000 V for 6 h. The gels containing the focused proteins were stored at -80°C until the two-dimensional analysis or were used immediately.

The strips were brought to room temperature and equilibrated in two steps for 15 min each to reduce and alkylate the proteins. The equilibration buffer contained 6 M Urea, 2 M Thiourea, 50 mM Tris, 34.5% glycerol, 2% SDS, and 0.005% bromophenol blue with 2% DTT for the first step, and 2.5% iodoacetamide replaced DTT for the second step. Strips were then placed on top of a 12.5% polyacrylamide gel and sealed with 0.5% agarose dissolved in electrophoresis buffer. The DALT six apparatus (GE Healthcare, Orsay, France) was used for 2DE at constant temperature of 22 °C (20 W for 30 min and 60 W for the remaining time of

electrophoresis) until a total of 1000 Vh was achieved. After electrophoresis, the gels were stained by using the Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad).

### ***2-D gel image analysis***

The silver-stained 2-DE gels were scanned on an Epson scanner at a resolution of 300 dots per inch (dpi). Intensities of protein spots were analyzed with ImageMaster 2-D (GE healthcare, Orsay, France). Protein spots that showed more than 2-fold statistically significant differential expression and had the same directional change in three separate experiments were taken as differentially expressed candidates.

### ***Protein identification by mass spectrometry***

Gel spots corresponding to differentially expressed proteins were excised. Proteins contained in each gel spot were reduced, alkylated and digested with modified trypsin (Promega) using the procedure described by Scherl *et al.*<sup>11</sup> Peptides were deposited on to the MALDI targets, combined with matrix (CHCA in 50% CH<sub>3</sub>CN, 0.1% TFA, with 10 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and analyzed in MS and MS/MS (maximum of 15 precursors *per* spot) modes using a 4800 MALDI-TOF/TOF (MDS Sciex). After MS analyses, MSMS peak lists from each analyzed spot were created with embedded software (4000 Series Explorer-Launch Peaks-to-Mascot). Peptide and protein identifications were achieved using Phenyx (version 2.5, GeneBio). MSMS peak lists were launched in batch using Phenyx Daemon (GeneBio). For Phenyx searches, a concatenated Swiss-Prot and Trembl database (version 12.6, mammalia chosen as taxonomy, 286'761 entries) was selected as database, MALDI TOF-TOF as the instrument type and MALDI TOF-TOF (default) as the scoring model. Two search rounds were used (first round: Cys\_CAM fixed $\geq$ n1, Oxidation\_M variable $\leq$ 1, DEAM\_N variable $\leq$ 1 and DEAM\_Q variable $\leq$ 1 were chosen as modifications, trypsin (KR\_noP) as enzyme, one

missed cleavage allowed, cleavage mode set to normal, precursor mass error tolerance of 1.0 Da, peptide length $\geq$ 6, peptide score $\geq$ 7.0,  $p$ -value $\leq$ 1.0E-7, AC minimum score of 7.0, conflict resolution activated and turbo scoring activated with tolerance set at 0.5 Da, coverage $\geq$ 0.1 and series=b;b++;y;y++; second round: Cys\_CAM variable $\leq$ 3, Oxidation\_M variable $\leq$ 2, DEAM\_N variable $\leq$ 3 and DEAM\_Q variable $\leq$ 3 were chosen as modifications, trypsin (KR) as enzyme, three missed cleavages allowed, cleavage mode set to half cleaved, precursor mass error tolerance of 1.0 Da, peptide length $\geq$ 5, peptide score $\geq$ 6.0,  $p$ -value $\leq$ 1.0E-6, AC minimum score of 7.0, conflict resolution activated and turbo scoring inactivated). Each identified protein contained at least one discriminating peptide. Identified keratins and trypsin have been discarded from the list of identified proteins.

### **Western blotting**

Tissues samples immediately frozen in liquid nitrogen at the time of sacrifice were lysed in cold solubilization buffer (pH 8) containing 150 mM NaCl, 50mM Tris-base, 2 mM EDTA, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 2 mM Orthovanadate and 20 mM NaF. Protein lysates were resolved on 7.5-10% SDS polyacrylamide gel and blotted to PVDF membranes (Millipore) as previously described.<sup>12</sup> Saturation was achieved in 0.1% Tween in Tris-buffered saline with 5% milk for 1 hour. The membranes were probed with primary antibodies overnight at +4°C, washed and incubated with appropriate immunoperoxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Antibody binding was detected using ECL Western Blotting Detection System (Covalab, Villeurbanne, France). Antibody against 14-3-3 $\gamma$  (9637) and CRMP2 (9393) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and antibodies against TPM2 (sc-28543) and TCP-1 $\epsilon$  (sc-30515) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

### **Histologic and immunohistochemical analysis**

Tissues samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Sections (4- $\mu$ m-thick) were stained with hematoxylin and eosin. The following proteins were studied by immunohistochemistry: anti-14-3-3 $\gamma$  (9637), CRMP2 (9393) and vimentin (5741) antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA); anti-TPM2 (ARP 48224\_T100) antibody was from Aviva Systems Biology (San Diego, CA, USA); anti-TCP-1 $\epsilon$  (H00022948-M01) antibody was from Novus Biological (Littleton CO, USA), anti-desmin antibody (M724) was from Dako (Glostrup, Denmark), anti-CK8 antibodies were from Genetex (GTX15465) (Irvine, CA, USA) and Diagnostic Biosystems (Mob 054-05) (Pleasanton, CA, USA) for mouse and human samples, respectively. All antibodies were applied to deparaffinized sections of formalin-fixed tissue samples; they were revealed according to an indirect immunoperoxidase technique, using DAB as a chromogen.

### **Statistical analysis**

Significant differences were analyzed by using Mann-Whitney and Student's t-tests.  $P < 0.05$  was required for statistical significance.

## RESULTS

### **Experimental approach: proteomic analysis using an *in vivo* xenograft model**

#### ***STC-1 tumor growth after implantation into the caecal wall***

After implantation on the serosal side of the caecal wall, STC-1 tumor fragments first grew within the subserosal tissue. Until two weeks, tumor cells remained located within the adventitial tissue and did not invade the muscularis propria (Figure 1A). At five weeks, tumor cells have invaded the muscularis propria and the submucosa (Figure 1B); the crossing of the muscularis propria was made by cohesive multicellular strands of tumor cells running between the muscle fibers. At eight weeks, foci of tumor cells were also present in the mucosa and grew within the lamina propria, after destruction of the muscularis mucosae (Figure 1C). At this time, the animals had developed regional and distant metastases, as previously described.<sup>9</sup> We further compared tumor samples obtained at 2 and 8 weeks, as representative of non-invasive and invasive stages, respectively.

#### ***Comparative proteomic analysis of STC-1 tumor xenografts at 2 and 8 weeks***

##### *2-DE characterization of tumor tissue*

2-DE analysis was performed on two different biological tumor samples and three technical replicates. Three gel replicates were obtained performed from each 2-weeks and 8-weeks STC-1-derived tumor samples (Figure 1D).

Gel images were analyzed using the Image Master 2-D software.. Spots with high discrepancy between replicates were removed from the analysis. A total of 915 spots were detected and selected according their presence on each 2-weeks replicates, or each 8-weeks replicates or all

of them (2-weeks and 8-weeks replicates). Those differentially expressed in 8-weeks tumors in comparison with 2-weeks tumors by 1.5 fold or more were retained for further analysis ( $p < 0.05$ ). Among the 915 spots, 52 spots were found over-expressed (5.7% of total spots) and 42 under-expressed (4.6% of total spots). Finally, mass spectrometry analyses allowed to identify a total of 19 spots (20% of the 94 differentially expressed detected spots) found to be differentially expressed in tumor tissue from the two time points. The position of these spots is indicated in Figures 2A and 2B. As shown in Table 1 and Figure 2C and 2D, 12 spots were found to be down-regulated and 7 up-regulated.

#### *MS analysis and protein identification*

The 19 spots corresponding to proteins found to be differentially expressed in 8-weeks tumors as compared to 2-weeks tumors were excised, the proteins digested with trypsin, and the resulting peptides analyzed by MALDI-TOF/TOF. We identified 24 proteins out of the 19 spots, due to the presence of 2 or 3 proteins in several spots. The identity of the proteins corresponding to the respective 19 gel fragments analyzed is given in Table 2 together with other relevant information. The MS data are provided in supplementary data.

#### ***Validation of the differential expression of selected proteins by immunohistochemistry and Western blotting in experimental tumors***

We selected 7 out of the 24 proteins identified with 2-DE and MS analysis: T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP1 $\epsilon$ ), tropomyosin beta chain (TPM2), collapsin response mediator protein-2 (CRMP2), vimentin and desmin whose expression decreased in 8-weeks tumors compared to 2-weeks tumors, and 14-3-3 protein-gamma (14-3-3 $\gamma$ ) and cytokeratin 8 (CK8), whose expression increased. Representative results of each immunostaining are illustrated on

Figure 3. Within the tumor bulk, the expression of 14-3-3 $\gamma$ , TPM2, TCP1 $\epsilon$ , CRMP2 and CK8 was restricted to tumor cells, whereas that of vimentin and desmin was restricted to stromal cells and muscle cells, respectively. Moreover, immunostaining for 14-3-3 $\gamma$ , TPM2, TCP1 $\epsilon$  and CRMP2 was in accordance with 2-DE results. 14-3-3 $\gamma$  expression increased in 8-weeks tumor cells while TPM2, TCP1 $\epsilon$  and CRMP2 expression decreased. A slight increase of CK8 expression was observed in 8-weeks tumors. To confirm the immunostaining results, Western blot was performed on whole protein extracts from 2-weeks and 8-weeks tumor samples. As shown in Figure 4, 14-3-3 $\gamma$  amount increased in 8-weeks tumor protein extract, whereas those of TPM2, TCP1 $\epsilon$  and CRMP2 decreased, corroborating 2-DE analysis and immunohistochemical results.

### **Validation in human invasive ileal endocrine tumors**

As our experimental model mimicked the development of tumors inside the intestinal wall, we selected a representative series of human ileal well-differentiated neuroendocrine tumors with invasion of the muscularis propria and subserosal involvement. Sections containing the whole thickness of the digestive wall were studied.

All cases presented with the typical growth pattern of ileal neuroendocrine tumors; the bulk of the tumor was located in the submucosa; it was formed by tumor cell nests of variable size, separated by large fibrous septa; the trans-muscular invasive component was made of strands of tumor cells, of variable thickness, running between the muscle fibers or along nerve fibers; on the serosal side of the muscularis propria, large and coalescent tumor nests were again visible within the subserosal tissue.

We analysed the possible modifications of expression associated with the infiltration of the muscularis propria by tumor cells. The apparent distribution of 14-3-3 $\gamma$ , TPM2, TCP1 $\epsilon$  and CRMP2 was characterized by the presence of immunohistochemical gradients reminiscent of



those observed in experimental tumors. As expected from our experimental results, the apparent level of expression of 14-3-3 $\gamma$  was higher in tumor cells infiltrating the muscularis propria than in cells located in the submucosa and mucosa. In contrast, the apparent expression level of TPM2, TCP1 $\epsilon$  and CRMP2 was found to be higher in tumor cells located within the submucosa and was lower in the tumor cell groups infiltrating the muscularis propria, whereas that of CK8 remained unchanged (Figure 5). The intensity of the gradients observed was heterogeneous from one point to another within the same tumor and from one tumor to another.

## DISCUSSION

In neuroendocrine tumors of the intestine, molecular mechanisms controlling tumor growth and spread remain largely unknown despite their potential interest for the identification of new biomarkers and therapeutic targets. Novel studies for the identification of functionally relevant molecules are thus needed.

We hypothesized that the use of an experimental animal model would make it possible to overcome some of the limitations of the studies based on human tumors: (a) early stages of tumor development are rarely observed in human pathology, since the majority of intestinal NETs are metastatic at the time of diagnosis; (b) the rarity and heterogeneity of NETs hamper the constitution of large, representative series. The model of orthotopic xenograft into the caecal wall that we have developed with the murine enteroendocrine cell line STC1 is closely reminiscent of the physiopathological situation. After an initial phase of local growth, tumor cells invade the whole thickness of the digestive wall, including the muscular layers, and eventually disseminate in the body, first to regional lymph nodes and finally to the liver.<sup>9</sup> One of the possible limitations of this model is that the progression of the tumor is not from the digestive lumen to the subserosal tissue but in the opposite sense. However, we considered that this “out-in” crossing of the muscular layers would probably involve the same mechanisms than in the ‘normal’ “in-out” way. This was in keeping with the comparable histological aspects, especially the characteristic pattern of multicellular cohesive invasion by tumor cell strands running between muscle fibers, observed in both our experimental model and human tumors.

The proteomic analysis performed here was based on the comparison between whole tumor tissue samples taken at the early, non invasive stage (2-weeks) and at a late, fully invasive stage (8-weeks). It allowed the identification of 24 proteins up or down regulated in the invasive stage compared to the non-invasive stage. Candidate proteins were involved in

several cellular processes including cytoskeletal structure and regulation, scavenging, response to stress and metabolic adaptation.

We then validated the results of the proteomic analysis in several steps. The first step was to use an alternative approach to verify the presence of candidate proteins in tumoral tissue and to confirm the quantitative differences in their expression level observed between the non-invasive and the invasive stages. We therefore performed Western blot analyses of whole tissue homogenates when suitable antibodies were available. The second step was to evaluate whether the results obtained by protein analysis in tissue homogenates could be validated by an immunohistochemical study of experimental tumors taken at the same stages, especially to confirm the expression of candidate proteins by tumor cells and to precise the *in situ* pattern of the gradients suggested by whole tissue analysis. The last step was to study by immunohistochemistry the expression patterns of the validated candidate proteins identified in the animal experimental model in a large series of representative human ileal neuroendocrine tumors in order to evaluate their relevance to the mechanisms of human neuroendocrine tumor progression. Our results confirm the validity of our strategy and also illustrate the possible pitfalls and caveats of the proteomic analysis of whole tissue samples.

For the validation step, we decided to focus on proteins associated with the cytoskeleton because of its pivotal role during the invasive process. Among the 24 proteins identified by the proteomic analysis, 11 were involved, sometimes among other functions, in cytoskeletal structure or regulation. For 7 of them, suitable antibodies were available for validation studies. Three were structural cytoskeletal proteins: cytokeratin 8, vimentin and desmin; all three are intermediate filament proteins known to be expressed, respectively, in epithelial, mesenchymal and muscle cells. The four remaining candidate proteins: CRMP2, TCP1 $\epsilon$  tropomyosin 2 (Tpm2) and 14.3.3 $\gamma$  are involved in the regulation of cytoskeletal architecture. CRMP2 is, among other functions, a tubulin-associated protein involved in the regulation of

microtubule dynamics.<sup>13</sup> TCP1 (chaperonin containing t-complex polypeptide 1) is a 16 subunit complex involved in tubulin and actin folding.<sup>14</sup> Tropomyosin 2 belongs to a family of actin-associating proteins that stabilize the actin filament network.<sup>15</sup> 14.3.3 $\gamma$  belongs to a family of proteins involved in actin stabilization and able to interact with other factors involved in actin remodeling.<sup>16</sup>

Combining Western blot analyses and *in situ* immunohistochemical studies of experimental tumors made it possible to validate the results of 2D-electrophoresis for 4 proteins: CRMP2, Tpm2, TCP1 $\epsilon$  and 14.3.3 $\gamma$ . The presence and identity of these candidate proteins identified by our proteomic approach was confirmed by Western blot. Their expression by neuroendocrine tumor cells and the existence of quantitative differences in their expression levels in tumor cells between the non-invasive and invasive stages were confirmed by an *in situ* immunohistochemical study. All the approaches concurred to suggest a decrease in the expression levels of CRMP2, Tpm2 and TCP1 $\epsilon$  but an increase in the expression levels of 14.3.3 $\gamma$ .

In contrast, *in situ* immunohistochemical studies showed that, as expected, vimentin and desmin were not expressed by tumor cells, but were restricted, respectively, to stromal cells (including fibroblasts, endothelial cells and immune cells) and to preexisting muscle cells. This underlines a possible caveat of proteomic and Western blot analyses of whole tumor tissue homogenates, in which material originating from tumor cells is admixed with material originating from the tumor microenvironment. The same cause is likely to explain the identification by 2D-electrophoresis of several extracellular proteins, such as lysozyme C, lactoferrin, lipocalin 1, alpha-1-antitrypsin and serum amyloid P component. These proteins are likely to be associated with the ongoing inflammatory and scavenging process secondary to local tumor invasion and might have been produced by stromal cells and neutrophils.

A more difficult case is represented by cytokeratin 8. 2D-electrophoresis suggested a quantitative variation in the amount of this intermediate filament between the non-invasive and invasive stages. This variation could not be confirmed by alternative techniques. By *in situ* immunohistochemical study, we could confirm that cytokeratin 8 was expressed by neuroendocrine tumor cells but it was not possible to detect any convincing change in its apparent expression level with the depth of invasion. Several explanations can be considered: (a) an insufficient resolution of 2D-electrophoresis, which may have resulted in the mixture of several proteins in the spot identified as cytokeratin 8; (b) an insufficient sensitivity of immunohistochemistry to detect quantitative changes in a major cellular component. Another explanation would be an increase in the proportion of neuroendocrine tumor cells in tissue samples taken at 8-weeks, associated with a decrease in the proportion of muscle cells due to local growth and invasion.

The next challenge was to assess the relevance of the experimental findings to human tumors. So far, no information was available on the potential involvement of any of the four candidate proteins: CRMP2, Tpm2, TCP1 $\epsilon$  and 14.3.3 $\gamma$ ., in human intestinal neuroendocrine tumors. Using whole sections from representative ileal invasive human cases, we were able to identify immunohistochemical expression gradients through the muscularis mucosae, which were closely reminiscent of those observed in experimental tumors. The expression of 14-3-3 $\gamma$  was increased at the serosal side of the tumors, whereas that of CRMP2, Tpm2 and TCP1 $\epsilon$  was decreased.

Some of our observations are reminiscent of observations made in other cancer types. For instance, significantly elevated levels of 14-3-3 proteins have been detected in all major types of lung cancer.<sup>17</sup> In pancreatic ductal adenocarcinoma, 14-3-3 $\gamma$  was found to be strongly overexpressed when compared to normal pancreas.<sup>18</sup> An elevation of Tpm expression has been described in tumor dormancy while Tpm isoform profiles have been found to be altered

in transformed cells, resulting in the promotion of cell migration.<sup>19,20</sup> Finally, altered expression levels of TCP1 $\beta$  and/or TCP1 $\epsilon$  subunits have been found in colorectal adenocarcinoma, metastatic breast cancer and oesophageal squamous cell carcinoma.<sup>21-23</sup> Further studies are required to investigate the role played by the candidate proteins identified in this study, and more generally by cytoskeletal proteins, in the local invasion process typical of gastro-intestinal NETs.

In conclusion, our study has led to the identification of several novel protein candidates likely to be involved in the mechanisms of local invasion by gastro-intestinal neuroendocrine tumor cells. More generally, it illustrates the interest of a strategy based on the analysis of experimental animal models for the exploration of tumor progression in rare and poorly available human tumors.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Histological features of STC-1 derived tumors after grafting into the caecal wall (A,B and C). A: at 2 and 4 weeks, the tumor (Tm) remained restricted to the adventitial tissue and did not invade the muscularis propria (MP). B: 5 weeks after grafting, STC-1 derived tumor has invaded the muscularis propria and the submucosa. C: at 8 weeks, foci of tumor cells were also present within the mucosa (Mu) and grew within the lamina propria. D: 2-DE gels replicates (#1, #2, #3) of protein extracts from 2 weeks and 8 weeks STC-1-derived tumors. The proteins were separated on pH 3-7 IPG strips followed by SDS page on polyacrylamide gel. The gels were stained using a silver staining protocol.

**Figure 2:** 2-DE gel electrophoresis map of protein extracts from 2 weeks (A) and 8 weeks (B) STC-1-derived tumors. For both time, image of gel #1 is provided. Black arrows indicate proteins spots which show 1.5-fold differential expression. C: Intensity values obtained by 2D Master software analysis, for each spot displaying 1.5 fold differential expression. Graphical representation of expression analysis for 1.5-fold over-expression (C) and under-expression (D) selected spots in 8 weeks STC-1 derived tumors when compared with 2 weeks.

**Table 1:** Proteins identified by MS/MS spectrometry in each numbered spots shown on Figure 2.

**Figure 3:** Expression of 14-3-3 $\gamma$ , TPM2, TCP1 $\epsilon$ , CRMP2, CK8, vimentin and desmin in experimental primary tumor tissues. Immunohistochemical staining showed tumoral expression of 14-3-3 $\gamma$ , Tpm2, TCP1 $\epsilon$ , CRMP2, and CK8 in 2 and 8 weeks primary STC-1-

derived tumors, whereas vimentin and desmin expression was restricted to stromal cells and muscle cells, respectively.

**Figure 4:** Western-blot analysis of 14-3-3 $\gamma$ , TPM2, TCP1 $\epsilon$  and CRMP2 expression in 2 and 8 weeks STC-1-derived tumor.

**Figure 5:** Expression of 14-3-3 $\gamma$ , TPM2, TCP1 $\epsilon$ , CRMP2 and CK8 proteins in human carcinoma tissues. Primary tumor cells exhibited various immunohistochemical staining levels depending of their tissue localization. 14-3-3 $\gamma$  protein expression was stronger in tumor cells in muscularis propria than those in submucosa whereas CRMP2, TPM2 and TCP1 $\epsilon$  proteins showed weaker cellular expression in muscularis propria than in submucosa. CK8 expression remained unchanged.



## REFERENCES

1. Friedl P, Alexander S: Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* 2011, 147:992–1009.
2. Hervieu V, Lepinasse F, Gouysse G, Guillaud O, Barel C, Chambonniere M-L, Bringuier P-P, Poncet G, Lombard-Bohas C, Partensky C, Chayvialle J-A, Scoazec J-Y: Expression of beta-catenin in gastroenteropancreatic endocrine tumours: a study of 229 cases. *J Clin Pathol* 2006, 59:1300–1304.
3. Maitra A, Hansel DE, Argani P, Ashfaq R, Rahman A, Naji A, Deng S, Geradts J, Hawthorne L, House MG, Yeo CJ: Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2003, 9:5988–5995.
4. Bloomston M, Durkin A, Yang I, Rojiani M, Rosemurgy AS, Enkmann S, Yeatman TJ, Zervos EE: Identification of molecular markers specific for pancreatic neuroendocrine tumors by genetic profiling of core biopsies. *Ann Surg Oncol* 2004, 11:413–419.
5. Capurso G, Lattimore S, Crnogorac-Jurcevic T, Panzuto F, Milione M, Bhakta V, Campanini N, Swift SM, Bordi C, Delle Fave G, Lemoine NR: Gene expression profiles of progressive pancreatic endocrine tumours and their liver metastases reveal potential novel markers and therapeutic targets. *Endocr Relat Cancer* 2006, 13:541–558.
6. Hansel DE, Rahman A, House M, Ashfaq R, Berg K, Yeo CJ, Maitra A: Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with

- metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2004, 10:6152–6158.
7. Couvelard A, Hu J, Steers G, O'Toole D, Sauvanet A, Belghiti J, Bedossa P, Gatter K, Ruzniewski P, Pezzella F: Identification of potential therapeutic targets by gene-expression profiling in pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* 2006, 131:1597–1610.
  8. Duerr E-M, Mizukami Y, Ng A, Xavier RJ, Kikuchi H, Deshpande V, Warshaw AL, Glickman J, Kulke MH, Chung DC: Defining molecular classifications and targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through DNA microarray analysis. *Endocr Relat Cancer* 2008, 15:243–256.
  9. Poncet G, Villaume K, Walter T, Pourreyron C, Theillaumas A, Lépinasse F, Hervieu V, Cordier-Bussat M, Scoazec J-Y, Roche C: Angiogenesis and tumor progression in neuroendocrine digestive tumors. *J Surg Res* 2009, 154:68–77.
  10. Rindi G, Grant SG, Yiangou Y, Ghatei MA, Bloom SR, Batach VL, Solcia E, Polak JM: Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol* 1990, 136:1349–1363.
  11. Scherl A, Couté Y, Déon C, Callé A, Kindbeiter K, Sanchez J-C, Greco A, Hochstrasser D, Diaz J-J: Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* 2002, 13:4100–4109.
  12. Ratineau C, Bernard C, Poncet G, Blanc M, Josso C, Fontanière S, Calender A, Chayvialle JA, Zhang C-X, Roche C: Reduction of menin expression enhances cell proliferation and is tumorigenic in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2004, 279:24477–24484.

13. Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Ménager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K: CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 2002, 4:583–591.
14. Llorca O, Martín-Benito J, Grantham J, Ritco-Vonsovici M, Willison KR, Carrascosa JL, Valpuesta JM: The “sequential allosteric ring” mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. *EMBO J* 2001, 20:4065–4075.
15. Lees JG, Bach CTT, O’Neill GM: Interior decoration: tropomyosin in actin dynamics and cell migration. *Cell Adhes Migr* 2011, 5:181–186.
16. Freeman AK, Morrison DK: 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol* 2011, 22:681–687.
17. Nakanishi K, Hashizume S, Kato M, Honjoh T, Setoguchi Y, Yasumoto K: Elevated expression levels of the 14-3-3 family of proteins in lung cancer tissues. *Hum Antibodies* 1997, 8:189–194.
18. Guweidhi A, Kleeff J, Giese N, El Fitori J, Ketterer K, Giese T, Büchler MW, Korc M, Friess H: Enhanced expression of 14-3-3sigma in pancreatic cancer and its role in cell cycle regulation and apoptosis. *Carcinogenesis* 2004, 25:1575–1585.
19. Almog N, Ma L, Raychowdhury R, Schwager C, Erber R, Short S, Hlatky L, Vajkoczy P, Huber PE, Folkman J, Abdollahi A: Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res* 2009, 69:836–844.
20. O’Neill GM, Stehn J, Gunning PW: Tropomyosins as interpreters of the signalling environment to regulate the local cytoskeleton. *Semin Cancer Biol* 2008, 18:35–44.

21. Coghlin C, Carpenter B, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI: Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J Pathol* 2006, 210:351–357.
22. Campone M, Campion L, Roché H, Gouraud W, Charbonnel C, Magrangeas F, Minvielle S, Genève J, Martin A-L, Bataille R, Jézéquel P: Prediction of metastatic relapse in node-positive breast cancer: establishment of a clinicogenomic model after FEC100 adjuvant regimen. *Breast Cancer Res Treat* 2008, 109:491–501.
23. Uchikado Y, Inoue H, Haraguchi N, Mimori K, Natsugoe S, Okumura H, Aikou T, Mori M: Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006, 29:1337–1347.

**FIGURE 1**

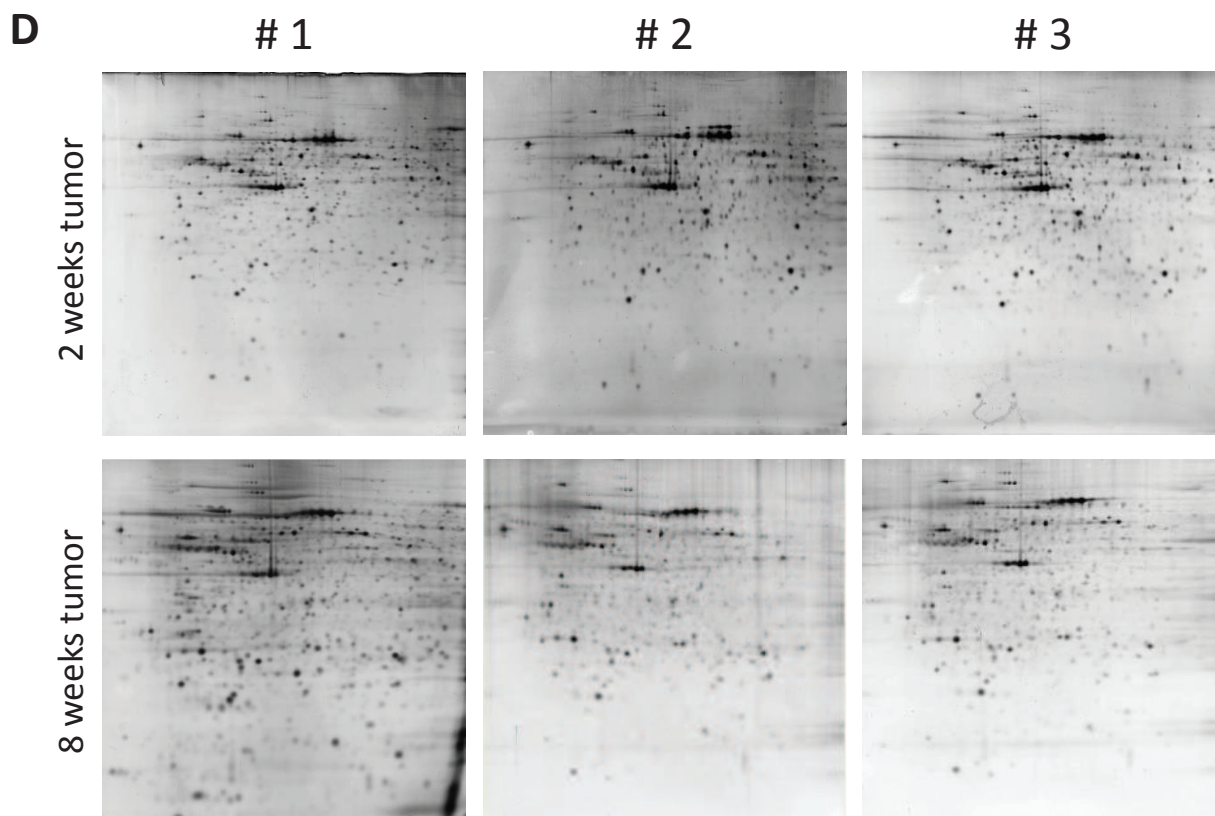
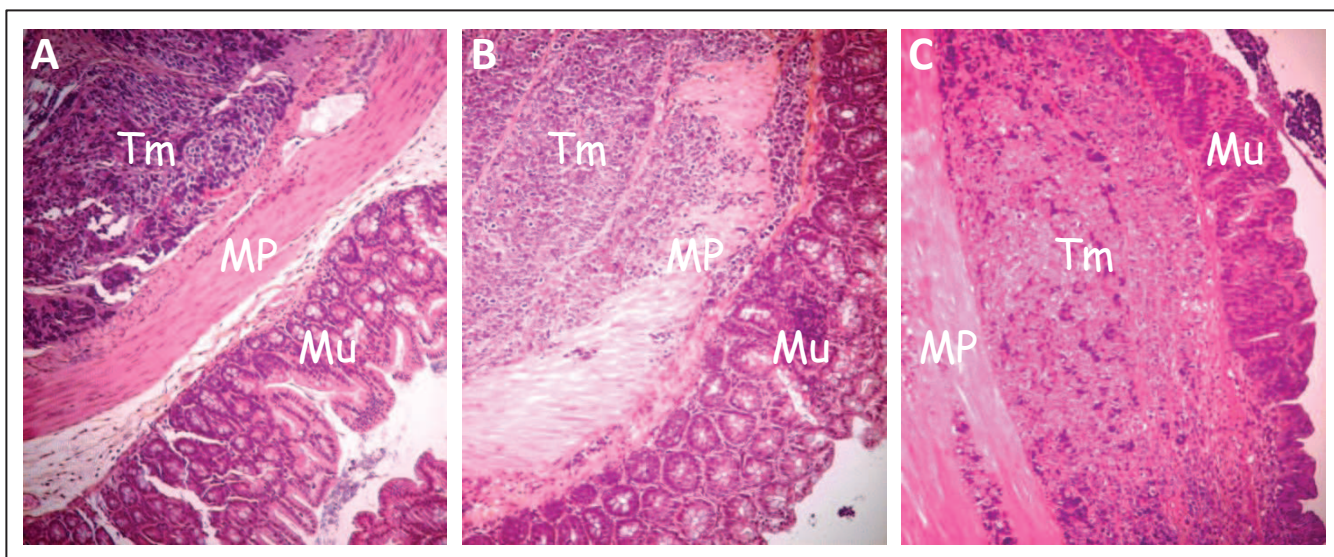
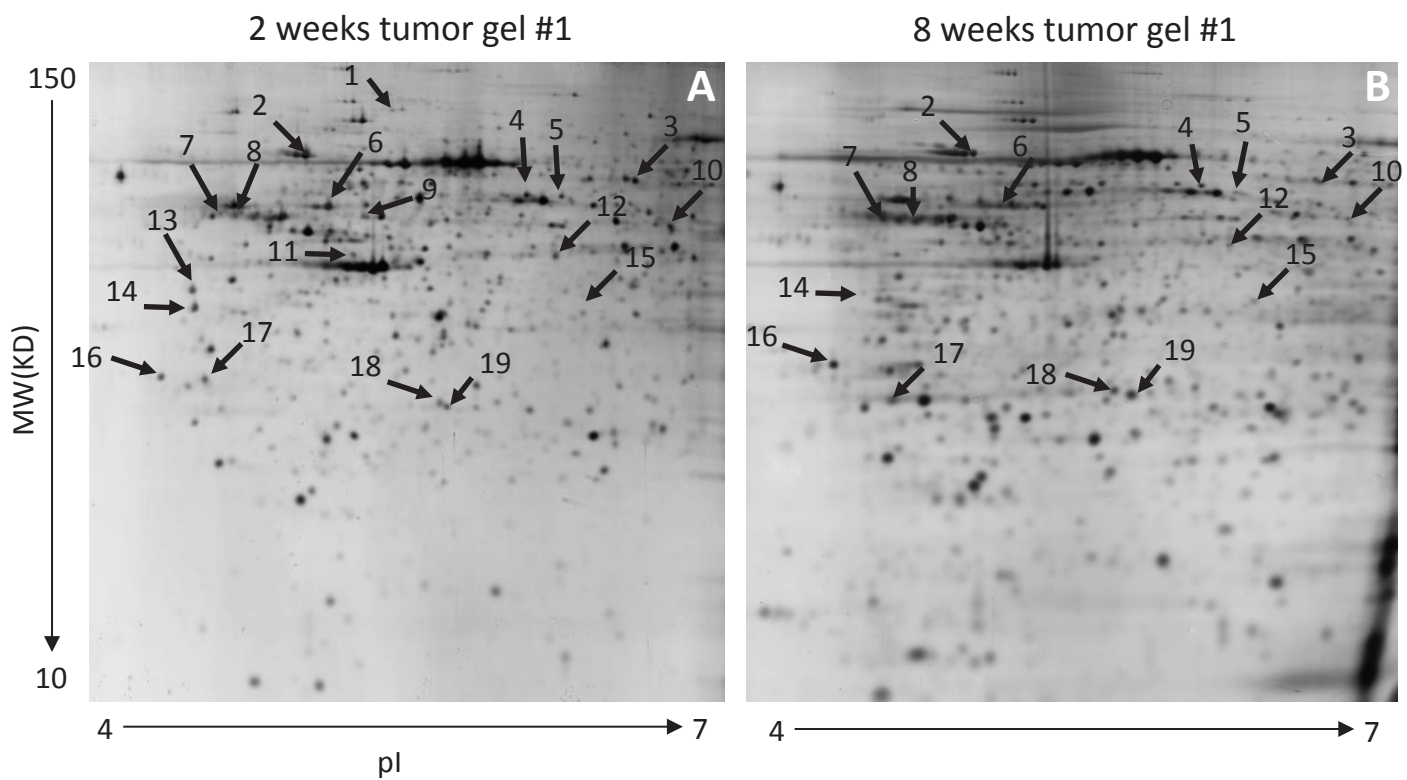


FIGURE 2



C

Samples Code	2 weeks tm gel # 1	2 weeks tm gel # 2	2 weeks tm gel # 3	8 weeks tm gel # 1	8 weeks tm gel # 2	8 weeks tm gel # 3
1	21.0826	26.5019	35.4697	0	0	0
2	547.54	506.26	545.13	236.52	227.06	254.21
3	169.38	173.43	171.44	27.58	16.27	98.22
4	313.06	275.34	187.26	130.97	137.26	133.57
5	100.29	118.18	94.56	55.08	49.03	65.76
6	517.38	590.40	363.53	219.72	249.89	236.64
9	228.983	182.073	194.768	0	0	0
10	143.298	156.022	216.768	66	65	80
11	127.513	117.241	125.836	0	0	0
12	273.08	264.22	165.44	66.90	64.67	83.08
13	196.675	144.008	219.758	0	0	0
14	208.829	138.474	232.36	78.05	0.00	75.91
7	150	130	180	298.081	344.561	286.633
8	140.323	0	0	346.274	421.537	967.597
15	36.7099	62.5165	51.2261	111.226	116.99	116.029
16	94.574	66.1007	155.463	156.861	189.069	374.719
17	61.6953	132.282	130.158	374.862	434.834	541.178
18	158.273	145.793	142.173	215.614	234.166	258.747
19	68.9108	75.8055	67.4126	327.464	354.21	483.264

FIGURE 2

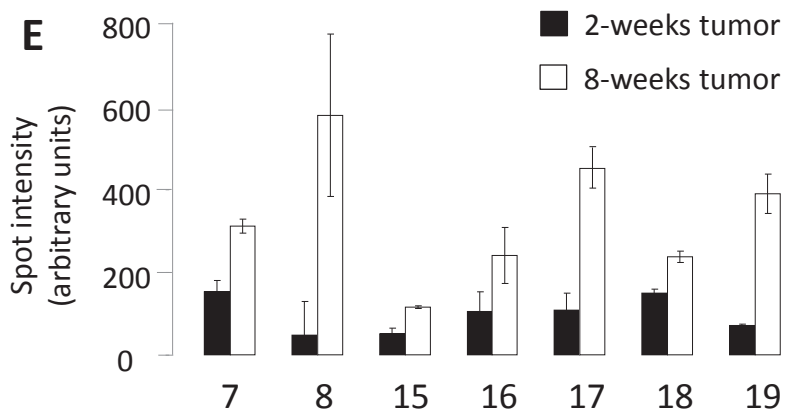
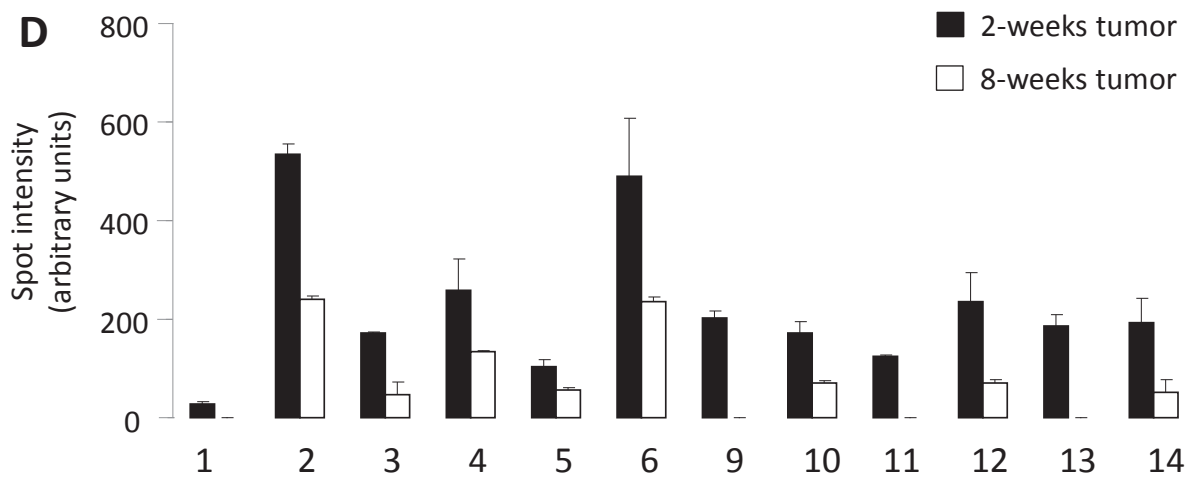


TABLE 1

Proteins identified by MS/MS spectrometry after analysis of 8 weeks versus 2 weeks tumors gels							
code	Protein name	Gene	N° Accession	MW Theor (kDa)	pI Theor	Fold change	
1	Lysozyme C precursor (EC 3.2.1.17) (1,4-beta-N-acetylmuramidase C)	Lyz2 & Lyz1	P08905 & P17897	18,3 & 18,4	8,9 & 9,7	disappearing	
1	Lactotransferrin precursor	Ltf	P08071	77,9	8,9	disappearing	
1	Lipocalin-1 precursor (Von Ebner gland protein)	Lcn1	P31025	19,3	5,4	disappearing	
2	HSPA5 protein (Heat shock 70 kDa protein 5)	Hspa5	Q9DC41	72,4	4,8	-2,2	
3	Collapsin response mediator protein-2 (CRMP2)	Dpysl2	O08553	62,3	6,3	-3,6	
4	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon)	Cct5	P80316	59,6	5,6	-2	
5	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha)	Cct1	P17987	60,5	6,1	-2	
6	Vimentin	Vim	P20152	53,7	4,8	-2,1	
7	Alpha-1-antitrypsin 1-6 precursor (Serine protease inhibitor 1-6)	Serpinalc	P81105	45,8	5,3	2	
7	Histone-binding protein RBBP7 (RBBP-7)	Rbbp7	Q60973	47,8	4,7	2	
7	or Histone-binding protein RBBP4	Rbbp4	Q60972	47,8	4,8	2	
8	Keratin, type II cytoskeletal 8	Krt8	P11679	45,8	5,3	12,4	
8	Alpha-1-antitrypsin 1-6 precursor	Serpinalc	P81105	54,6	5,7	12,4	
9	Desmin	Des	P31001	53,5	4,9	disappearing	
10	RuvB-like 1	Ruvb1l	P60122	50,2	6,4	-2,4	
10	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	Aldh2	P47738	56,5	7,7	-2,4	
11	Thioredoxin domain-containing protein 5 precursor	Txndc5	Q91W90	46,4	5,6	disappearing	
12	Ornithine aminotransferase, mitochondrial precursor	Oat	P29758	48,4	6,6	-3,3	
13	Tropomyosin alpha-1-chain	Tpm1	P58771	37,4	4,4	disappearing	
14	Tropomyosin beta chain [ISOFORM 2]	Tpm2	Q91VH3	32,9	4,3	-3,8	
15	Scavenger mRNA-decapping enzyme Dcps	Dcps	Q9DAR7	39	6	2,3	
16	14-3-3 protein epsilon (14-3-3E)	Ywhae	P62259	29,2	4,6	2,3	
17	14-3-3 protein gamma	Ywhag	P61982	28,3	4,8	4,2	
18	Prohibitin (B-cell receptor-associated protein 32) (BAP 32)	Phb	P67778	29,8	5,6	1,6	
19	Serum amyloid P-component precursor (SAP)	Apcs	P12246	26,2	6	5,5	

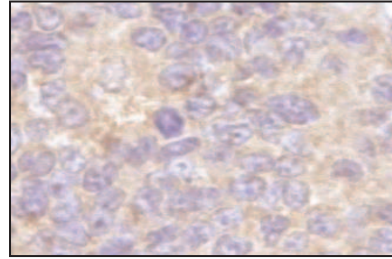
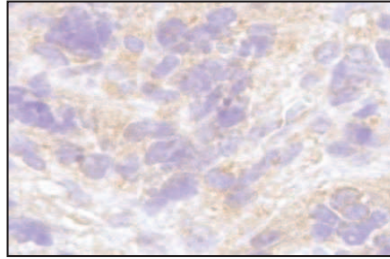


**2 weeks tumor**

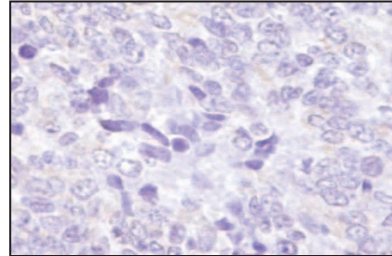
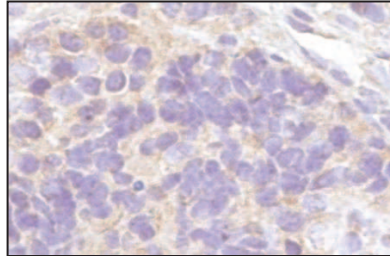
**8 weeks tumor**

**FIGURE 3**

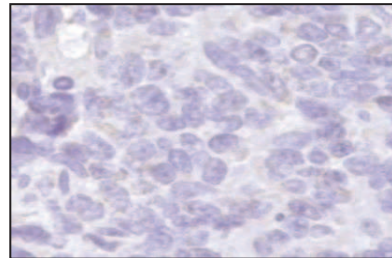
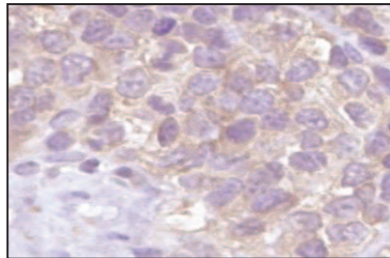
**14-3-3 $\gamma$**



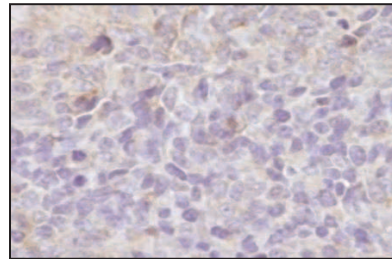
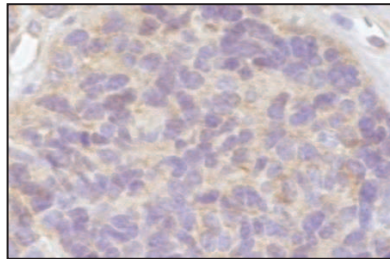
**TPM2**



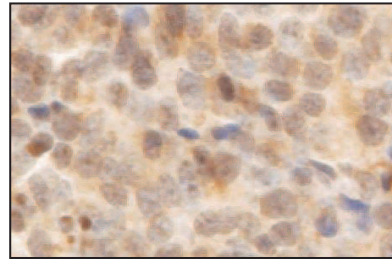
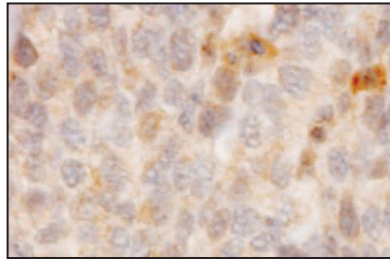
**TCP1 $\epsilon$**



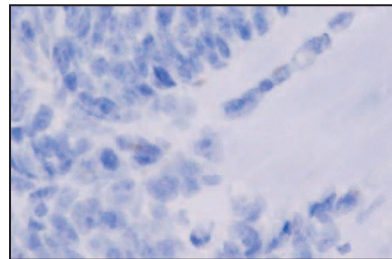
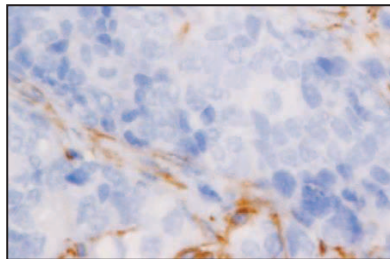
**CRMP2**



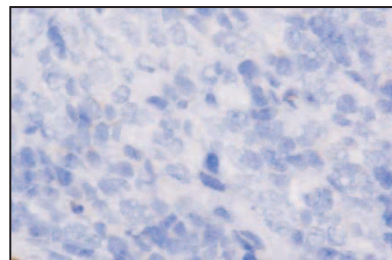
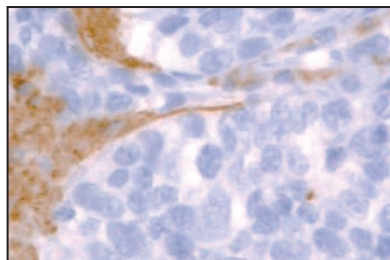
**CK8**



**Vimentin**



**Desmin**



**FIGURE 4**

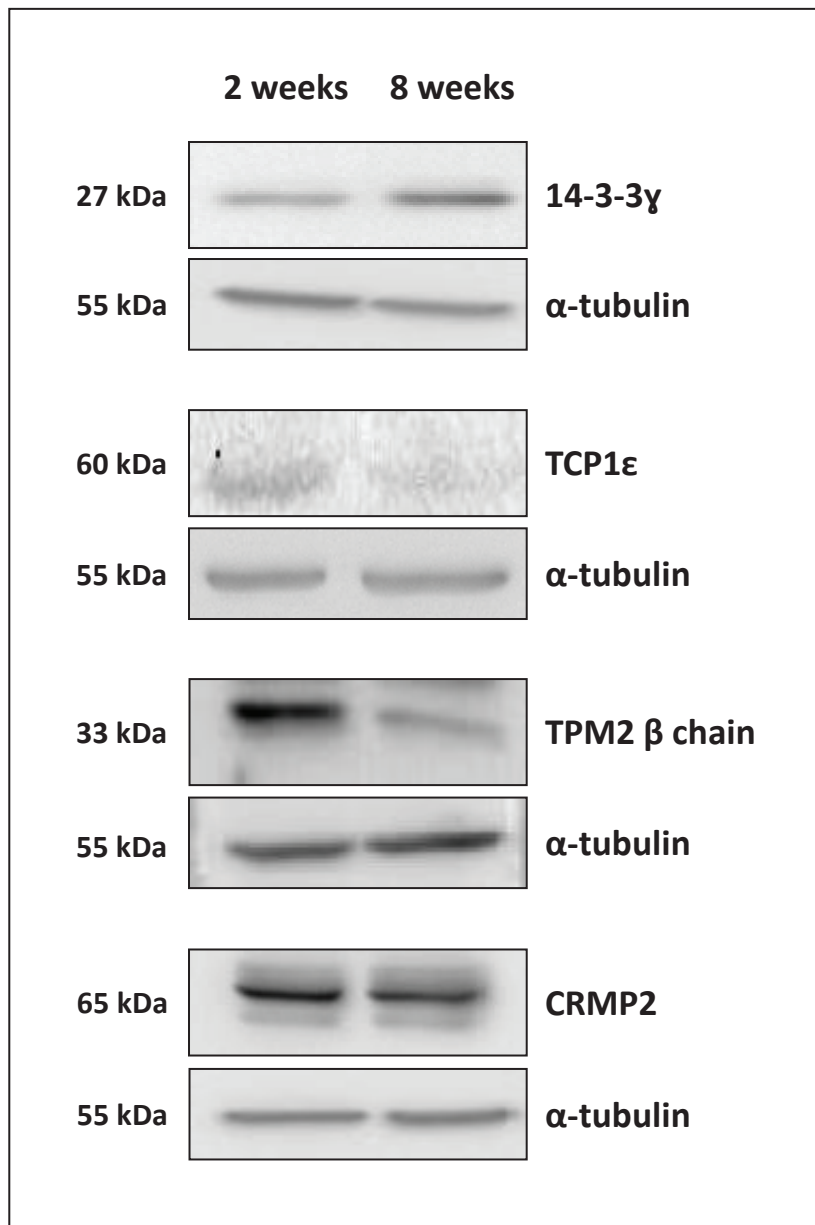
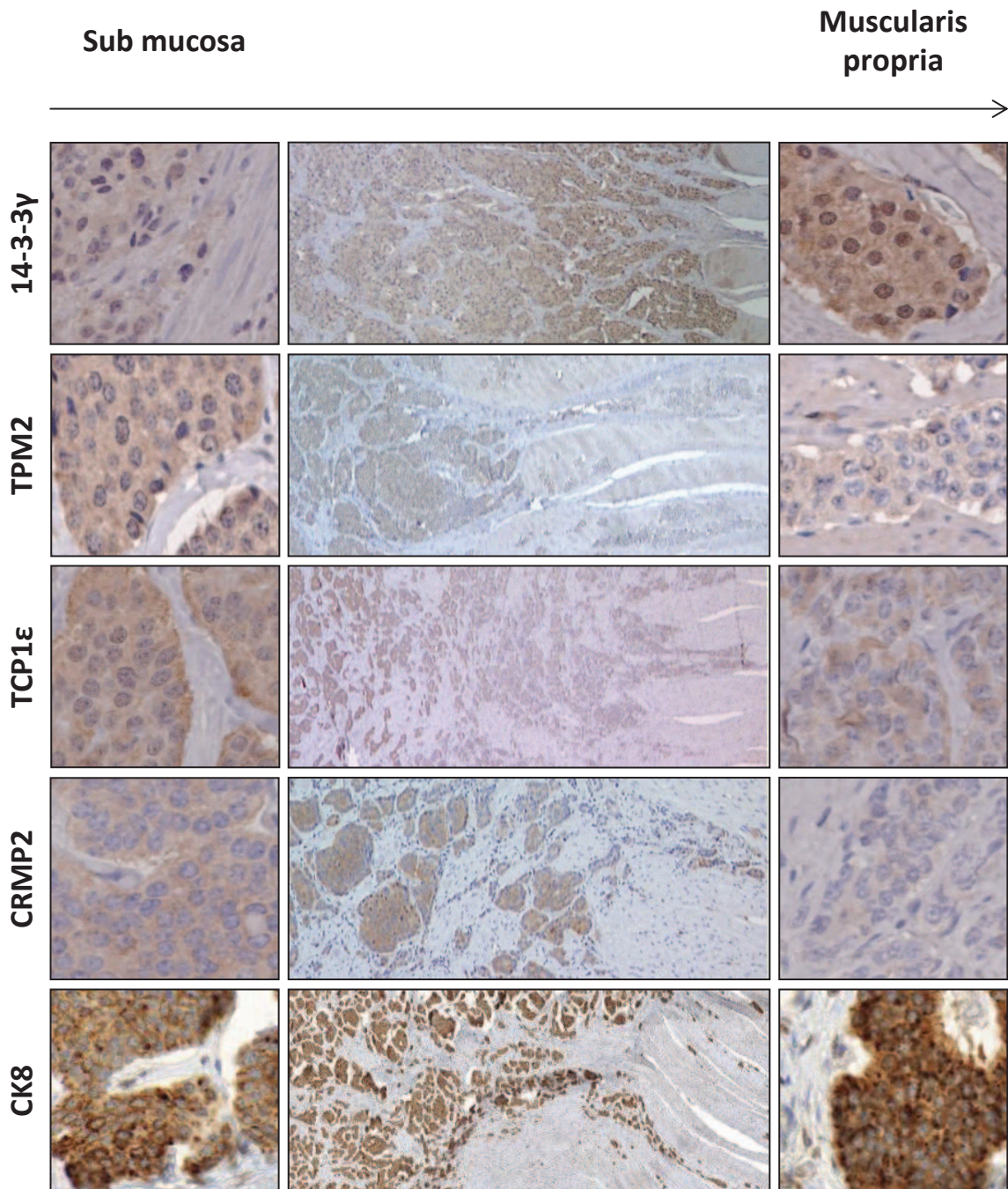


FIGURE 5



**The axon guidance molecule Semaphorin3F is a negative regulator of tumor progression in ileal neuroendocrine tumors.**

Julien Bollard, Patrick Massoma, Martine Blanc, Florian Lepinasse, Sarah Gozlan, Nicolas Gadot, Christophe Couderc, Isabelle Goddard, Marie Odile Joly, Valérie Hervieu, Jean-Yves Scoazec, Colette Roche.

*En cours de préparation*

Pour mieux comprendre les mécanismes de progression des TNE-GEPs, une étude protéomique a été menée afin de mettre à jour de nouvelles protéines impliquées dans une phase critique du développement des TNE-GEPs, la phase de croissance locale, pendant laquelle la tumeur va infiltrer les tissus adjacents avant de devenir potentiellement métastatique. Parmi les protéines candidates détectées par l'étude protéomique, la protéine CRMP2 présente un intérêt particulier (Article 2). En effet, ce facteur intervient dans la voie de signalisation des sémaphorines de classe 3 (SEMA3), qui sont des facteurs dont le rôle a été décrit dans le développement du système nerveux (Pasterkamp and Giger, 2009). Malgré quelques évidences en faveur de l'implication des sémaphorines et de leurs partenaires dans les tumeurs neuroendocrines (détaillées dans la seconde partie), aucune étude n'a précisé le rôle potentiel de cette famille de protéines dans la progression des TNE-GEPs.

Dans un premier temps, notre groupe a établi un profil d'expression des différentes SEMA3, ainsi que de leurs récepteurs (neuropilines et plexines) dans une série de TNE-GEPs humaines. Parmi les SEMA3, nous avons sélectionné la SEMA3F comme protéine d'intérêt, sur la base de ses variations d'expression dans les tumeurs humaines et de son profil d'expression dans nos lignées cellulaires.

Dans la présente étude, nous montrons que la SEMA3F est exprimée dans les cellules endocrines de l'épithélium intestinal. De façon intéressante, son expression est perdue dans les tumeurs neuroendocrines du tractus digestif de haut grade tandis que l'expression de son récepteur neuropiline-2 reste constante. De plus, nous précisons que la perte d'expression de la SEMA3F pourrait être la conséquence d'une méthylation de son promoteur. En effet, une méthylation du promoteur de la SEMA3F semble associée à une absence de son expression dans les tumeurs humaines.

L'induction de son expression dans deux lignées cellulaires endocrines tumorales intestinales (STC-1 et GluTag) entraîne une baisse de la viabilité cellulaire et de la prolifération, associée à un allongement de la phase G1 du cycle cellulaire. Lorsque les cellules STC-1 sont greffées chez des souris immunodéprimées, la SEMA3F est responsable de la diminution de la croissance tumorale et

de la dissémination des cellules tumorales vers le foie, ainsi que de l'activité proliférative des nodules intrahépatiques dérivés des cellules greffées. Nous montrons que cet effet anti-prolifératif de la SEMA3F est dû, en partie, à l'altération des voies de signalisation mTOR et MAPK, *in vitro* et *in vivo*. Ces données sont en accord avec celles précédemment mises en évidence dans d'autres tumeurs, notamment pulmonaires et colorectales.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de la voie de signalisation de la SEMA3F dans la progression des TNE-GEPs, et ainsi trouver de nouvelles cibles thérapeutiques ou marqueurs pronostiques.

The axon guidance molecule Semaphorin3F is a negative regulator of tumor progression in ileal neuroendocrine tumors

Julien Bollard<sup>1\*</sup>, Patrick Massoma<sup>1\*</sup>, Martine Blanc<sup>1</sup>, Florian Lepinasse<sup>2</sup>, Sarah Gozlan<sup>2</sup>, Nicolas Gadot<sup>3</sup>, Christophe Couderc<sup>1</sup>, Isabelle Goddard<sup>4</sup>, Marie Odile Joly<sup>1,2</sup>, Valérie Hervieu<sup>1,2</sup>, Jean-Yves Scoazec<sup>1,2,3</sup>, Colette Roche<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon UMR INSERM U1052, CNRS 5286, Equipe « Différenciation endocrine et tumorigenèse », Faculté Laënnec, F-69372 Lyon, France ;

<sup>2</sup>Service Central d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Edouard Herriot, F-69437 Lyon, France ; <sup>3</sup>Plateforme Anipath, Fédération de Recherche Santé Lyon-Est, Lyon, France ;

<sup>4</sup>Laboratoire des Modèles Tumoraux, Fondation Lyon Synergie Cancer, Centre Léon Bérard, F-69373 Lyon, France.

\* These authors contributed equally to this work.

*Short title:*

*Key words:*

*Corresponding author:* Colette Roche  
INSERM U1052  
Faculté de Médecine Laënnec  
7 rue Guillaume Paradin  
69372 LYON Cedex 8, France  
[colette.roche@inserm.fr](mailto:colette.roche@inserm.fr)  
tel 33 478778671  
fax 33 478778780

*Financial support :* This study was supported by a joint grant from Institut National du Cancer and DGOS, Ministère de la Santé (AO Recherche Translationelle 2011) and by an additional grant from Comité de la Drôme de la Ligue contre le Cancer to CR.

*Disclosures:* The authors disclose no potential conflicts

## **Abstract**

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are rare neoplasms. The majority of GEP-NETs display a metastatic phenotype that raises difficult clinical and therapeutic challenges due to a poor knowledge of the mechanisms of progression in these tumors. Strikingly, the expression of axon guidance factors remains poorly documented in GEP-NETs, although normal and tumoral neuroendocrine cells share several structural and functional properties with neural cells. Based on the growing evidences of the role of several class 3 semaphorins in other cancers, the aim of our study was to assess the role of semaphorin3F in intestinal neuroendocrine tumors. We there analyzed the expression of Semaphorin3F and its receptor neuropilin-2 in a large series of human tumors and in the murine neuroendocrine cell lines STC-1 and GluTag, both representatives of proliferative and aggressive neuroendocrine tumors. Semaphorin3F expression was found in normal neuroendocrine cells of the intestinal epithelium but decreased in tumors, according to the stage of the lesion, while neuropilin-2 was still expressed in more than 70% of these tumors. Interestingly, STC-1 and GluTag cells exhibited a low level of Semaphorin3F and a high expression of neuropilin2. *In vitro*, these neuroendocrine cells exhibited a reduced proliferation rate when endogenous Semaphorin3F level was increased after transfection. *In vivo*, an intrasplenic xenograft mouse model demonstrated that semaphorin3F-overexpressing neuroendocrine cells exhibited a reduced ability to form tumor and a hampered liver dissemination potential, in part by affecting several signaling pathways. For the first time, this study demonstrated an anti-tumoral role of Semaphorin3F in neuroendocrine tumors of the digestive tract. We thus suggested that this factor or its cellular signaling could represent a target for endocrine tumor therapy.

## **Introduction**

Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs) are uncommon neoplasms, of which incidence and prevalence are steadily increasing for the past 30 years (1), while the pathogenesis of the disease remains poorly understood. One of the main clinical problems raised by GEP-NETs is their highly variable behavior, which ranges from benign to high grade malignant and which, in most cases, cannot be accurately predicted from the histological appearance of neoplastic cells. The limited efficacy of chemotherapy has led to the exploration of new therapeutic targets, based on the molecular features of these tumors. GEP-NETS comprise a heterogeneous family of tumors that arise from endocrine cells along the digestive tract and pancreas. They derive their name from one of the characteristics of normal peptidergic cells: despite their completely different embryologic origin, these epithelial cells share several structural and functional properties with neural cells. Like neural cells, they contain synaptic vesicles, synthesize and secrete neuropeptides and express a number of cytoplasmic and surface molecules known to play important roles in the nervous system. Interestingly, some studies have shown the expression of axon guidance receptors at the surface of the endocrine cells in both tumoral or normal context assuming a receptiveness of these cells to these ligands (2–4). However, very little attention has been paid so far to the expression patterns of axon guidance molecules in normal or tumoral neuroendocrine cells. In addition, a prospective proteomic study done in our laboratory suggested the implication of a protein known to intervene in class 3 semaphorin pathway, CRMP2 (collapsin response mediator protein 2) (unpublished data). First described in neuronal guidance, the semaphorins have now emerged with functions in non neuronal tissues and also in tumor growth. Semaphorins are a family of axon guidance factors divides in eight classes, 2 in invertebrates, 5 in vertebrates and 1 viral. Among the 5 classes in vertebrates, class 3 semaphorins are the



only one that are secreted allowing a paracrine or autocrine signaling (5). Secreted class 3 semaphorins are both downregulated or overexpressed in numerous cancers showing the importance of these molecules in tumor progression (6). Among them, Semaphorin 3F (SEMA3F) was first described as a tumor suppressor on the basis of its deletion in lung cancer with the loss of 3p21.3 region (7–9). Its expression was well described in several types of lung cancer, including neuroendocrine entities, where it was lost in 50% of high grade neuroendocrine tumors but not altered in low grade carcinoids tumors (10). Its anti-tumoral effect was then confirmed in several cancer types including lung carcinomas (11, 12), melanoma (13) and more recently colorectal carcinoma (14). Focusing on neuroendocrine tumors from distal small intestine, our results reported for the first time a decrease in SEMA3F expression according to the tumoral stage in human tumors and demonstrated an antitumoral effect of the SEMA3F re-expression in neuroendocrine cell lines of intestinal origin, through *in vitro* and *in vivo* approaches.

## **Material and methods**

### **Human tissue samples**

Tissue samples of GEP-NETs were obtained from the collection of digestive neuroendocrine tumors housed in the tumor tissue bank “Tumorotheque des Hospices Civils de Lyon” (Lyon, France), recognized by the French Ministry of Health (DC 2008-72 and AC 2008-73), supported by Institut National du Cancer and member of the BBRMI initiative; the biobank therefore works in strict accordance with French ethical and regulatory issues, including the obtention of an informed consent or the use of samples from deceased patients; a quality management process has been set up. A tissue microarray (TMA) gathering 43 cases of neuroendocrine tumors of the gut was also used. It included 3 tumors from stomach, 5 from proximal small intestine, 31 from distal small intestine and 4 from colon and rectum. This TMA has been realized manually with a tissue arrayer (Alphélys MTA 1, Plaisir, France); 0.6 mm-diameter tissue cores were used.

Moreover, 38 cases of multifocal NETs of the distal small intestine were selected from the archives of the Service central d’Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Edouard Herriot, Lyon. Multifocal NETs are characterized by the coexistence of multiple well-differentiated neuroendocrine tumor lesions arising mainly in the ileum and showing different degrees of local invasion.

### **Cell culture**

The STC-1 cell line, a gift of G. Rindi (Department of Pathology and Laboratory Medicine, Roma, Italy), and the GluTag cell line, a gift of D. Drucker (Department of Medicine, Mt Sinai Hospital, Toronto, Canada) are derived from endocrine intestinal tumors developed in transgenic mice. Both cell lines retain the capacity to synthesize and secrete several

neuroendocrine peptides (15, 16). Cells were routinely cultured in DMEM supplemented with 5% or 10% fetal calf serum (FCS) (for, respectively, STC-1 or GluTag cells), 2 mM glutamine and antibiotics (100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin).

The INS-1E cell line is derived from a rat radio-induced insulinoma (17). Cells were routinely cultured in RMPI 1640 supplemented with 10% FCS, 1 mM sodium pyruvate, 50 µM 2-mercaptoethanol, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES and antibiotics (100 UI/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin).

### **Antibodies**

For Western blot, antibodies to SEMA3F (ab39956; 1:500) and NRP-1 (ab81321; 1:1000) were purchased from Abcam. Antibodies to NRP-2 (#3366; 1:1000), PLEXIN-A1 (#3813; 1:1000), Myc-Tag (#2276; 1:2500), phospho-ERK<sup>Thr202/Tyr204</sup> (#4370; 1:1000), ERK (#9102; 1:1000), phospho-p70S6K<sup>thr389</sup> (#9234; 1:1000) and p70S6K (#9202; 1:1000) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) and the antibody to  $\alpha$ -Tubulin was from Sigma-Aldrich (T6074; 1:20000) (St Louis, MO, USA). Goat anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA; 1:6000).

For immunohistochemistry, the antibody for SEMA3F (HP035008; 1:50) was purchased from Atlas Antibodies (Stockholm, Sweden). Anti-phospho-p70S6K (sc-7984; 1:100) was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). For immunofluorescence, the antibody to phospho-Histone H3<sup>ser10</sup> was from Cell Signaling Technology (#9706; 1:2000) and anti-chromogranin A was from Dako (M0869; 1:1000) (Glostrup, Denmark).

### **Immunochemistry staining**

Both human and mouse tissue sections were subjected to immunohistochemical analysis. Antigen retrieval was performed by incubating sections for 35 minutes in a citrate buffer pre-

heated at 98°C. The samples were then treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes. An enhanced streptavidin-biotin staining procedure was followed: sections were incubated with the appropriate biotinylated antibody for 30 minutes at room temperature and detection of the immunostaining was carried out using the EnVision™ detection kit (Dako) according to the manufacturer's instructions. All sections were counterstained with Meyer's hematoxylin. Negative controls were achieved by omission of the primary antibody.

### **Immunofluorescence staining**

STC-1 and GluTag cell lines were grown on glass coverslips inserted into 12-well plates and maintained 72 hours under normal culture conditions. Cells were then fixed for 10 minutes at room temperature in 3.7% cold formaldehyde, washed with PBS, and submitted to immunofluorescence staining. Cells were incubated in PBS 0.3% triton and 4% Bovine Serum Albumin and stained overnight with primary antibodies. After 24 hours, the secondary fluorescent Alexa Fluor-488 or -568-conjugated antibodies (1:1000; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were added and cells were counterstained with DAPI (D3571, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Finally, coverslips were mounted onto microscope slides and pictures taken using a Leica SP5X confocal laser scanning microscope.

### **Methylation Specific PCR (MSP)**

DNA from tumor tissues was extracted from fresh-frozen specimens using a commercial kit (Master Pure DNA and RNA purification kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA methylation was determined by methylation specific PCR (MSP) after chemical modification of genomic DNA with sodium bisulfite as described by Herman *et al.* (18). DNA modification was performed using the Methylamp DNA modification kit (Epigentek, Farmingdale, USA) according to the

manufacturer's instructions. The specific primers for the methylated and the unmethylated MSP are listed in Table 3. They were selected according to a previous study (11) and are specifically overlapping area D of SEMA3F promoter. PCRs were done in a total volume of 25 µl using 0.5 U of Taq Hotstar (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and 1 µl of bisulfite-treated DNA. DNA isolated from normal peripheral lymphocytes served as negative methylation control while a commercially available methylated DNA is used as methylation positive control (Qiagen). MSP products were analyzed by electrophoresis on 2% gel agarose.

### **Protein analysis**

Cells were seeded at a density of  $0.15 \cdot 10^6$  cells per well in 6-well plates and maintained 72 hours under normal culture conditions. Cells were then washed with cold PBS and lysed in cold solubilization buffer (pH8) containing 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-base, 2 mmol/L EDTA, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 1% NP40, 2 mmol/L Orthovanadate, and 20 mmol/L NaF. Cell lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 15 minutes at 4°C and the supernatant was stored at -80°C. Protein yield was quantified using the Bradford protein assay kit. Total protein lysates (20 µg) were separated by electrophoresis on a 7.5% SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA). Saturation was performed in a 0.1% Tween20 Tris-buffered saline solution containing 5% non-fat dry milk for 1 hour. The membranes were hybridized with primary antibodies overnight at 4°C, washed and incubated with the corresponding immunoperoxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Roissy, France) for 1 hour at room temperature. Immunodetection was performed using electrochemiluminescence (ECL Western Blotting Detection System; Covalab, Villeurbanne, France) and the ChemiDoc XR5 machine (Bio-Rad, hercules CA, USA). Cross-detection between phosphorylated and total forms of the proteins of interest was avoided by stripping the membranes.

### **Generation of stable SEMA3F-overexpressing cells**

The SEMA3F expression plasmid AP-SEMA3F-MYC and the corresponding empty vector pSectag-AP were kindly provided by Dr. David Ginty (Howard Hughes Medical Institute, USA) and Dr Joëlle Roche (University of Poitiers, France), respectively. Briefly, the full-length SEMA3F cDNA fragment lacking stop codons was ligated into the pSectag expression vector (Life Technologies). The full length Sema3F was placed between an APtag sequence at N-terminal and a MYC tag sequence at the C-terminal endings (19). Both AP-SEMA3F-MYC and pSectag-AP plasmids were stably transfected into STC-1 and GluTag cells using the SuperFect Transfection Reagent as described by the supplier (Qiagen). To select for stable expression, transfected cells were grown in standard culture medium supplemented with 300 µg/mL zeocin (Life Technologies).

### **Receptor binding assay**

We used the receptor affinity probe or receptor binding assay (RBA) staining method to demonstrate SEMA3F ectodomain binding within our cell lines. Selected stable clones containing the pSectag-AP empty vector or the AP-SEMA3F-MYC vector were grown in 25 cm<sup>3</sup> tissue flasks in complete DMEM. After an 80% culture confluence was reached, complete medium was replaced by FCS-free medium for 48 hours. The culture supernatant was then recovered and concentrated by size exclusion filtration by using a 30 kDa Amicon Ultra centrifugal filter unit (Millipore). The concentrated supernatant containing either AP-SEMA3F or AP protein was stored at -20°C.

The receptor binding assay was then performed following the procedure described by Brennan *et al* (20). Briefly, cells cultured on coverslips in 12-well culture dish were fixed with paraformaldehyde for 2 hours and then incubated with 100 nM of AP-SEMA3F or AP protein concentrated supernatant for 90 minutes. An acetone-formaldehyde fixative was then

added, followed by several washes and incubation at 65°C for 30 minutes to inactivate endogenous alkaline phosphatases. The cells were further exposed to NBT/BCIP substrate (B6404, Sigma-Aldrich), allowing formation of an intense dark blue-purple product in cells that bound AP-SEMA3F. Finally, coverslips were mounted onto microscope slides and images were taken with a light microscope.

### **Survival and proliferation analysis**

To assess cell viability, transfected STC-1 and GluTag cells were seeded in 96-well plates at a density of 1500 cells per well and maintained 72 hours under normal culture conditions. Cell number was assessed by measuring reduction of MTT (Sigma-Aldrich) into formazan by mitochondria. 20 µl of MTT (at a 5 mg/mL stock solution in PBS) was added in wells and plates were incubated for an additional 2.5 hours. Then the medium was removed and cells were solubilized in 100 µl of dimethyl sulfoxide. The absorbance was measured at 490 nm. In addition, MTT was also used to evaluate changes in the proliferative capacities of transfected cells. Instead of the viability test, the growth kinetics of cells was assessed by adding MTT onto cells 72, 96, and 120 hours following seeding. The proliferative capacities of transfected cells were also evaluated by phospho-Histone H3 immunostaining, by using the procedure described in the immunofluorescence staining section.

### **Cell cycle analysis**

Transfected STC-1 and GluTag cells were seeded in 6-well plates at a density of  $0.15 \cdot 10^6$  cells per well and maintained 72 hours under normal culture conditions. Cells were then subjected to serum starvation with 0.05% FCS medium, and replaced by complete medium 24 hours later. Cells were recovered 2 days later and stored as cell pellets at -80°C.

Cell cycle analysis was performed using the propidium iodide-based Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and the Canto II cytometer.

### ***In vivo tumor model***

#### *Intrasplenic xenograft mouse model*

Four-week old female Swiss nu/nu mice were obtained from Charles River Laboratories (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Mice were housed and bred in a specific pathogen free animal facility "AniCan" at the CRCL (Lyon, France). The experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP). Animals were anesthetized prior to all surgical procedures. After surgery, animals were allowed to recover in a sterile atmosphere and were fed ad libitum with a sterile diet.

The xenografting procedure was as previously described (21). Briefly, 50 µl of a solution containing tumor cells adjusted to a final concentration of  $5 \cdot 10^7$  cells/ml were injected into the spleen, from where they disseminated into the liver through the portal vein to form intra-hepatic tumor nodules. Two groups of mice were set. The first one composed of 10 mice (5 injected with STC-AP cells, 5 with STC-S3F<sub>2</sub> cells) was sacrificed at day 7. The second one composed of 31 mice (15 injected with STC-AP cells and 16 with STC-S3F<sub>2</sub> cells) was sacrificed at day 28. Both groups were weighted twice a week, and after sacrifice, spleen and liver were weighted, excised and prepared for histological analysis.

#### *Histological analysis and morphometry*

Tissue samples of all animals were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. For histological examination, 4 µm-thick sections were prepared according to conventional procedures, stained with hematoxylin-phloxin-saffron and observed with a light microscope.



The amount of intrahepatic tumor tissue was evaluated by morphometry using the Histolab software (Alphelys). The total surface occupied by tumor tissue was defined as the sum of each individual lesion and was expressed as a percentage of the total surface of the corresponding reference tissue section. The same procedure was followed to determine the number of nodules and the mean nodule surface.

### **Statistical analysis**

All data were the mean values of at least three individual experiments and are expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between means were compared by unpaired two-tailed student's *t*-test. A *P* value inferior to 0.05 was considered significant.

## Results

### *SEMA3F is expressed in endocrine cells along the small intestine and is lost with tumor progression.*

Immunohistochemical staining of normal peritumoral tissue showed the detection of SEMA3F in some cells scattered within the lining epithelial layer of the ileal part of the small intestine (Figure 1A); these cells were present in the crypts and along the villi; they were sometimes in contact with the intestinal lumen through their apical pole. Immunofluorescence staining revealed that all SEMA3F-positive cells also expressed chromogranin A (CGA), a specific peptidergic endocrine marker (Figure 1B). However, all CGA-positive cells did not express SEMA3F, suggesting a restricted expression in a specific endocrine sub-population.

We then assessed SEMA3F expression in human endocrine tumor samples from the gut. A TMA containing cores from 43 grade 1-2 digestive NETs (Table 1) was immunostained for SEMA3F and NRP-2. SEMA3F was detected in 30% of cases. The labeling showed a cytoplasmic location. The distribution over the tumor was homogeneous. The apparent expression level was usually faint as compared to internal controls (normal endocrine cells of the adjacent mucosa); however, it was variable from one cell to another, some tumor cells showing an intense, dot-like granular cytoplasmic positivity. There were notable differences in SEMA3F expression according to the location of the primary (Table 1). Only 5% of the tumors arising in distal small intestine exhibited a positive immunoreactivity for SEMA3F, By contrast, its receptor NRP-2 was expressed in more than 70% of total cases and in 88% of tumors from distal small intestine, where its expression was also associated with the presence of metastases in 90% of the cases.

In order to better analyze the relations between SEMA3F expression and local invasion in ileal NETs, we studied a series of 38 patients with multifocal ileal NETs, corresponding to a

total of 247 tumors showing variable degrees of local invasion. According to the current TNM classification (22, 23), three groups could be identified: (a) tumors limited to the submucosa, staged as T1 (n = 42), (b) tumors invading the muscularis propria, staged as T2 (n = 26), (c) tumors invading beyond the muscularis propria, staged as T3 (n = 33). In this setting, the number of tumors presenting with detectable SEMA3F expression significantly decreased with tumor stage, from 61.9% positive cases amongst T1 lesions to 39.4% for T3 lesions ( $P < 0.005$ ). In contrast, the number of cases expressing NRP-2 remained unchanged whatever the stage (Figure 2A and 2B).

***SEMA3F promoter is methylated in digestive NETs.***

Kusy *et al.* had already shown that area D of SEMA3F promoter was methylated in tumoral cell lines (11). Based on these results, we used primers specific of area D and assessed by MSP the methylation status of *SEMA3F* promoter in 3 human tumors (Figure 2C). We showed that 2 over 3 human tumors were methylated. To examine the correlation between methylation and expression, we compared the methylation status of the *SEMA3F* promoter with the immunohistochemical staining for SEMA3F protein in the same tumor. In this very limited series, we were able to demonstrate an overall correlation between the two parameters. SEMA3F protein was expressed by the tumor without significant promoter methylation (Case 1) but was not detected in the two other cases, showing evidence of promoter methylation (Case 2 and 3) (Figure 2D). Whereas the low number of cases available for study prevents any definitive conclusion, these results nevertheless suggest that SEMA3F expression might depend on promoter methylation.

### ***SEMA3F is differently expressed in cellular models of GEP-NETs.***

The evaluation of the expression pattern of SEMA3F and its receptors NRP-1, NRP-2 and PLEXIN-A1 was achieved by Western blot in three different cellular models of GEP-NETs: STC-1 and GluTag, representative of high grade digestive neuroendocrine carcinomas (24) and INS-1E, representative of low grade neuroendocrine pancreatic tumors (25). STC-1 and GluTag cells did not express SEMA3F but exhibited a clear expression of PLEXIN-A1 and both neuropilins. Conversely, INS-1E cells retained the expression of SEMA3F, NRP-1 and PLEXIN-A1 but they did not express NRP-2 (Figure 3A). Confocal laser microscopy analysis demonstrated that NRP-2 was expressed at the cell membranes of STC-1 and GluTag cells while it was not detectable in INS-1E (Figure 3B).

### ***Generation of stable clones expressing functional SEMA3F***

The pSectag-AP plasmid was used to generate stable control STC-1 and GluTag clones (STC-AP and GluTag-AP). The AP-SEMA3F-MYC plasmid was used to generate two stable SEMA3F overexpressing STC-1 and GluTag clones (STC or GluTag -S3F<sub>1</sub> and -S3F<sub>2</sub>). The expression of SEMA 3F in stable transfected clones was assessed by immunoblot using MycTag antibody (Figure 4A) and SEMA3F antibody (Figure 4B). For each STC-1 and GluTag cell lines, the SF<sub>2</sub> clone was chosen for further experiments according to the expression level of Myc. Additionally, we performed a receptor binding assay to verify that the selected clones secreted a SEMA3F protein able to bind the NRP-2 receptor present at the membrane surface of STC-1 and GluTag cells. For this purpose, conditioned medium obtained from STC-S3F<sub>2</sub> and GluTag-S3F<sub>2</sub> clones was applied on STC-1 and GluTag cells. As shown in figure 4C, a strong blue-purple staining was observed at the surface of STC-1 and GluTag cells treated with conditioned medium containing AP-SEMA3F. This result suggests

that STC-1 and GluTag cells were able to bind SEMA3F proteins contained in conditioned medium.

***SEMA3F overexpression negatively regulates cell viability and proliferation.***

We were therefore prompted to evaluate the effect of SEMA3F overexpression on cell viability and proliferation *in vitro*. SEMA3F overexpression induced a decrease of cell viability, as measured by MTT assay, of more than 60% in both STC-S3F<sub>2</sub> and GluTag-S3F<sub>2</sub> clones ( $P < 0.0005$ ) (Figure 5A). Cell proliferation was assessed by cell cycle analysis and phospho-histone H3 expression. Cell cycle analysis revealed a lengthened G1 phase in STC-1 and GluTag clones overexpressing SEMA3F (Figure 5B). Then, the expression of the proliferation marker phospho-Histone H3 was evaluated by immunofluorescence. Results clearly demonstrated that the number of phospho-histone H3 positive cells was strongly reduced amongst S3F<sub>2</sub> clones as compared to AP clones (from 4.30% ± 0.43% to 2.24% ± 0.21% for STC-AP and STC-S3F<sub>2</sub> clones, and from 3.95% ± 0.37% to 1.29% ± 0.40% for GluTag-AP and GluTag-S3F<sub>2</sub> clones, respectively) ( $P < 0.005$ ) (Figure 5C and 5D).

MTT assay was also used to determine whether SEMA3F overexpression could have an effect on cell proliferation. Results revealed that STC-S3F<sub>2</sub> and GluTag-S3F<sub>2</sub> exhibited a significant decrease in proliferation rate compared to their respective AP clones ( $P < 0.0005$ ) (Figure 5E and 5F).

***SEMA3F strongly inhibits tumor development in vivo.***

To assess whether SEMA3F could impact tumor formation and progression, a mouse model of intrahepatic dissemination after intrasplenic injection of tumoral cells was used. We focused on STC-1 clones for *in vivo* studies because the experimental model based on STC-1 cell line has been extensively characterized in our laboratory (21, 24, 26, 27). Furthermore, *in*

*in vitro* behavior of both STC-1 and GluTag clones was quite similar. At the date of sacrifice (day 28 post intrasplenic injection), mice grafted with the STC-S3F<sub>2</sub> clone exhibited a reduced weight loss compared to animals grafted with the STC-AP clone (Figure 6A). Even if the difference in weight curves did not reach statistical significance, the difference in the last weight points was close to significance ( $P = 0.085$ ). Complementary results were obtained by weighting spleens and livers. Spleens containing “primary” STC-S3F<sub>2</sub>-induced tumors exhibited a significantly reduced weight compared to controls ( $0.11 \pm 0.009$  g vs  $0.170 \pm 0.012$  g,  $P < 0.005$ ) (Figure 6B and 6C). Liver weights were not significantly different between animals grafted with STC-S3F<sub>2</sub> clone and controls. However, the number of visible nodules in liver of STC-S3F<sub>2</sub> grafted animals appeared to be lower at macroscopical examination (Figure 6D and E).

We therefore decided to perform further morphometric analyses in histologically-processed liver samples. The percentage of tissue surface occupied by tumor cells was found to be significantly decreased in representative liver sections, from  $15.1\% \pm 3.05\%$  for animals grafted with STC-AP to  $2.8\% \pm 0.52\%$  for animals grafted with STC-S3F<sub>2</sub> clone ( $P < 0.005$ ) (Figures 7A and 7B). This resulted from a reduction in both the mean number and size of intrahepatic nodules (Figure 7C and 7D). Liver sections were then subjected to Ki67 immunostaining to detect any effect of SEMA3F on proliferation *in vivo*. Results clearly demonstrated a significantly reduced Ki67 index, from  $10.14\% \pm 1.38\%$  to  $2.79\% \pm 0.30\%$  for STC-AP and STC-S3F<sub>2</sub> clones respectively ( $P < 0.0005$ ) (Figure 7E and 7F).

Interestingly, when the animals were sacrificed as early as 7 days after tumor cells intrasplenic injection, there was much less intrahepatic micronodules after STC-S3F<sub>2</sub> injection compared to STC-AP. At this stage, intrahepatic micronodules surface was reduced from  $0.55\% \pm 0.30\%$  to  $0.10\% \pm 0.02\%$  for STC-AP and STC-S3F<sub>2</sub> clones respectively, suggesting thus a decrease in liver colonization and/or engraftment.

***Anti-tumor effect of SEMA3F can be attributed to alterations of MAPK and mTOR signaling pathways both in vitro and in vivo.***

To know whether the SEMA3F-driven decrease of proliferation could be the result of the alteration of particular transduction pathways, we next examined the expression levels of activated forms of p70S6K and ERK, key effectors of the canonical survival pathways mTOR and MAPKinase, respectively. Results showed that the *in vitro* expression of the phosphorylated forms of p70S6K and ERK was reduced in STC-S3F<sub>2</sub> clone compared to STC-AP clone and it was also the case *in vivo* in intrahepatic nodules developed after intrasplenic injection of these clones (Figure 8A-B). In an attempt to bring out a role of apoptosis, the expression of the pro-apoptotic cleaved caspase-3 was observed in both clones. The expression level of this protein was not modified, neither *in vitro* nor in intrahepatic nodules (Figure 8A-B).

## **Discussion**

Despite common structural and functional properties shared by endocrine and neural cells, very little attention has been paid so far to the expression patterns of axon guidance molecules in normal and tumoral neuroendocrine cells. The few data available in the literature revealed the expression of neuropilin-2, a receptor for class 3 semaphorins, in endocrine cells throughout the intestinal tract and in pancreatic islets. Neuropilin-2 expression was either conserved in pancreatic neuroendocrine tumors or lost in most of the carcinoid tumors derived from the colon and the appendix (2, 28). By the use of a tissue-micro-array containing about 110 samples of pancreatic and digestive neuroendocrine tumors, we determined the expression patterns of several axon guidance molecules and their partners (unpublished data). From this study, Semaphorin3F and its preferential receptor neuropilin-2 emerged as potentially involved in tumor progression.

Indeed, we demonstrated the expression of SEMA3F in normal neuroendocrine cells of the small intestine epithelium and the loss of its expression in a large majority of the distal small intestine tumors spotted on the TMA, while these tumors exhibited a strong expression of neuropilin-2 associated with the presence of metastases. To get further information, we used a large series of 38 patients carrying multiple ileal carcinoid tumors. In this particular syndrome, whose natural history remains unknown (29), the different T stages (T1-T3) are often present in a same patient, making it possible to follow the expression pattern of a particular marker according to the T stage. By this way, we demonstrated that SEMA3F expression progressively decreased from T1 to T3 tumor status, whereas neuropilin-2 expression remained unchanged. This result was in accordance with previous reports showing that SEMA3F expression was correlated inversely with tumor stage and aggressiveness in lung tumors (10), and also in colorectal carcinoma (14). Highly metastatic tumor cells from human prostate carcinoma, bladder carcinoma and melanoma were described to down



regulate SEMA3F expression (13). The methylation of SEMA3F promoter has been suggested as a potential regulator of SEMA3F gene expression. In our study, we showed that this methylation could affect the SEMA3F protein expression in human tumors. This result suggests that some tumor cells might use the methylation to shut down the expression of SEMA3F. Similarly, STC-1 and GluTag cell lines, which are representative of highly proliferating and aggressive neuroendocrine tumors from respectively small intestine and colon (24), exhibited very low SEMA3F and high neuropilin-2 expression, while INS-1E cell line, representative of a poorly aggressive pancreatic neuroendocrine tumor (25) expressed SEMA3F but a few neuropilin-2. Taken together, these results suggest that the expression profile of SEMA3F/Neuropilin-2 could be related to the aggressive behavior of the tumoral cells.

The aim of our study was thus to evaluate the impact of the re-expression of SEMA3F in STC-1 and GluTag cells through *in vitro* and *in vivo* approaches. *In vitro*, these neuroendocrine cells exhibited reduced proliferation rate when endogenous SEMA3F was increased after transfection. Interestingly, this reduction of proliferation seemed to be due to a lengthening of G1 phase as if SEMA3F re-expression acted on pathways targeting cell cycle. The next challenge was to assess the *in vivo* effect of endogenous SEMA3F re-expression. For this purpose, STC-1 cells were chosen for several reasons: they originate from an intestinal tumor, their use in an intrasplenic xenograft model was well validated in our lab (21, 24, 26, 27) and they expressed the highest SEMA3F level after stable transfection. Using the xenograft model of intrahepatic dissemination after intrasplenic injection of tumoral cells, we were able to demonstrate an anti-tumoral effect of SEMA3F in STC-1 cell line. First of all, we observed a better clinical status of the animals bearing tumors derived from SEMA3F expressing STC-1 cells (clone STC-S3F<sub>2</sub>) since they lose less weight than control animals. This effect could be the result of a decrease in hormone release from tumoral cells through the

reduction of tumor mass, particularly through the reduction of GLP-1 secretion (16) suspected to play a role in cancer cachexia and anorexia (30). At the tumor level, a clear decrease of tumor masses was observed macroscopically in spleen and liver from STC-S3F<sub>2</sub> tumors bearing mice. This was strongly confirmed by histological examination of the liver, showing a significant decrease of the number of nodules as well as their mean surface, resulting to a dramatic decrease of the total tumor surface. What could be the mechanisms responsible for the SEMA3F induced anti-tumoral effect? Most likely is the conjunction of several processes: when the animals were killed as early as 7 days after grafting, we observed very few intrahepatic early nodules with STC-S3F<sub>2</sub> clone compared to STC-AP one, suggesting that SEMA3F expression was able to inhibit liver implantation and by doing so could limit the migration ability of STC1 cells. Furthermore, a decrease in proliferation rate was probably also involved since we founded a significant decrease in Ki67 index between control and STC-S3F<sub>2</sub> tumors. To get further, we demonstrated that mTOR and MAPK signaling pathways were down-regulated in STC-S3F<sub>2</sub> cells both *in vitro* and *in vivo*. Indeed, the phosphorylated forms of the major effectors: p70S6K and ERK respectively for mTOR and MAPK pathways were strongly reduced in STC-S3F<sub>2</sub> cells in culture as well in intrahepatic nodules. A link between these effectors and proliferation has already been demonstrated both by molecular biology experiment but also by using specific inhibitors of mTOR pathway (26). So in our context, SEMA3F could slow proliferation by reducing the activity of mTOR and MAPK pathways, demonstrated to be up-regulated in several cancer types, including neuroendocrine tumors. On the contrary, an activation of apoptosis did not seem to be involved, since cleaved form of caspase 3 was not increased, neither *in vitro* nor *in vivo*. Taken together, our results suggested that SEMA3F decreased tumor growth through several mechanisms targeting cell proliferation and survival.

Among class 3 semaphorins, SEMA3F has been extensively studied for its anti-tumoral effect in several cancer types. The first evidence for this effect came from studies performed on lung cancer, where SEMA3F was identified in regions of chromosome 3p21 commonly deleted in this cancer, suggesting a tumor suppressor role (7–9). Subsequently, SEMA3F loss was observed early during lung tumorigenicity (31) and correlated with more aggressive stages (10). Later, overexpression of SEMA3F in H157 lung cancer cells was reported to block tumor formation in an orthotopic model of lung cancer, in correlation with a strong reduction in activated MAPK signaling (32). SEMA3F transfected melanoma cells lose their metastatic properties, through an inhibition of their capacities to adhere and migrate and an inhibition of angiogenesis, leading to the acquisition of a benign tumor phenotype (13). Recently, Wu *et al.* reported the loss of SEMA3F expression in colorectal cancer specimens and the inhibition of proliferation and tumorigenesis under the overexpression of SEMA3F in colorectal cancer cell lines (14). Our study reinforced the antitumoral effect of SEMA3F by showing for the first time its potential role in GEP-NETs. Moreover, we were able to hypothesize that SEMA3F could play on cell cycle and/or cell migration to exert its functions. The intracellular partners of SEMA3F signaling are not clearly identified but it has been showed that phosphorylation of collapsin response mediator proteins (CRMPs) is part of class 3 semaphorin pathway (33). CRMP2 and its phosphorylated forms have been involved in signaling pathways that regulate proliferation in non-neuronal cells (34). Furthermore, unpublished data from our group showed a decrease of CRMP2 expression in the invasive compartment of digestive neuroendocrine tumors. It could thus be of great interest to further investigate if CRMP proteins play a role in the SEMA3F-mediated anti-tumoral effect observed in neuroendocrine cell lines.

One of the main characteristics of GEP-NETs is their highly vascularized phenotype (35), suggesting an important role for VEGF secreted by tumoral cells. Beside its canonical

receptors (VEGF-R1-3), VEGF can also bind neuropilins and it is known that SEMA3F strongly inhibits VEGF binding to neuropilins (36). The loss of SEMA3F expression in GEP-NETs could thus be responsible of an activation of neuropilin-dependent VEGF signaling and promote vascularization. Moreover, in addition to its effect on tumor cell proliferation, SEMA3F-induced downregulation of mTOR and MAPK signaling pathway could decrease VEGF expression. Indeed, it is well established that both mTOR and MAPK pathway stimulation leads to VEGF transcription and expression (37, 38). A relationship between the alterations of both signaling pathways by SEMA3F and the downregulation of VEGF synthesis have already been demonstrated in lung cancer cells (12). We hypothesized that SEMA3F could maintain a physiological VEGF expression in normal endocrine cells while its loss in tumors could lead to an increase of VEGF expression leading thus to a highly vascularized phenotype.

In summary, we have showed for the first time that the axon guidance factor SEMA3F was expressed in endocrine cells of the digestive epithelium and is lost in endocrine tumor arising in the distal small intestine, according to the stage. We also demonstrated that overexpression of SEMA3F reduced the proliferation of neuroendocrine cancer cells *in vitro*, in association with growth inhibition of the xenografted tumors *in vivo*. Therefore, SEMA3F and its signaling pathway could represent a target for endocrine tumor therapy.

## References

1. Yao JC et al. One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2008;26(18):3063–3072.
2. Cohen T et al. Neuroendocrine cells along the digestive tract express neuropilin-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(2):395–403.
3. Villasenor A et al. EphB3 marks delaminating endocrine progenitor cells in the developing pancreas. *Dev Dyn*. 2012;241(5):1008–1019.
4. Yang YHC et al. Paracrine signalling loops in adult human and mouse pancreatic islets: netrins modulate beta cell apoptosis signalling via dependence receptors. *Diabetologia*. 2011;54(4):828–842.
5. Tran TS, Kolodkin AL, Bharadwaj R. Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007;23:263–292.
6. Rehman M, Tamagnone L. Semaphorins in cancer: biological mechanisms and therapeutic approaches. *Semin Cell Dev Biol*. [published online ahead of print: October 22, 2012]; doi:10.1016/j.semcdb.2012.10.005
7. Roche J et al. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene*. 1996;12(6):1289–1297.
8. Sekido Y et al. Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4120–4125.
9. Xiang RH et al. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics*. 1996;32(1):39–48.
10. Brambilla E, Constantin B, Drabkin H, Roche J. Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am J Pathol*. 2000;156(3):939–950.
11. Kusy S et al. Promoter characterization of Semaphorin SEMA3F, a tumor suppressor gene. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1730(1):66–76.
12. Potiron VA et al. Semaphorin SEMA3F affects multiple signaling pathways in lung cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(18):8708–8715.
13. Bielenberg DR et al. Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1260–1271.

14. Wu F et al. Endogenous axon guiding chemorepulsant semaphorin-3F inhibits the growth and metastasis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2011;17(9):2702–2711.
15. Drucker DJ, Jin T, Asa SL, Young TA, Brubaker PL. Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol Endocrinol Baltim Md*. 1994;8(12):1646–1655.
16. Rindi G et al. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am J Pathol*. 1990;136(6):1349–1363.
17. Asfari M et al. Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology*. 1992;130(1):167–178.
18. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9821–9826.
19. Giger RJ et al. Neuropilin-2 is required in vivo for selective axon guidance responses to secreted semaphorins. *Neuron*. 2000;25(1):29–41.
20. Brennan C, Fabes J. Alkaline phosphatase fusion proteins as affinity probes for protein localization studies. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ*. 2003;2003(168):PL2.
21. Pourreyron C et al. The role of angiogenesis in endocrine liver metastases: an experimental study. *J Surg Res*. 2008;144(1):64–73.
22. Rindi G et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2006;449(4):395–401.
23. Rindi G et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch Int J Pathol*. 2007;451(4):757–762.
24. Bollard J et al. Antitumor Effect of Everolimus in Preclinical Models of High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2013;:331–340.
25. Poncet G et al. Angiogenesis and tumor progression in neuroendocrine digestive tumors. *J Surg Res*. 2009;154(1):68–77.
26. Couderc C et al. Targeting the PI3K/mTOR pathway in murine endocrine cell lines: in vitro and in vivo effects on tumor cell growth. *Am J Pathol*. 2011;178(1):336–344.
27. Walter T et al. Effects of somatostatin and octreotide on the interactions between neoplastic gastroenteropancreatic endocrine cells and endothelial cells: a comparison between in vitro and in vivo properties. *Neuroendocrinology*. 2011;94(3):200–208.
28. Cohen T et al. Neuropilin-2 is a novel marker expressed in pancreatic islet cells and endocrine pancreatic tumours. *J Pathol*. 2002;198(1):77–82.

29. Burke AP, Thomas RM, Elsayed AM, Sobin LH. Carcinoids of the jejunum and ileum: an immunohistochemical and clinicopathologic study of 167 cases. *Cancer*. 1997;79(6):1086–1093.
30. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key? *Cancer Res*. 1999;59(18):4493–4501.
31. Lantuéjoul S et al. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol*. 2003;200(3):336–347.
32. Kusy S et al. Selective suppression of in vivo tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells. *Neoplasia N Y N*. 2005;7(5):457–465.
33. Mitsui N et al. Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *EMBO J*. 2002;21(13):3274–3285.
34. Tahimic CGT et al. Evidence for a role of Collapsin response mediator protein-2 in signaling pathways that regulate the proliferation of non-neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(4):1244–1250.
35. Scoazec J-Y. Angiogenesis in neuroendocrine tumors: therapeutic applications. *Neuroendocrinology*. 2013;97(1):45–56.
36. Parker MW, Hellman LM, Xu P, Fried MG, Vander Kooi CW. Furin processing of semaphorin 3F determines its anti-angiogenic activity by regulating direct binding and competition for neuropilin. *Biochemistry (Mosc)*. 2010;49(19):4068–4075.
37. Zhu C et al. PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011;137(11):1587–1594.
38. Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG Jr. TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell*. 2003;4(2):147–158.

## Figure legends

**Figure 1:** SEMA3F is expressed in endocrine cells of the human digestive epithelium. (A) Immunohistochemical staining of human small intestine sections revealed SEMA3F positivity in some cells of the digestive epithelium (X200) (B) Confocal analysis of double-immunofluorescence staining demonstrated that SEMA3F is specifically expressed in chromogranin A-positive cells.

**Figure 2:** SEMA3F expression is lost during tumor progression and its expression is regulated by methylation. (A) Immunohistochemical staining of human multifocal carcinoid tumors revealed that the decrease of SEMA3F expression is correlated with the tumor stage. In the same time, NRP-2 expression remains stable whatever the stage. (B) The proportion of SEMA3F-negative cases is increased from stage 1 to stage 3 in multifocal carcinoid tumors (X400). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ . (C) MSP assay on 3 human tumors (cases 1-3). PCR products are shown for human tumors, normal peripheral lymphocytes and a commercially available methylated DNA. U+ and M+ are positive controls (CT+) for Unmethylated or Methylated DNA. (D) Immunohistochemical staining of human tumors (cases 1-3) revealed that SEMA3F expression persisted only in case 1 (X200). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ .

**Figure 3:** Expression profiles of SEMA3F and its receptors neuropilin-1, -2 and plexin-A1 in three GEP-NETs cell lines. (A) Western blot analysis showed that SEMA3F expression is not detectable in both STC-1 and GluTag enteroendocrine cells while its expression was found in the rat insulinoma cell line INS-1E. Both neuropilins and plexin-A1 are highly expressed in both STC-1 and GluTag cells compared to INS-1E cells. (B) Confocal analysis of NRP-2



immunostaining showed a membranous expression of the receptor in STC-1 and GluTag cells while no expression was detected in INS-1E cells.

**Figure 4:** Stable transfection of the pSectag-SEMA3F-AP expression plasmid led to the re-expression and the secretion of SEMA3F in both STC-1 and GluTag cells. **(A)** MycTag expression analysis by western blot. **(B)** SEMA3F expression was detected in both STC-S3F<sub>2</sub> and GluTag-S3F<sub>2</sub> clones that harbor a high MycTag expression. **(C)** Receptor-binding assay: An alkaline phosphatase fusion SEMA3F contained in S3F<sub>2</sub> clones conditioned medium was able to bind STC-1 and GluTag wild-type cells as shown by positive staining

**Figure 5:** Effect of SEMA3F on cell viability and proliferation. **(A)** MTT assay showed a decrease of cell viability in S3F<sub>2</sub> clones.  $***P < 0.0005$ . **(B)** Cell cycle analysis: both STC-1 and GluTag S3F<sub>2</sub> clones displayed a lengthened G1 phase. **(C-D)** Immunofluorescent staining of phospho-Histone H3: number of positive cells was significantly reduced in S3F<sub>2</sub> clones compared to AP clones (X200).  $**P < 0.005$ . **(E-F)** Kinetics study of cell proliferation was performed by using MTT assay to determine the number of live cells 72, 96, and 120 hours following seeding. SEMA3F-expressing clones presented a reduced proliferation rate compared to AP clones.  $***P < 0.0005$ .

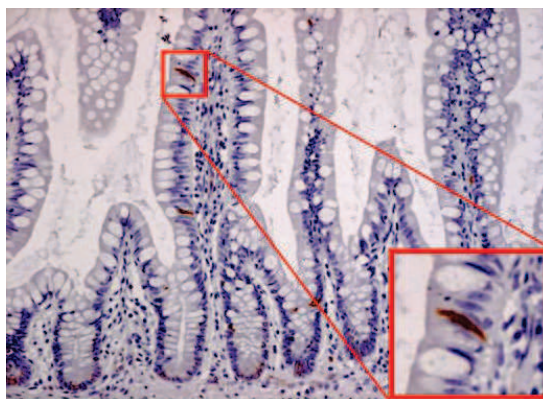
**Figure 6:** Macroscopic *in vivo* effect of SEMA3F. **(A)** STC-S3F<sub>2</sub>-xenografted mice displayed a reduced body weight loss. **(B-C)** Spleen tumors were smaller in STC-S3F<sub>2</sub> grafted animals, leading to a significantly lower spleen weight.  $**P < 0.005$ . **(D-E)** Despite a lower number of visible nodules in liver of STC-S3F<sub>2</sub> grafted animals, the mean liver weight was not significantly different between the two clones.

**Figure 7:** Histologic and morphometric analyses of liver. (A) HPS staining: many nodules of variable size were present in STC-AP grafted animals (left) whereas only few small nodules were visible in STC-S3F<sub>2</sub> grafted animals (right) (X200). (B) Morphometric analysis showed a strong decrease in the intrahepatic tumor surface. \*\* $P < 0.005$ . (C-D) The reduction of the hepatic surface invaded by STC-S3F<sub>2</sub> is concomitant with a decrease of the number and the size of the hepatic nodules. \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ . (E-F) Proliferation rate of the intrahepatic nodules estimated by Ki67 immunostaining: the Ki67 index was decreased in STC-S3F<sub>2</sub>-derived nodules compared to control nodules (X200). \*\*\* $P < 0.0005$ .

**Figure 8:** Effect of SEMA3F on the activity of MAPK and mTOR signaling pathways. (A) Western blot analysis demonstrated that the expression of phosphorylated forms of both ERK and p70S6K are decreased in STC-S3F<sub>2</sub> cells compared to STC-AP cells. Cleaved-caspase 3 expression was not modified by SEMA3F expression. (B) *In vivo*, immunohistochemical staining showed that both ERK and p70S6K phosphorylation is decreased in STC-S3F<sub>2</sub>-derived nodules compared to STC-AP nodules. The expression level of caspase-3 cleavage was not modified between the two clones (X200).

FIGURE 1

A



B

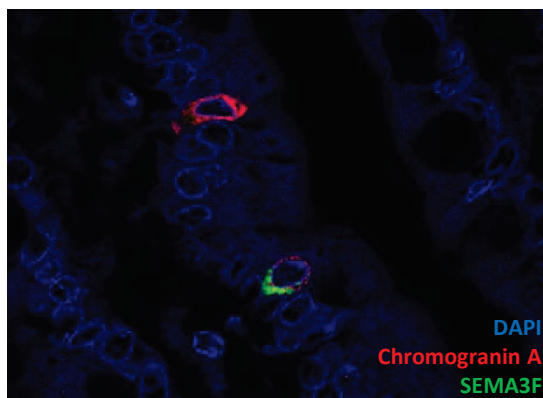


Table 1: Digestive endocrine tumors included in the tissue microarray

Location of the primary	Stomach: 3 Proximal small intestine: 5 Distal small intestine: 31 Colon and rectum: 4
Age (mean±SD)	62±10.2 years
Sex (M/F)	26/17
Tumor size (mean±SD)	30±21 mm
WHO classification	Neuroendocrine tumors (grade 1 and 2): 43
Histological grade (ENETS)	Grade 1: 32 Grade 2: 11
Lymph node metastases (N0/N1), number of cases	5/38
Distant metastases (M0/M1), number of cases	16/27

Table 2: Primers for MSP PCR

Primers	Sequence	Product size (bp)
Me For	5'-CGGGGAAGAGCGTTGTTTCGGGC-3'	110
Me RV	5'-CGAACCCCTTACCTACGAAACGACG-3'	
UnMe For	5'-TTTATGGGGAAGAGTGTTGTTTTGGGT-3'	115
UnMe RV	5'-CCCAAACCCCTTACCTACAAAACAACA-3'	

FIGURE 2

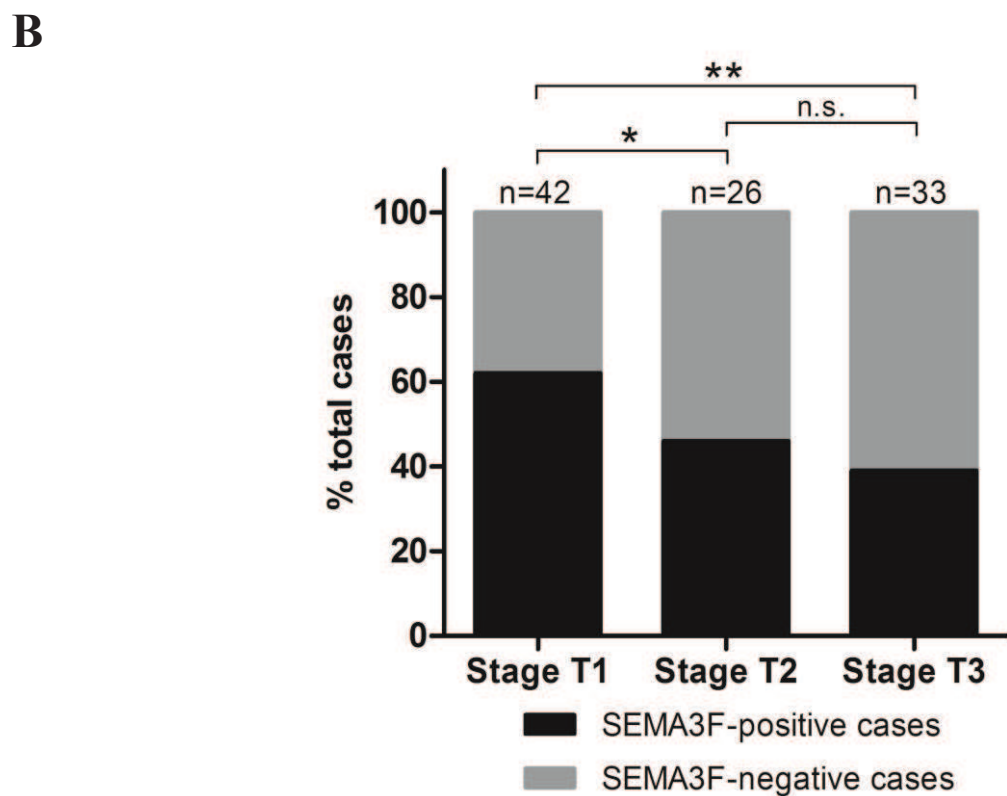
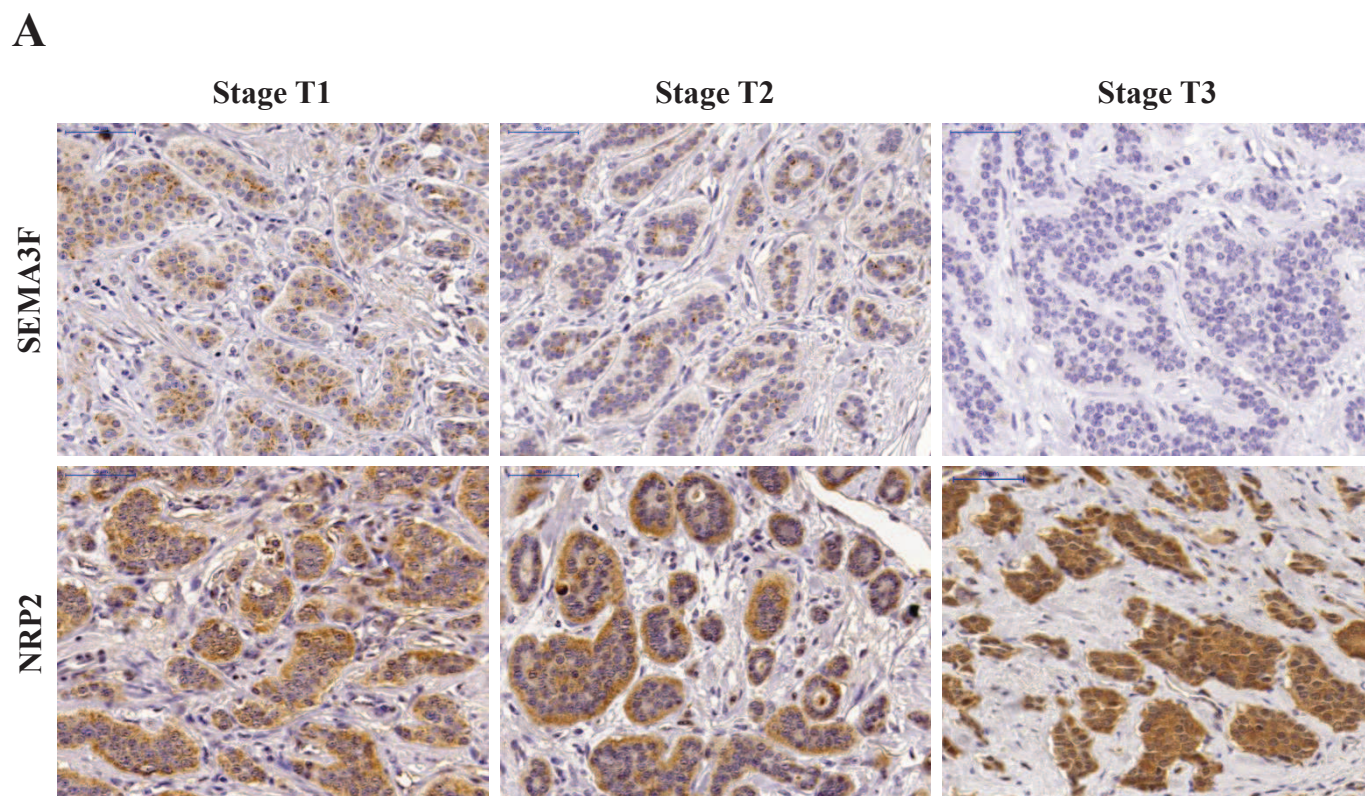
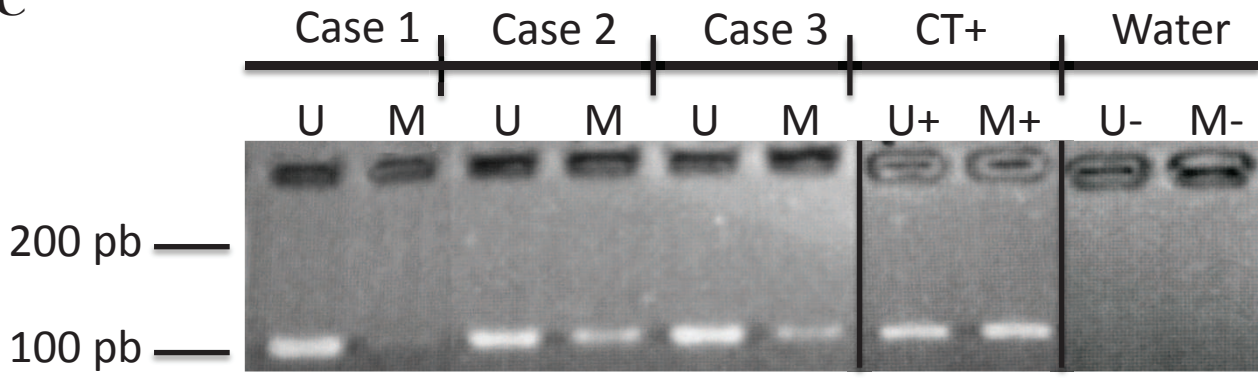
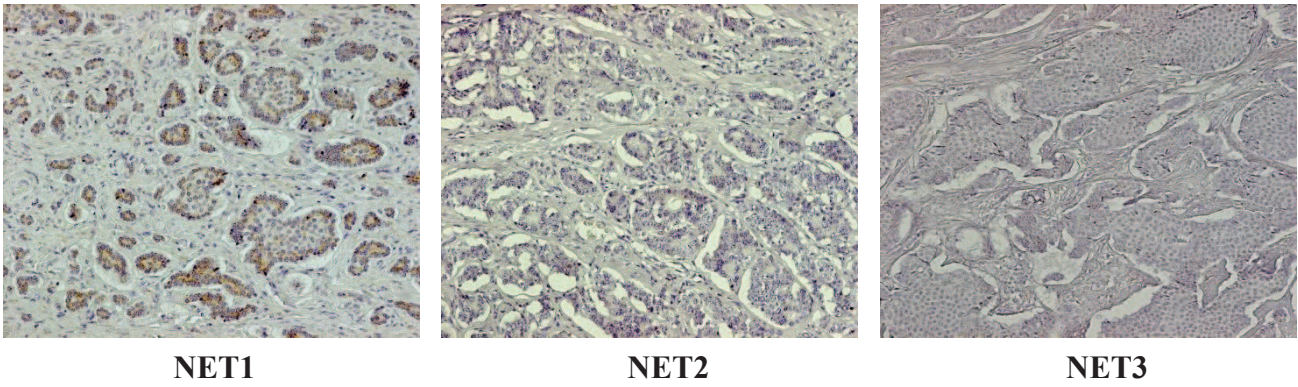


FIGURE 2 bis

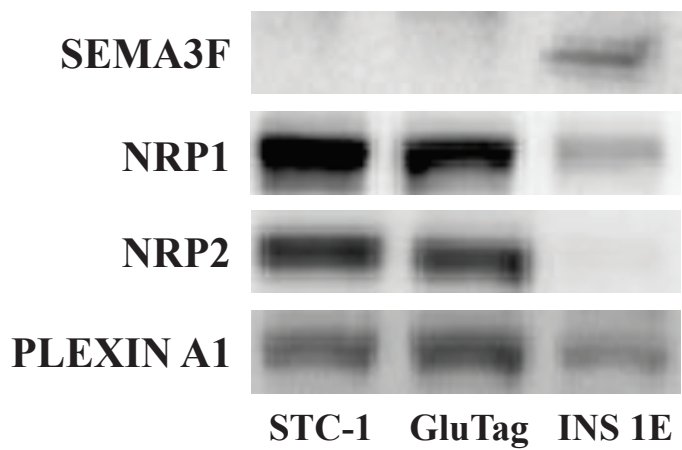
C



D

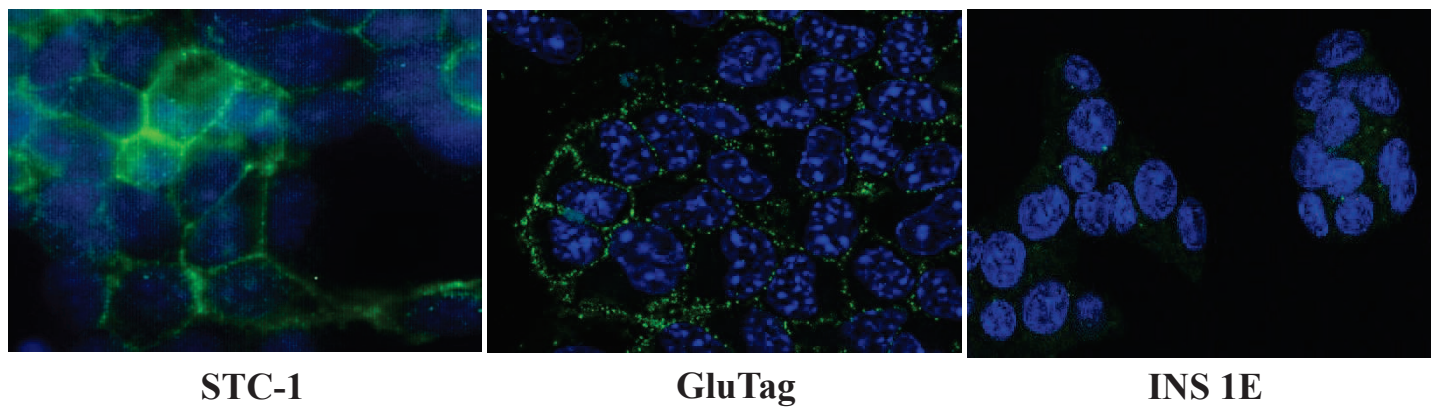


A



B

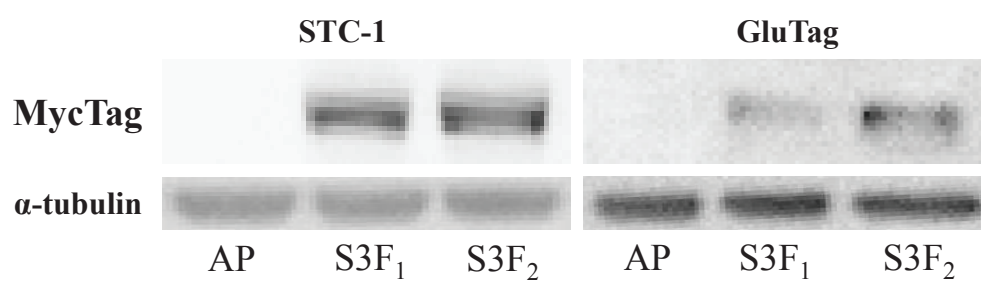
Dapi / NRP2



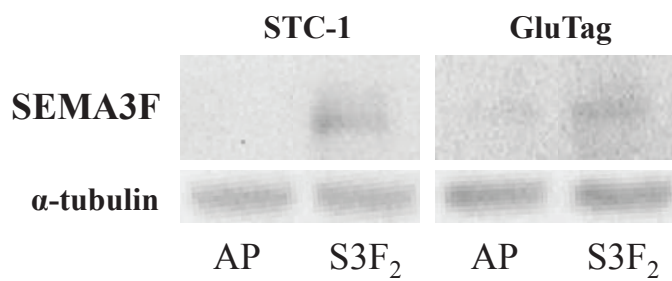


**FIGURE 4**

**A**



**B**



**C**

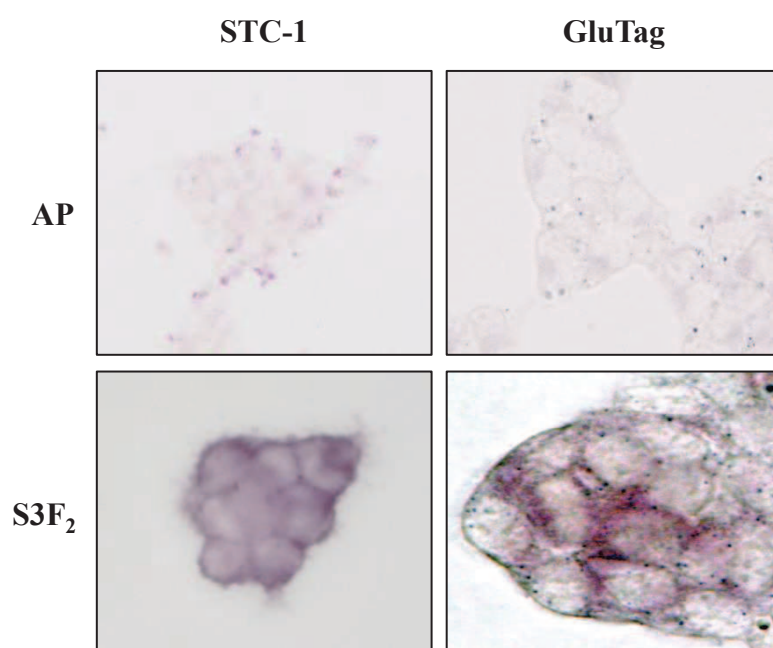
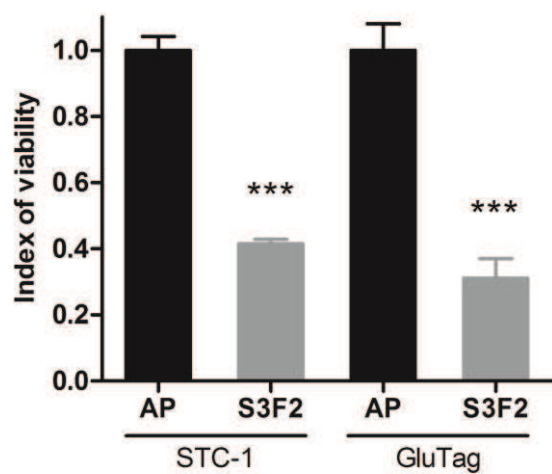
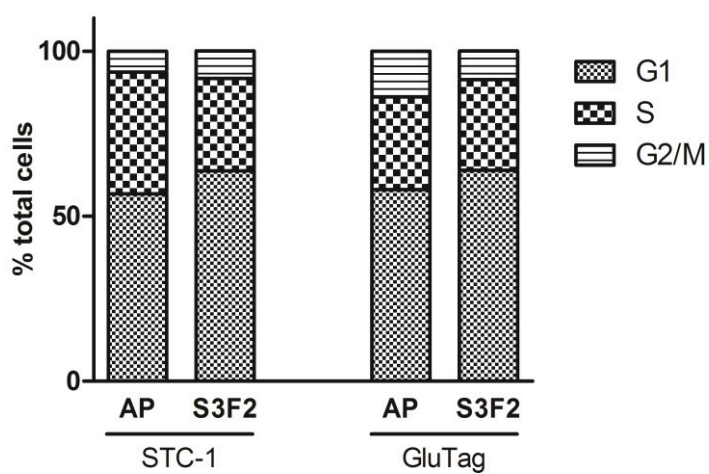


FIGURE 5

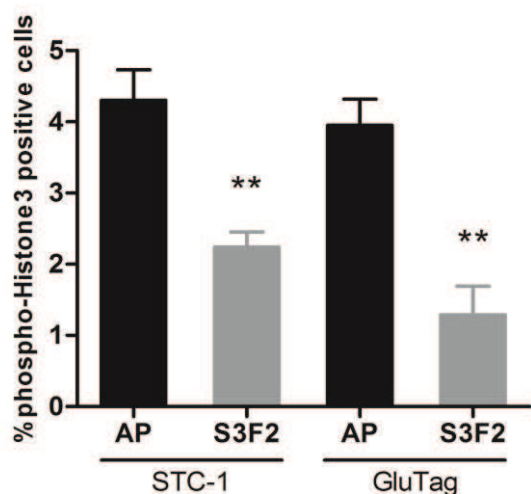
A



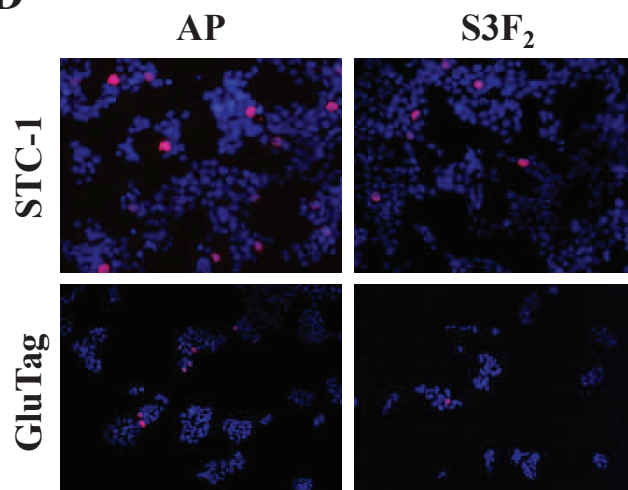
B



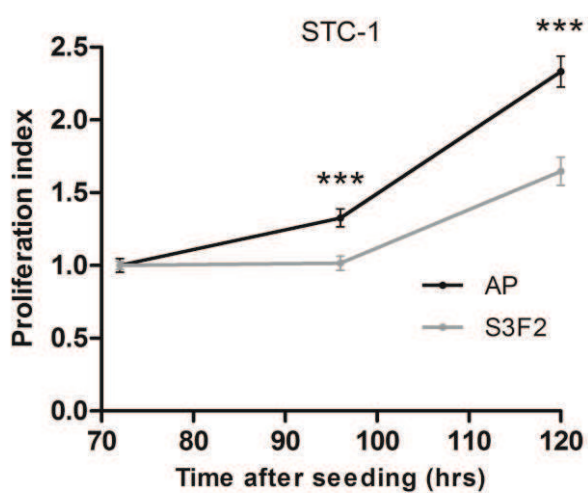
C



D



E



F

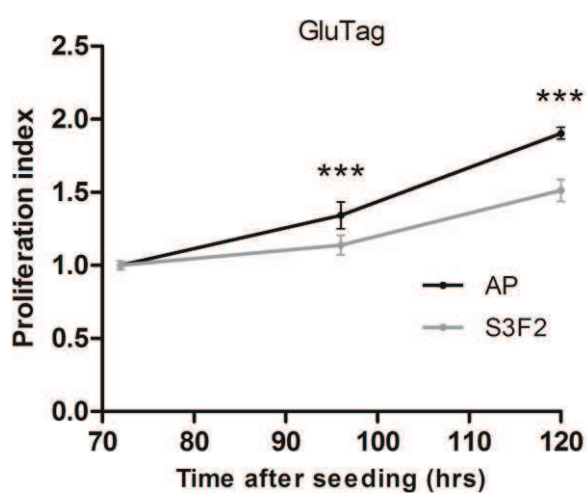


FIGURE 6

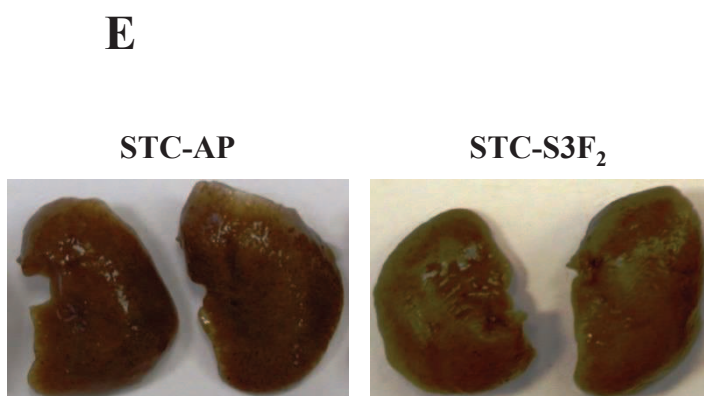
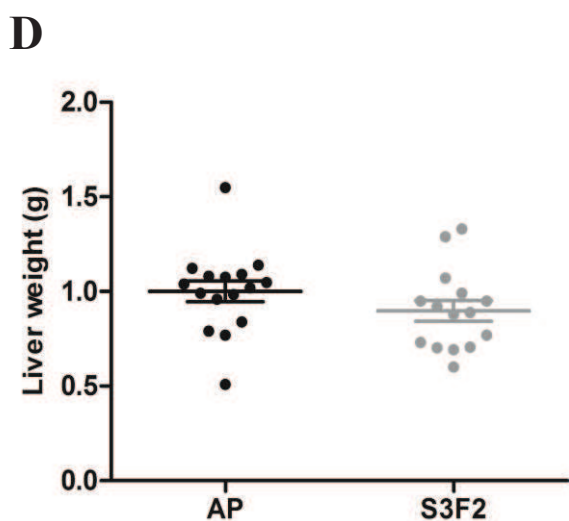
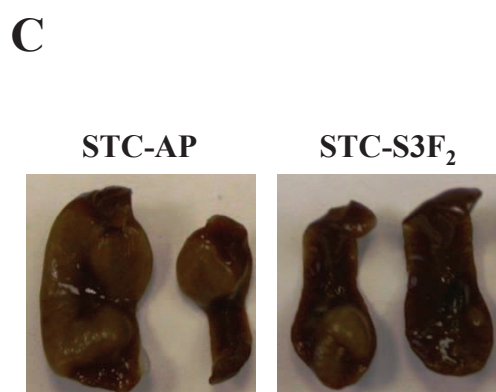
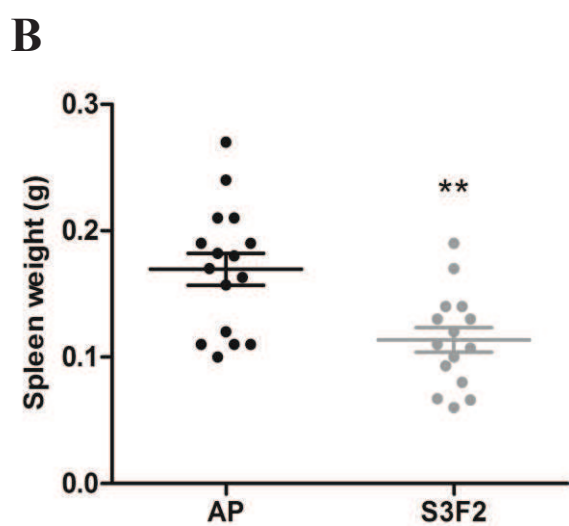
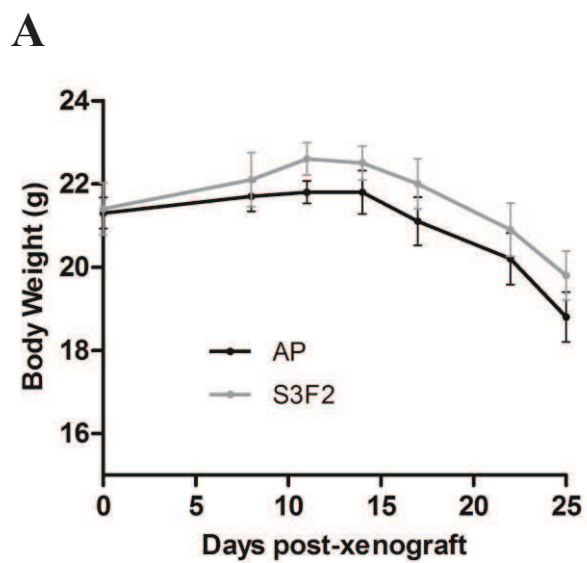
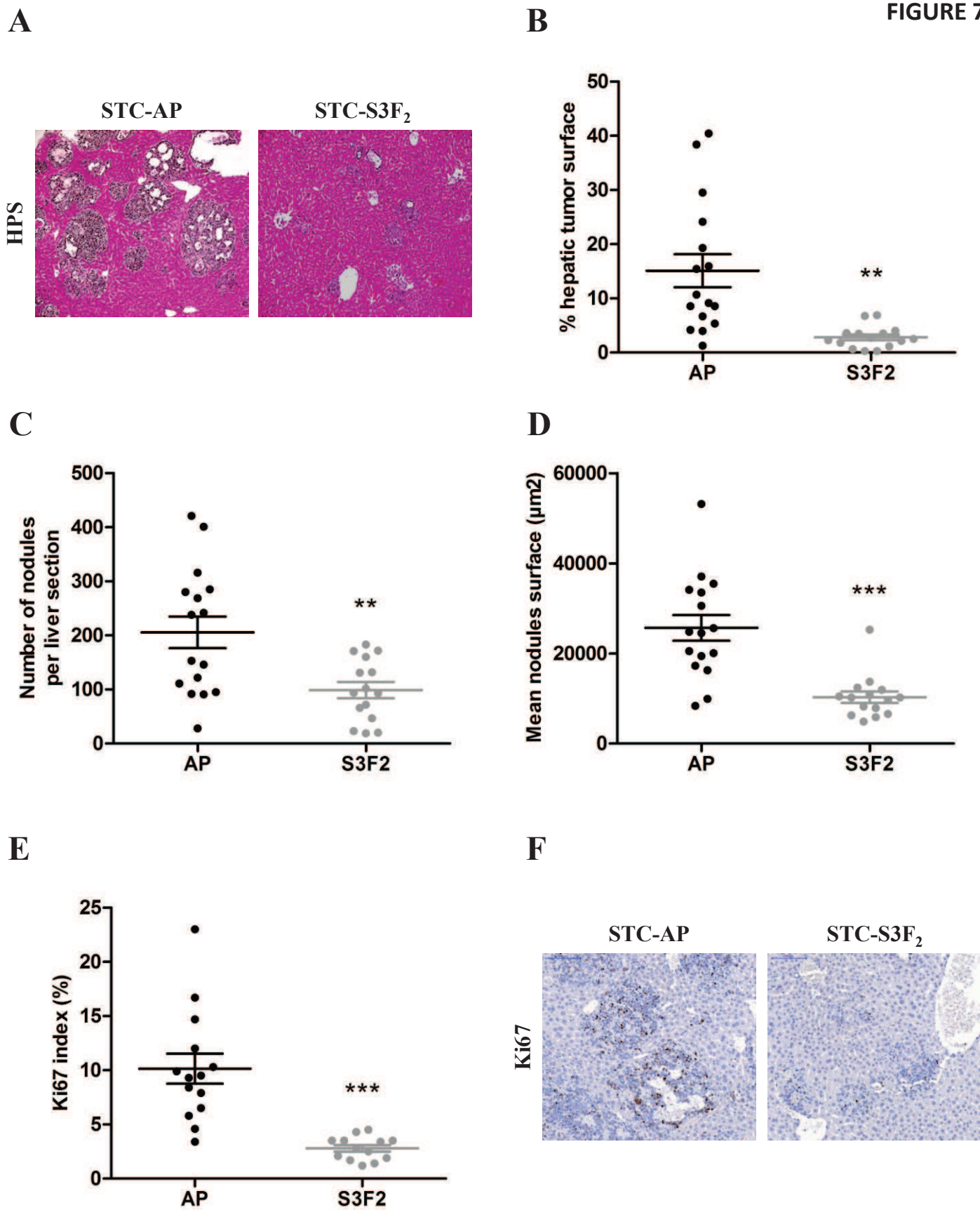
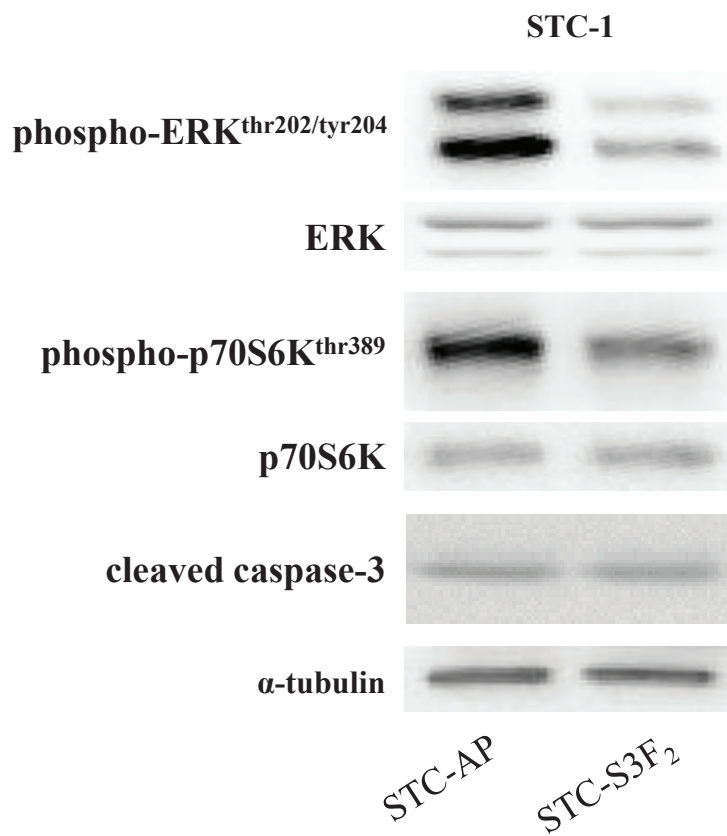


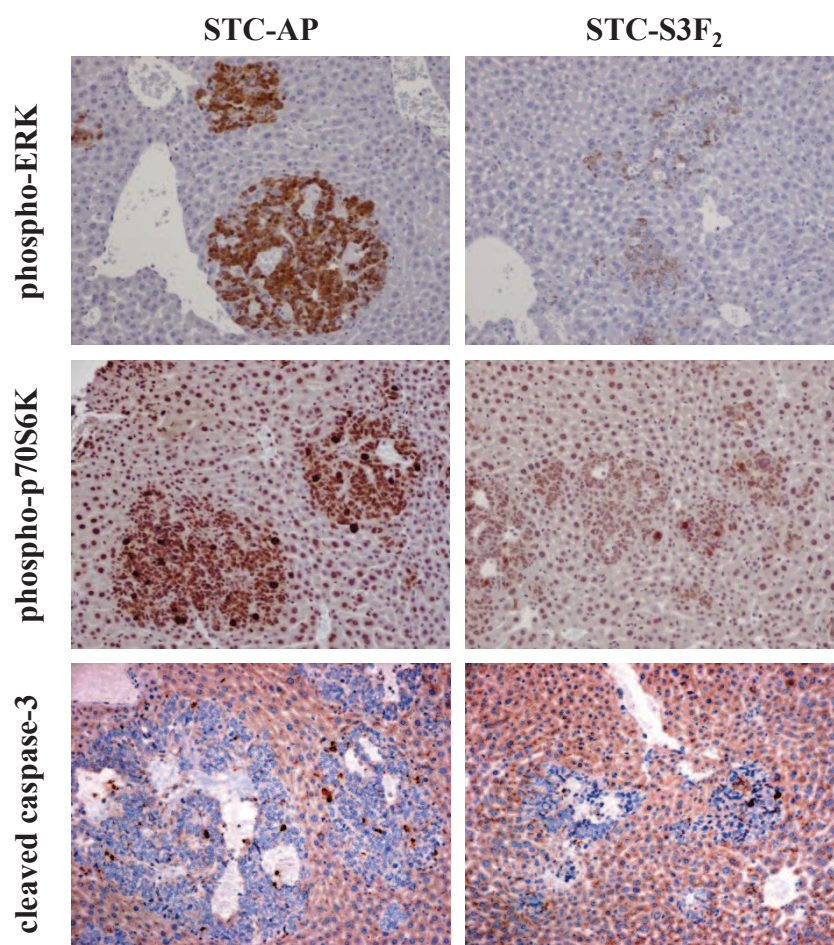
FIGURE 7



A



B



## **Discussion générale et perspectives**

## Les thérapies ciblées pour les carcinomes neuroendocrines gastroentéropancréatiques

La dernière décennie a vu l'essor considérable des thérapies ciblées. Les TNE-GEPs ont largement profité des progrès en la matière, notamment avec la multiplication des essais cliniques de nombreux agents de thérapie ciblée (Oberg, 2012). L'évaluation clinique de ces agents a été faite majoritairement sur TNE-GEPs d'origine pancréatique : c'est notamment le cas de l'évérolimus et du sunitinib qui améliorent significativement la survie sans progression chez les patients (Raymond et al., 2011; Yao et al., 2011b). Néanmoins, et de par leur rareté, d'autres sous-groupes de TNE-GEPs n'ont que très peu fait l'objet de telles avancées thérapeutiques. C'est le cas des carcinomes neuroendocrines gastroentéropancréatiques peu différenciés (pdCNE-GEPs). Ce sous-groupe particulier de TNE-GEPs concerne 5 à 10% des TNE-GEPs et regroupe des lésions à fort degré de malignité dont le traitement standard (une chimiothérapie associant cisplatine et étoposide) n'a pas changé depuis les années 1990 (Mitry et al., 1999; Moertel et al., 1991). De plus, et malgré ce traitement, les médianes de survie ne dépassent pas 3 ans.

De façon intéressante, deux cas cliniques rapportent des réponses de patients atteints de pdCNE-GEPs à certains agents de thérapies ciblées (Lin et al., 2013b; Lindholm et al., 2012), suggérant ainsi que certaines de ces thérapies pourraient être utilisées en seconde ligne après le traitement standard, voire en complément.

C'est dans ce contexte que notre groupe a évalué l'efficacité de l'évérolimus, inhibiteur de la kinase mTOR, dans une étude préclinique utilisant des modèles cellulaires de carcinomes neuroendocrines peu différenciés digestifs. L'évérolimus a récemment obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour les TNE-GEPs pancréatiques, non résécables ou métastatiques, bien ou moyennement différenciés avec progression de la maladie. Nos données montrent que les pdCNE-GEPs humaines expriment la protéine mTOR, ainsi que ses effecteurs 4EBP1 et p70S6K. L'évérolimus est capable de diminuer l'expression de ces deux effecteurs dans deux modèles cellulaires de pdCNE-GEPs, STC-1 et GluTag. Un modèle de xélogreffe intrasplénique chez la souris nude permet de valider l'utilisation de ces lignées en tant que modèles cellulaires de pdCNE-GEPs. En effet, les nodules intrahépatiques obtenus après dissémination des cellules greffées sont anatomopathologiquement proches des lésions peu différenciées observées chez les patients : ces nodules conservent un phénotype neuroendocrine, avec des cellules présentant un cytoplasme basophile et un rapport nucléocytoplasmique important, ainsi que la présence de zones de nécrose. L'envahissement du foie par les cellules greffées est très réduit après traitement par l'évérolimus. Cette diminution de la charge tumorale du foie est, en partie, corrélée à l'inhibition de la voie mTOR. Notre étude suggère donc que l'inhibition de mTOR pourrait être envisagée pour les patients atteints de carcinomes neuroendocrines peu différenciés.

Néanmoins, la faible incidence des pdCNE-GEPs n'a pas permis, jusqu'à présent, la mise en place d'études cliniques poussées pour préciser les modes d'administration et les séquences thérapeutiques de l'évérolimus ou d'autres agents de thérapie ciblée. Récemment, la Fédération Française de Cancérologie Digestive (FFCD) et le Groupe des Tumeurs Endocrines (GTE) ont mis en place une cohorte nationale regroupant des patients atteints de pdCNE-GEPs. Cette cohorte est actuellement incluse dans un essai clinique de phase II visant à tester le sunitinib. Un essai de phase II testant l'évérolimus devrait débuter en 2014.

De plus, ces tumeurs particulières constituent souvent des urgences thérapeutiques, ne laissant ainsi pas le temps de discuter des possibilités de traitements en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Ces RCPs regroupent un collège de professionnels de santé de différentes disciplines et dont le but est de fournir la meilleure prise en charge du patient, tant en termes diagnostique, thérapeutique ou palliatif. Elles constituent la règle pour la prise de décision en oncologie depuis le plan Cancer 2003-2007, et sont particulièrement pertinentes pour discuter d'un traitement par thérapie ciblée, surtout pour un groupe de tumeurs aussi hétérogène que les TNE-GEPs.

A l'heure actuelle, la chimiothérapie devrait donc rester le traitement de première ligne pour les pdCNE-GEPs même si l'utilisation de l'évérolimus ou de tout autre agent de thérapie ciblée est envisageable dans certains cas. En effet, une première possibilité serait de prescrire l'évérolimus ou autre thérapie ciblée après échec de la chimiothérapie, pour tenter de réduire le volume tumoral d'une tumeur peu sensible à la chimiothérapie. Une autre possibilité serait de prescrire l'inhibiteur de mTOR même en cas de réponse objective au traitement standard. L'effet anti-tumoral de l'évérolimus permettrait ainsi de maintenir voire d'accélérer la réduction du volume tumoral et d'augmenter la survie. Dans ces cas de pdCNE-GEPs où l'urgence thérapeutique est passée, le choix de l'évérolimus ou d'une autre thérapie ciblée s'effectuerait donc au cas par cas, et serait laissé au seul jugement de l'équipe médicale présente à la RCP.

Pour finir, il paraît évident que les thérapies ciblées induiront des mécanismes d'échappement et/ou de résistance chez ces patients atteints de pdCNE-GEPs, comme cela est déjà mis en évidence dans des modèles précliniques de TNE-GEPs ou d'autres types tumoraux (Saini et al., 2013; Svejda et al., 2011). L'inhibition de plusieurs protéines, ou l'inhibition conjointe de deux ou plusieurs voies de signalisation permettrait de contrer les résistances. Néanmoins, les posologies, combinaisons et séquences d'administration des inhibiteurs doivent faire l'objet d'évaluation clinique pour obtenir le meilleur pouvoir thérapeutique tout en limitant les effets indésirables.



## **D'autres cibles thérapeutiques/biomarqueurs pour les TNE-GEPs**

Les mécanismes de tumorigenèse et de progression tumorale des TNE-GEPs ne sont que très peu clairement établis. Pour trouver des nouvelles pistes thérapeutiques et de nouveaux marqueurs, il convient de préciser ces mécanismes.

Un fait marquant concernant les TNE-GEPs est qu'elles sont diagnostiquées à un stade déjà métastatique dans plus 50% des cas. Les efforts des cliniciens se concentrent donc sur le traitement de la maladie métastatique, qui touche principalement le foie. Chez les patients, une tumeur neuroendocrine du tractus digestif est qualifiée d'invasive lorsque les cellules tumorales envahissent la musculature propre. Cette acquisition par la tumeur d'un phénotype invasif et agressif préside au développement métastatique et constitue donc une étape-clé de la progression tumorale. C'est donc les mécanismes moléculaires impliqués dans cette étape d'invasion locale qu'il convient de préciser pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques.

La recherche de nouvelles cibles ne pouvant pas être faite directement chez l'homme, l'utilisation de modèles murins est incontournable. Nous avons utilisé un modèle murin de xénogreffe intracaecale chez la souris nude qui permet de reproduire la progression des tumeurs entéroendocrines, et plus particulièrement l'étape d'invasion locale de la musculature. Ce modèle se déroule en 2 étapes : (1) les cellules STC-1 sont injectées chez une souris immunodéprimée par voie sous-cutanée et forment une tumeur primaire solide puis (2) un fragment de tumeur solide est greffé dans la paroi caecale d'une seconde souris. La progression tumorale qui s'ensuit respecte une cinétique bien précise : jusqu'à deux semaines post-greffe, la tumeur n'envahit pas les tissus adjacents alors qu'elle est invasive et métastatique à huit semaines (Poncet et al., 2009). Une étude protéomique de la tumeur à ces deux stades a été conduite grâce à l'électrophorèse en deux dimensions (2DE) et à la spectrométrie de masse, et a permis de détecter 24 protéines dont l'expression varie au moins d'un facteur 2 entre les stades invasif versus non-invasif. Parmi celles-ci, sept ont été choisies pour validation : cinq dont l'expression était diminuée dans les tumeurs invasives (TCP1 $\epsilon$ , TPM2, CRMP2, vimentine, desmine) et deux dont l'expression était augmentée (14-3-3 $\gamma$ , CK8). Les marquages immunohistochimiques montrent que la vimentine et la desmine sont en réalité exprimées dans le stroma (par les cellules endothéliales, musculaires et fibroblastiques), montrant ainsi que l'hétérogénéité tissulaire au sein de la tumeur constitue une limite à ce type d'étude. De plus, les spots obtenus après migration en 2DE peuvent être constitués de plusieurs protéines, faussant ainsi les variations d'expression observées. Des limites techniques ont été rencontrées, c'est notamment le cas de la sensibilité des techniques immunohistochimiques qui ne permettent pas de confirmer les différences d'expression observées en spectrométrie. Ces limites n'ont pas permis de valider en western-blot les protéines suivantes : vimentine, desmine et CK8. Les quatre protéines candidates

sélectionnées sont donc TCP1 $\epsilon$  (t-complex polypeptide-1  $\epsilon$ ), Tpm2 (tropomyosine 2), 14-3-3 $\gamma$  et CRMP2 (collapsin responsive mediator protein 2). Ces protéines présentent toutes un rôle dans la régulation du cytosquelette et leur implication dans la progression tumorale des TNE-GEPs n'a jamais été démontrée, ce qui n'est pas le cas dans d'autres types tumoraux.

En effet, TCP1 est une protéine chaperonne dont les isoformes sont impliquées dans de nombreuses signalisations, et notamment dans le repliement de l'actine et de la tubuline (Llorca et al., 2001). Les rôles de certaines isoformes de TCP1 dans les tumeurs ont été mis en évidence par quelques études. Dans le cancer colorectal, l'augmentation d'expression des isoformes TCP1 $\beta$  et TCP1 $\epsilon$  pourrait être associée à une faible survie selon une autre étude protéomique datant de 2006 (Coghlin et al., 2006). Une autre étude montre que l'inhibition de TCP1 $\epsilon$  induit un ralentissement du cycle cellulaire via une diminution de la liaison de TCP1 $\epsilon$  à ses deux substrats majeurs, la tubuline et l'actine (Grantham et al., 2006).

Les tropomyosines (Tpm) sont impliquées dans la stabilisation du réseau d'actine (Gunning et al., 2008; Lees et al., 2011). Cette classe de protéine est actuellement une cible thérapeutique. En effet, une étude montre que l'expression de Tpm2 est diminuée lors de l'immortalisation de fibroblastes, alors que Tpm5 est augmentée. Les auteurs ont développé un composé (le TR100) qui perturbe spécifiquement les filaments d'actine stabilisés par Tpm5. Ce composé induit l'apoptose et inhibe la croissance tumorale dans des modèles de mélanomes et de neuroblastomes *in vitro* et *in vivo* (Stehn et al., 2013). Néanmoins, Tpm 2 est surtout décrit pour son rôle dans les myopathies, pas ou peu dans les cancers (Tajsharghi et al., 2012).

14-3-3 est une famille protéique composée de sept isoformes qui interagissent avec de très nombreuses molécules intracellulaires différentes dont des kinases, des phosphatases, des facteurs de transcription et qui possèdent des rôles de régulation de nombreux mécanismes dont le contrôle du cytosquelette d'actine et le cycle cellulaire (Moreira et al., 2008; Tzivion and Avruch, 2002). L'isoforme 14-3-3 $\gamma$  a récemment été identifiée comme un nouveau régulateur de la mitose. L'interaction avec Plk1 (polo-like kinase 1) stimule l'activité de cette kinase, indispensable à la transition métaphase/anaphase (Kasahara et al., 2013).

La dernière protéine candidate est CRMP2 dont les fonctions ont déjà été détaillées dans l'introduction (voir troisième partie, section 3.2.2).

Cette étude protéomique suggère donc très fortement que ce sont les mécanismes de régulation du cytosquelette qui seraient affectés lors de la phase d'invasion locale des tumeurs entéroendocrines. Même si ces conclusions obtenues à partir de ce modèle murin ne sont évidemment pas directement transposables à l'Homme, les variations d'expression de ces protéines ont été confirmées dans une série de TNE-GEPs humaines du tractus digestif. Cette forte suspicion de l'implication du cytosquelette dans la progression des TNE-GEPs semble en accord avec les observations cliniques et

anatomopathologiques. En effet, ces tumeurs particulières peuvent évoluer lentement et silencieusement pendant des années. Par des mécanismes encore inconnus, des modifications d'activité ou d'expression de certaines protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette permettrait aux cellules tumorales d'envahir les tissus adjacents. Le terme d'invasion n'est d'ailleurs pas juste, et il serait plus pertinent de parler d'infiltration. En effet, ces cellules vont infiltrer les tissus environnants en empruntant des trajets parallèles aux fibres nerveuses et musculaires. Contrairement aux adénocarcinomes du pancréas exocrine ou du côlon, les TNE-GEPs ne détruisent pas le tissu adjacent qui garde toute son intégrité tout au long du processus d'infiltration. Ces observations sont confortées par le fait que des protéines de dégradation de la matrice extracellulaire (MMPs par exemple) n'ont pas été mises en évidence par cette étude protéomique. De plus, il convient de noter qu'aucun facteur traditionnellement impliqué dans le phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) n'est retrouvé. Cela est en accord avec les précédentes études concluant sur l'absence de TEM, en tout cas dans sa forme communément décrite actuellement (Galván et al., 2013; Hervieu et al., 2006). Les protéines identifiées précédemment pourraient donc être responsables, via la modulation du cytosquelette, d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) particulière et spécifique aux cellules endocrines. Parmi ces facteurs, CRMP2 semble être une protéine candidate particulièrement intéressante.

En effet, CRMP2 fait partie de la voie de signalisation des sémaphorines, protéines appartenant à la superfamille des facteurs de guidage axonal (FGAs), initialement décrite pour son rôle dans le développement du système nerveux (Schmidt and Strittmatter, 2007). En dépit des nombreuses similarités phénotypiques entre cellules neuroendocrines et nerveuses, ainsi que des quelques éléments suggérant l'implication des FGAs dans les cellules endocrines normales et tumorales, cette famille de protéines n'a que très peu été étudiée dans les TNE-GEPs. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle des sémaphorines de classe 3 (SEMA3) en cancérologie. C'est donc naturellement vers les SEMA3 que nous avons orienté nos recherches.

### **Les sémaphorines de classe 3 : une cible thérapeutique et/ou pronostique pour les TNE-GEPs**

L'établissement d'un profil d'expression des SEMA3 dans l'épithélium intestinal normal et dans des TNE-GEPs humaines a permis de montrer que la SEMA3F était exprimée par les cellules endocrines de l'épithélium intestinal, et que son expression était perdue dans les tumeurs entéroendocrines. Dans deux modèles cellulaires n'exprimant pas la SEMA3F (STC-1 et GluTag), la réexpression stable de ce facteur induit une diminution de la prolifération. Un effet anti-tumoral de la SEMA3F est retrouvé *in vivo* dans le modèle murin de dissémination hépatique. Ce rôle anti-tumoral de la SEMA3F a déjà été démontré dans le cancer colorectal, dans les tumeurs pulmonaires et dans les

mélanomes (Bielenberg et al., 2004; Futamura et al., 2007; Kusy et al., 2005a; Wu et al., 2011). De plus, nos données suggèrent que la SEMA3F pourrait conduire à l'altération de certaines voies de signalisation médiant la prolifération et la survie cellulaire, notamment les voies mTOR et MAPKinase. En plus de ces deux voies, la protéine STAT3 serait aussi négativement régulée dans des cellules tumorales pulmonaires (Potiron et al., 2007). Les auteurs précisent que l'inhibition de ces voies de signalisation induit une diminution de la transcription du VEGF. En accord avec ces résultats, des données préliminaires du laboratoire montrent une baisse de la sécrétion du VEGF dans les clones surexprimant la SEMA3F. Les TNE-GEPs perdraient donc l'expression de la SEMA3F au profit d'une augmentation de la sécrétion de VEGF, ce qui serait en accord avec le caractère hypervasculaire de ces lésions.

La perte de la SEMA3F dans les tumeurs pulmonaires peut être la conséquence de la délétion de la région 3p21.3, fréquemment retrouvée dans les tumeurs pulmonaires et dans les carcinomes utérins, ou être le résultat de la méthylation du promoteur de ce facteur (Kusy et al., 2005b; Senchenko et al., 2003; Xiang et al., 1996). La rareté des TNE-GEPs n'a pas permis de rechercher d'éventuelles délétions chromosomiques dans les TNE-GEPs. Néanmoins, nous avons utilisé le matériel tumoral à notre disposition pour étudier la méthylation du promoteur de la SEMA3F dans quelques cas de tumeurs entéroendocrines. Nos résultats montrent, par MSP (methylation specific PCR), que le promoteur du gène de la SEMA3F est méthylé, et que cette méthylation est corrélée à une absence de la SEMA3F en immunohistochimie.

Malgré le rôle anti-tumoral bien établi de la SEMA3F, très peu d'études ont fait le lien avec son récepteur NRP-2, ni avec la ou les signalisation(s) sous-jacente(s) qui serai(ent)t responsable(s) de la diminution de l'agressivité tumorale. En effet, la majorité des études sur le sujet concernent seulement soit le ligand, soit le récepteur, qui sont étudiés tous deux de façon indépendante l'un de l'autre, alors que la signalisation induite par l'axe SEMA3/NRPs/CRMP semble être fonctionnelle dans des cellules non nerveuses (Deo et al., 2004).

De façon surprenante, des données non publiées du laboratoire montrent clairement que l'expression protéique de NRP-2 est diminuée dans les clones cellulaires exprimant la SEMA3F. Certains travaux rapportent d'ailleurs que NRP-1 et NRP-2 peuvent être internalisées dans les cellules endothéliales lorsqu'elles sont stimulées par leur ligand (SEMA3A ou VEGF) (Kärpänen et al., 2006; Vander Kooi et al., 2007). Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pourquoi l'expression de NRP-2 est réduite dans nos clones exprimant la SEMA3F, notamment en étudiant les mécanismes de régulations transcriptionnelles et/ou traductionnelles de ce récepteur. De plus, le rôle de NRP-2 dans la progression tumorale a fait l'objet de nombreux travaux (Grandclement and Borg, 2011; Jubb et al., 2012; Nasarre et al., 2013). En plus des plexines, ce récepteur peut interagir avec certains récepteurs dont les RTKs VEGFR-2 et -3, Met, TGF $\beta$ -RII et II et certaines intégrines

(Favier et al., 2006; Prud'homme and Glinka, 2012; Sulpice et al., 2008; Xu et al., 2010). Le rôle des neuropilines n'est donc pas limité à la transduction du signal médié par le VEGF et les sémaphorines. Le ciblage pharmacologique des neuropilines constitue donc une approche thérapeutique prometteuse. En effet, le blocage de NRP-2 par un anticorps spécifique empêche la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF-C (Caunt et al., 2008). Des approches par siRNA montrent que l'inhibition de NRP-2 diminue le développement tumoral chez des souris greffées avec des cellules tumorales colorectales. De façon intéressante, le traitement de ces mêmes souris avec des liposomes contenant un siARN dirigé contre NRP-2 permet aussi de diminuer le développement tumoral (Gray et al., 2008). Des approches utilisant des formes solubles des neuropilines permettent l'inhibition de la progression tumorale. Par exemple, Geretti *et al* ont développé un mutant soluble du domaine b1/b2 présentant une affinité huit fois plus importante pour le VEGF que le domaine sauvage. Injectée chez la souris, cette forme soluble diminue la croissance tumorale dans un modèle de greffe de cellules de mélanome (Geretti et al., 2010).

L'un des effecteurs de la voie des sémaphorines est la protéine CRMP. La stimulation d'une cellule nerveuse par la SEMA3A induit la phosphorylation des protéines CRMPs, diminuant ainsi l'affinité de ces protéines pour la tubuline (Brot et al., 2010; Fukata et al., 2002). Néanmoins, rien n'indique, à l'heure actuelle, que la stimulation par la SEMA3F aboutit aussi à la phosphorylation d'une protéine CRMP.

Malgré tout, la mise en évidence de CRMP2 par l'étude protéomique souligne l'importance de la voie des sémaphorines dans la progression des tumeurs entéroendocrines. Il est important de noter que la modulation de l'activité de CRMP2 se fait par phosphorylation sur différents résidus (Yamashita and Goshima, 2012). Par exemple, la phosphorylation de CRMP2 sur un résidu particulier permet la modulation de la migration lymphocytaire (Varrin-Doyer et al., 2009). Une étude plus récente montre qu'une forme phosphorylée de CRMP2 est associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints de tumeurs pulmonaires non à petites cellules, et que l'inhibition de la forme totale de cette protéine conduit à l'apoptose, sans toutefois discuter des mécanismes moléculaires sous-jacents (Oliemuller et al., 2012). Il est donc nécessaire de préciser les mécanismes signalétiques impliqués dans la régulation de CRMP2, et leur importance dans la modulation du cytosquelette et donc de la migration cellulaire.

L'ensemble de ce travail démontre qu'une meilleure connaissance des mécanismes de progression des TNE GEPs conduira à optimiser l'utilisation de thérapies ciblées déjà existantes et à identifier de nouvelles cibles potentielles. Notre étude suggère pour la première fois dans les TNE GEPs l'importance de la sémaphorine 3F au cours de leur progression. Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique, il reste nécessaire de déterminer les différents acteurs de la voie de signalisation de

cette protéine. En effet, induire la ré-expression de la SEMA3F dans les TNE-GEPs humaines, ne paraît pas actuellement pas envisageable. En revanche son récepteur NRP-2 constitue une cible thérapeutique de choix, comme le sont d'autres récepteurs (récepteurs au VEGF par exemple), et comme pourraient l'être certains effecteurs de la voie de signalisation tels que les protéines CRMPs, lorsque leur implication aura été clairement établie.

## Références bibliographiques

- Abello, J., Ye, F., Bosshard, A., Bernard, C., Cuber, J.C., and Chayvialle, J.A. (1994). Stimulation of glucagon-like peptide-1 secretion by muscarinic agonist in a murine intestinal endocrine cell line. *Endocrinology* *134*, 2011–2017.
- Adachi, T., Wienands, J., Wakabayashi, C., Yakura, H., Reth, M., and Tsubata, T. (2001). SHP-1 requires inhibitory co-receptors to down-modulate B cell antigen receptor-mediated phosphorylation of cellular substrates. *J. Biol. Chem.* *276*, 26648–26655.
- Adams, R.H., and Eichmann, A. (2010). Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001875.
- Agarwal, S.K., Lee Burns, A., Sukhodolets, K.E., Kennedy, P.A., Obungu, V.H., Hickman, A.B., Mullendore, M.E., Whitten, I., Skarulis, M.C., Simonds, W.F., et al. (2004). Molecular pathology of the MEN1 gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 189–198.
- Alexakis, N., and Neoptolemos, J.P. (2008). Pancreatic neuroendocrine tumours. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *22*, 183–205.
- Alexandraki, K.I., and Kaltsas, G. (2012). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: new insights in the diagnosis and therapy. *Endocrine* *41*, 40–52.
- Amiranoff, B., Lorinet, A.M., and Laburthe, M. (1990). Galanin inhibits somatostatin release by the rat islet cell tumor in culture, Rin-m. *Eur. J. Pharmacol.* *191*, 401–405.
- Angeloni, D., Danilkovitch-Miagkova, A., Miagkov, A., Leonard, E.J., and Lerman, M.I. (2004). The soluble sema domain of the RON receptor inhibits macrophage-stimulating protein-induced receptor activation. *J. Biol. Chem.* *279*, 3726–3732.
- Anthony, L.B., Woltering, E.A., Espenan, G.D., Cronin, M.D., Maloney, T.J., and McCarthy, K.E. (2002). Indium-111-pentetreotide prolongs survival in gastroenteropancreatic malignancies. *Semin. Nucl. Med.* *32*, 123–132.
- Appleton, B.A., Wu, P., Maloney, J., Yin, J., Liang, W.-C., Stawicki, S., Mortara, K., Bowman, K.K., Elliott, J.M., Desmarais, W., et al. (2007). Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding. *EMBO J.* *26*, 4902–4912.
- Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., et al. (2005). Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9973–9984.
- Arimura, N., Hattori, A., Kimura, T., Nakamuta, S., Funahashi, Y., Hirotsune, S., Furuta, K., Urano, T., Toyoshima, Y.Y., and Kaibuchi, K. (2009). CRMP-2 directly binds to cytoplasmic dynein and interferes with its activity. *J. Neurochem.* *111*, 380–390.
- Arteaga, C.L. (2006). EGF receptor mutations in lung cancer: from humans to mice and maybe back to humans. *Cancer Cell* *9*, 421–423.
- Artenstein, A.W., and Opal, S.M. (2011). Proprotein convertases in health and disease. *N. Engl. J. Med.* *365*, 2507–2518.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Li, G., Halban, P.A., and Wollheim, C.B. (1992). Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines. *Endocrinology* *130*, 167–178.



- Aurandt, J., Vikis, H.G., Gutkind, J.S., Ahn, N., and Guan, K.-L. (2002). The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 12085–12090.
- Avruch, J., Long, X., Lin, Y., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., Oshiro, N., and Kikkawa, U. (2009). Activation of mTORC1 in two steps: Rheb-GTP activation of catalytic function and increased binding of substrates to raptor. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 223–226.
- Back, W., Rohr, G., and Bleyl, U. (2003). Expression of TGF- $\alpha$  in neuroendocrine tumours of the distal colon and rectum. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *111*, 931–939.
- Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S.T., Dufay, N., Lohrum, M., Puschel, A.W., Belin, M.F., Bolz, J., and Thomasset, N. (2001). Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3332–3341.
- Balogh, K., Patócs, A., Hunyady, L., and Rácz, K. (2010). Menin dynamics and functional insight: take your partners. *Mol. Cell. Endocrinol.* *326*, 80–84.
- Banck, M.S., Kanwar, R., Kulkarni, A.A., Boora, G.K., Metge, F., Kipp, B.R., Zhang, L., Thorland, E.C., Minn, K.T., Tentu, R., et al. (2013). The genomic landscape of small intestine neuroendocrine tumors. *J. Clin. Invest.* *123*, 2502–2508.
- Baroni, M.G., Cavallo, M.G., Mark, M., Monetini, L., Stoehrer, B., and Pozzilli, P. (1999). Beta-cell gene expression and functional characterisation of the human insulinoma cell line CM. *J. Endocrinol.* *161*, 59–68.
- Bartsch, D., Hahn, S.A., Danichevski, K.D., Ramaswamy, A., Bastian, D., Galehdari, H., Barth, P., Schmiegel, W., Simon, B., and Rothmund, M. (1999). Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. *Oncogene* *18*, 2367–2371.
- Basile, J.R., Barac, A., Zhu, T., Guan, K.-L., and Gutkind, J.S. (2004). Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B. *Cancer Res.* *64*, 5212–5224.
- Basile, J.R., Afkhami, T., and Gutkind, J.S. (2005). Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6889–6898.
- Basilico, C., Arnesano, A., Galluzzo, M., Comoglio, P.M., and Michieli, P. (2008). A high affinity hepatocyte growth factor-binding site in the immunoglobulin-like region of Met. *J. Biol. Chem.* *283*, 21267–21277.
- Bassi, D.E., Fu, J., Lopez de Cicco, R., and Klein-Szanto, A.J.P. (2005). Proprotein convertases: “master switches” in the regulation of tumor growth and progression. *Mol. Carcinog.* *44*, 151–161.
- Baudin, E. (2007). Gastroenteropancreatic endocrine tumors: clinical characterization before therapy. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* *3*, 228–239.
- Bauer, W., Briner, U., Doepfner, W., Haller, R., Huguenin, R., Marbach, P., Petcher, T.J., and Pless (1982). SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* *31*, 1133–1140.

- Bazzi, W., Renon, M., Vercherat, C., Hamze, Z., Lacheretz-Bernigaud, A., Wang, H., Blanc, M., Roche, C., Calender, A., Chayvialle, J.-A., et al. (2008). MEN1 missense mutations impair sensitization to apoptosis induced by wild-type menin in endocrine pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* *135*, 1698–1709.e2.
- Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* *66*, 205–219.
- Benito, R., Gil-Benso, R., Quilis, V., Perez, M., Gregori-Romero, M., Roldan, P., Gonzalez-Darder, J., Cerdá-Nicolas, M., and Lopez-Gines, C. (2010). Primary glioblastomas with and without EGFR amplification: relationship to genetic alterations and clinicopathological features. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *30*, 392–400.
- Bergsma, H., van Vliet, E.I., Teunissen, J.J.M., Kam, B.L.R., de Herder, W.W., Peeters, R.P., Krenning, E.P., and Kwekkeboom, D.J. (2012). Peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) for GEP-NETs. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *26*, 867–881.
- Bertolino, P., Tong, W.-M., Galendo, D., Wang, Z.-Q., and Zhang, C.-X. (2003a). Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 1880–1892.
- Bertolino, P., Tong, W.-M., Herrera, P.L., Casse, H., Zhang, C.X., and Wang, Z.-Q. (2003b). Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res.* *63*, 4836–4841.
- Bielenberg, D.R., Hida, Y., Shimizu, A., Kaipainen, A., Kreuter, M., Kim, C.C., and Klagsbrun, M. (2004). Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J. Clin. Invest.* *114*, 1260–1271.
- Biondi, C.A., Gartside, M.G., Waring, P., Loffler, K.A., Stark, M.S., Magnuson, M.A., Kay, G.F., and Hayward, N.K. (2004). Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 3125–3131.
- Blommaart, E.F., Luiken, J.J., Blommaart, P.J., van Woerkom, G.M., and Meijer, A.J. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* *270*, 2320–2326.
- Bollard, J., Couderc, C., Blanc, M., Poncet, G., Lepinasse, F., Hervieu, V., Gouysse, G., Ferraro-Peyret, C., Benslama, N., Walter, T., et al. (2013). Antitumor Effect of Everolimus in Preclinical Models of High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Carcinomas. *Neuroendocrinology* *331–340*.
- Bork, P., Doerks, T., Springer, T.A., and Snel, B. (1999). Domains in plexins: links to integrins and transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* *24*, 261–263.
- Borson-Chazot, F. (2006). [Metabolic radiotherapy for gastroenteropancreatic endocrine tumors using radiolabeled somatostatin]. *Ann. Endocrinol.* *67*, 198–204.
- Brambilla, E., Constantin, B., Drabkin, H., and Roche, J. (2000). Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am. J. Pathol.* *156*, 939–950.

- Brantley, D.M., Cheng, N., Thompson, E.J., Lin, Q., Brekken, R.A., Thorpe, P.E., Muraoka, R.S., Cerretti, D.P., Pozzi, A., Jackson, D., et al. (2002). Soluble Eph A receptors inhibit tumor angiogenesis and progression in vivo. *Oncogene* *21*, 7011–7026.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., and Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* *179*, 77–79.
- Brient, C., Regenet, N., Sulpice, L., Brunaud, L., Mucci-Hennekine, S., Carrère, N., Milin, J., Ayav, A., Pradere, B., Hamy, A., et al. (2012). Risk factors for postoperative pancreatic fistulization subsequent to enucleation. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* *16*, 1883–1887.
- Brot, S., Rogemond, V., Perrot, V., Chounlamountri, N., Auger, C., Honnorat, J., and Moradi-Améli, M. (2010). CRMP5 interacts with tubulin to inhibit neurite outgrowth, thereby modulating the function of CRMP2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 10639–10654.
- Brown, E.J., Albers, M.W., Shin, T.B., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., and Schreiber, S.L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* *369*, 756–758.
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R.Z., Leung, T., Lim, L., and Hall, C. (2004). Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8994–9004.
- Brubaker, P.L., Schloos, J., and Drucker, D.J. (1998). Regulation of glucagon-like peptide-1 synthesis and secretion in the GLUTag enteroendocrine cell line. *Endocrinology* *139*, 4108–4114.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* *18*, 2893–2904.
- De Bruïne, A.P., Dinjens, W.N., Pijls, M.M., vd Linden, E.P., Rousch, M.J., Moerkerk, P.T., de Goeij, A.F., and Bosman, F.T. (1992). NCI-H716 cells as a model for endocrine differentiation in colorectal cancer. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* *62*, 311–320.
- De Bruïne, A.P., Dinjens, W.N., van der Linden, E.P., Pijls, M.M., Moerkerk, P.T., and Bosman, F.T. (1993). Extracellular matrix components induce endocrine differentiation in vitro in NCI-H716 cells. *Am. J. Pathol.* *142*, 773–782.
- Brunaud, L., Bresler, L., Ayav, A., Muresan, M., Klein, M., Weryha, G., and Boissel, P. (2004). [Endocrine tumors of the gastro-intestinal tract (Carcinoid tumors)]. *Ann. Chir.* *129*, 563–570.
- Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Moreschi, I., Nano, R., Antonioli, B., Fruscione, F., Magnone, M., Scarfi, S., et al. (2008). Abscisic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. *J. Biol. Chem.* *283*, 32188–32197.
- Buel, G.R., Rush, J., and Ballif, B.A. (2010). Fyn promotes phosphorylation of collapsin response mediator protein 1 at tyrosine 504, a novel, isoform-specific regulatory site. *J. Cell. Biochem.* *111*, 20–28.

Van Buren, G., 2nd, Rashid, A., Yang, A.D., Abdalla, E.K., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Fan, F., Camp, E.R., Yao, J.C., et al. (2007). The development and characterization of a human midgut carcinoid cell line. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 4704–4712.

Cafferkey, R., Young, P.R., McLaughlin, M.M., Bergsma, D.J., Koltin, Y., Sathe, G.M., Faucette, L., Eng, W.K., Johnson, R.K., and Livi, G.P. (1993). Dominant missense mutations in a novel yeast protein related to mammalian phosphatidylinositol 3-kinase and VPS34 abrogate rapamycin cytotoxicity. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 6012–6023.

Cai, H., and Reed, R.R. (1999). Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 6519–6527.

Calender, A. (2000). Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Digestion* *62 Suppl 1*, 3–18.

Caron, P., Morange-Ramos, I., Cogne, M., and Jaquet, P. (1997). Three year follow-up of acromegalic patients treated with intramuscular slow-release lanreotide. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *82*, 18–22.

Carrière, A., Cargnello, M., Julien, L.-A., Gao, H., Bonneil, E., Thibault, P., and Roux, P.P. (2008). Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr. Biol. CB* *18*, 1269–1277.

Casazza, A., Finisguerra, V., Capparuccia, L., Camperi, A., Swiercz, J.M., Rizzolio, S., Rolny, C., Christensen, C., Bertotti, A., Sarotto, I., et al. (2010). Sema3E-Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 2684–2698.

Casazza, A., Fu, X., Johansson, I., Capparuccia, L., Andersson, F., Giustacchini, A., Squadrito, M.L., Venneri, M.A., Mazzone, M., Larsson, E., et al. (2011). Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 741–749.

Casazza, A., Kigel, B., Maione, F., Capparuccia, L., Kessler, O., Giraudo, E., Mazzone, M., Neufeld, G., and Tamagnone, L. (2012). Tumour growth inhibition and anti-metastatic activity of a mutated furin-resistant Semaphorin 3E isoform. *EMBO Mol. Med.* *4*, 234–250.

Catalano, A., Caprari, P., Rodilossi, S., Betta, P., Castellucci, M., Casazza, A., Tamagnone, L., and Procopio, A. (2004). Cross-talk between vascular endothelial growth factor and semaphorin-3A pathway in the regulation of normal and malignant mesothelial cell proliferation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 358–360.

Catalano, A., Lazzarini, R., Di Nuzzo, S., Orciari, S., and Procopio, A. (2009). The plexin-A1 receptor activates vascular endothelial growth factor-receptor 2 and nuclear factor-kappaB to mediate survival and anchorage-independent growth of malignant mesothelioma cells. *Cancer Res.* *69*, 1485–1493.

Catena, L., Bajetta, E., Milione, M., Ducceschi, M., Valente, M., Dominoni, F., and Colonna, V. (2011). Mammalian target of rapamycin expression in poorly differentiated endocrine carcinoma: clinical and therapeutic future challenges. *Target. Oncol.* *6*, 65–68.

Caton, P.W., Richardson, S.J., Kieswich, J., Bugliani, M., Holland, M.L., Marchetti, P., Morgan, N.G., Yaqoob, M.M., Holness, M.J., and Sugden, M.C. (2013). Sirtuin 3 regulates mouse pancreatic beta cell function and is suppressed in pancreatic islets isolated from human type 2 diabetic patients. *Diabetologia* *56*, 1068–1077.

- Caunt, M., Mak, J., Liang, W.-C., Stawicki, S., Pan, Q., Tong, R.K., Kowalski, J., Ho, C., Reslan, H.B., Ross, J., et al. (2008). Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer Cell* *13*, 331–342.
- Chakraborty, G., Kumar, S., Mishra, R., Patil, T.V., and Kundu, G.C. (2012). Semaphorin 3A Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Mice Melanoma Model. *PLoS One* *7*, e33633.
- Chan, J.A., Mayer, R.J., Jackson, N., Malinowski, P., Regan, E., and Kulke, M.H. (2013). Phase I study of sorafenib in combination with everolimus (RAD001) in patients with advanced neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *71*, 1241–1246.
- Charrier, E., Reibel, S., Rogemond, V., Aguera, M., Thomasset, N., and Honnorat, J. (2003). Collapsin response mediator proteins (CRMPs): involvement in nervous system development and adult neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiol.* *28*, 51–64.
- Chaudhry, A., Papanicolaou, V., Oberg, K., Heldin, C.H., and Funa, K. (1992). Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Cancer Res.* *52*, 1006–1012.
- Chédotal, A., Kerjan, G., and Moreau-Fauvarque, C. (2005). The brain within the tumor: new roles for axon guidance molecules in cancers. *Cell Death Differ.* *12*, 1044–1056.
- Chen, J., and Ostenson, C.-G. (2004). Glucagon release is regulated by tyrosine phosphatase and PI3-kinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *325*, 555–560.
- Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* *19*, 547–559.
- Chen, H., He, Z., Bagri, A., and Tessier-Lavigne, M. (1998). Semaphorin-neuropilin interactions underlying sympathetic axon responses to class III semaphorins. *Neuron* *21*, 1283–1290.
- Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chédotal, A., and Tessier-Lavigne, M. (2000). Neuropilin-2 regulates the development of selective cranial and sensory nerves and hippocampal mossy fiber projections. *Neuron* *25*, 43–56.
- Chen, X., Zhao, M., Hao, M., Sun, X., Wang, J., Mao, Y., Zu, L., Liu, J., Shen, Y., Wang, J., et al. (2013). Dual inhibition of PI3K and mTOR mitigates feedback-loop pAkt activation to improve tamoxifen response in breast cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR.*
- Chen, Y., Li, Z.-Y., Yang, Y., and Zhang, H.-J. (2012). Uncoupling protein 2 regulates glucagon-like peptide-1 secretion in L-cells. *World J. Gastroenterol. WJG* *18*, 3451–3457.
- Cheng, N., Brantley, D., Fang, W.B., Liu, H., Fanslow, W., Cerretti, D.P., Bussell, K.N., Reith, A., Jackson, D., and Chen, J. (2003). Inhibition of VEGF-dependent multistage carcinogenesis by soluble EphA receptors. *Neoplasia N. Y. N* *5*, 445–456.
- Chertow, B.S., Driscoll, H.K., Primerano, D.A., Cordle, M.B., and Matthews, K.A. (1996). Retinoic acid receptor transcripts and effects of retinol and retinoic acid on glucagon secretion from rat islets and glucagon-secreting cell lines. *Metabolism.* *45*, 300–305.

Chi, K.N., Gleave, M.E., Fazli, L., Goldenberg, S.L., So, A., Kollmannsberger, C., Murray, N., Tinker, A., and Pollak, M. (2012). A phase II pharmacodynamic study of preoperative figitumumab in patients with localized prostate cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 3407–3413.

Choo, A.Y., Yoon, S.-O., Kim, S.G., Roux, P.P., and Blenis, J. (2008). Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17414–17419.

Chou, W.-C., Hung, Y.-S., Hsu, J.-T., Chen, J.-S., Lu, C.-H., Hwang, T.-L., Rau, K.-M., Yeh, K.-Y., Chen, T.-C., and Sun, C.-F. (2012). Chromogranin A is a reliable biomarker for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an Asian population of patients. *Neuroendocrinology* *95*, 344–350.

Christante, D., Pommier, S., Givi, B., and Pommier, R. (2008). Hepatic artery chemoinfusion with chemoembolization for neuroendocrine cancer with progressive hepatic metastases despite octreotide therapy. *Surgery* *144*, 885–893; discussion 893–894.

Christensen, C., Ambartsumian, N., Gilestro, G., Thomsen, B., Comoglio, P., Tamagnone, L., Guldborg, P., and Lukanidin, E. (2005). Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis. *Cancer Res.* *65*, 6167–6177.

Cioni, J.-M., Telley, L., Saywell, V., Cadilhac, C., Jourdan, C., Huber, A.B., Huang, J.Z., Jahannault-Talignani, C., and Ango, F. (2013). SEMA3A signaling controls layer-specific interneuron branching in the cerebellum. *Curr. Biol. CB* *23*, 850–861.

Clarhaut, J., Gemmill, R.M., Potiron, V.A., Ait-Si-Ali, S., Imbert, J., Drabkin, H.A., and Roche, J. (2009). ZEB-1, a repressor of the semaphorin 3F tumor suppressor gene in lung cancer cells. *Neoplasia N. Y.* *N 11*, 157–166.

Coghlin, C., Carpenter, B., Dundas, S.R., Lawrie, L.C., Telfer, C., and Murray, G.I. (2006). Characterization and over-expression of chaperonin t-complex proteins in colorectal cancer. *J. Pathol.* *210*, 351–357.

Cohen, T., Gluzman-Poltorak, Z., Brodzky, A., Meytal, V., Sabo, E., Misselevich, I., Hassoun, M., Boss, J.H., Resnick, M., Shneyvas, D., et al. (2001). Neuroendocrine cells along the digestive tract express neuropilin-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *284*, 395–403.

Cohen, T., Herzog, Y., Brodzky, A., Greenson, J.K., Eldar, S., Gluzman-Poltorak, Z., Neufeld, G., and Resnick, M.B. (2002). Neuropilin-2 is a novel marker expressed in pancreatic islet cells and endocrine pancreatic tumours. *J. Pathol.* *198*, 77–82.

Couderc, C., Poncet, G., Villaume, K., Blanc, M., Gadot, N., Walter, T., Lepinasse, F., Hervieu, V., Cordier-Bussat, M., Scoazec, J.-Y., et al. (2011). Targeting the PI3K/mTOR pathway in murine endocrine cell lines: in vitro and in vivo effects on tumor cell growth. *Am. J. Pathol.* *178*, 336–344.

Couvelard, A. (2005). [Gastro-intestinal endocrine tumors: morphological and clinicopathological characteristics]. *Ann. Pathol.* *25*, 499–509.

Couvelard, A., Felce-Dachez, M., and Degott, C. (2003). [Histological classification of endocrine tumors of the pancreas]. *Gastroentérologie Clin. Biol.* *27*, S15–19.

Couvelard, A., O’Toole, D., Turley, H., Leek, R., Sauvanet, A., Degott, C., Ruzsiewicz, P., Belghiti, J., Harris, A.L., Gatter, K., et al. (2005). Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in

pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br. J. Cancer* 92, 94–101.

Crabtree, J.S., Scacheri, P.C., Ward, J.M., Garrett-Beal, L., Emmert-Buck, M.R., Edgemon, K.A., Lorang, D., Libutti, S.K., Chandrasekharappa, S.C., Marx, S.J., et al. (2001). A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1118–1123.

Creutzfeldt, W., Bartsch, H.H., Jacobaschke, U., and Stöckmann, F. (1991). Treatment of gastrointestinal endocrine tumours with interferon-alpha and octreotide. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* 30, 529–535.

Damen, R., Haugen, M., Svejda, B., Alaimo, D., Brenna, O., Pfragner, R., Gustafsson, B.I., and Kidd, M. (2013). The stimulatory adenosine receptor ADORA2B regulates serotonin (5-HT) synthesis and release in oxygen-depleted EC cells in inflammatory bowel disease. *PLoS One* 8, e62607.

Dan, H.C., Adli, M., and Baldwin, A.S. (2007). Regulation of mammalian target of rapamycin activity in PTEN-inactive prostate cancer cells by I kappa B kinase alpha. *Cancer Res.* 67, 6263–6269.

Daoudi, M., Hennuyer, N., Borland, M.G., Touche, V., Duhem, C., Gross, B., Caiazzo, R., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Peters, J.M., et al. (2011). PPAR $\beta/\delta$  activation induces enteroendocrine L cell GLP-1 production. *Gastroenterology* 140, 1564–1574.

Day, R., and Salzet, M. (2002). The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinol. Lett.* 23, 447–451.

Delaire, S., Elhabazi, A., Bensussan, A., and Boumsell, L. (1998). CD100 is a leukocyte semaphorin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 54, 1265–1276.

DeLellis, R.A. (2004). *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs (IARC)*.

Deo, R.C., Schmidt, E.F., Elhabazi, A., Togashi, H., Burley, S.K., and Strittmatter, S.M. (2004). Structural bases for CRMP function in plexin-dependent semaphorin3A signaling. *EMBO J.* 23, 9–22.

Dhanabal, M., Wu, F., Alvarez, E., McQueeney, K.D., Jeffers, M., MacDougall, J., Boldog, F.L., Hackett, C., Shenoy, S., Khramtsov, N., et al. (2005). Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis. *Cancer Biol. Ther.* 4, 659–668.

Djukom, C., Porro, L.J., Mrazek, A., Townsend, C.M., Jr, Hellmich, M.R., and Chao, C. (2013). Dual Inhibition of PI3K and mTOR Signaling Pathways Decreases Human Pancreatic Neuroendocrine Tumor Metastatic Progression. *Pancreas*.

Dlugosz, A., Zakikhany, K., Muschiol, S., Hultenby, K., and Lindberg, G. (2011). Infection of human enteroendocrine cells with *Chlamydia trachomatis*: a possible model for pathogenesis in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 23, 928–934.

Dorfman, D.M., Shahsafaei, A., Nadler, L.M., and Freeman, G.J. (1998). The leukocyte semaphorin CD100 is expressed in most T-cell, but few B-cell, non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Pathol.* 153, 255–262.

Drucker, D.J., Jin, T., Asa, S.L., Young, T.A., and Brubaker, P.L. (1994). Activation of proglucagon gene transcription by protein kinase-A in a novel mouse enteroendocrine cell line. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 8, 1646–1655.

Dumortier, J., Ratineau, C., Scoazec, J.Y., Pourreyron, C., Anderson, W., Jacquier, M.F., Blanc, M., Bernard, C., Bellaton, C., Remy, L., et al. (2000). Site-specific epithelial-mesenchymal interactions in digestive neuroendocrine tumors. An experimental in vivo and in vitro study. *Am. J. Pathol.* *156*, 671–683.

Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., et al. (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol. Cell* *39*, 171–183.

Elvin, A., Oberg, K., Lindgren, P.G., Lundkvist, M., Wilander, E., Ericsson, A., and Hemmingsson, A. (1994). Interferon treatment of neuroendocrine tumour xenografts as monitored by MRI. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *33*, 567–571.

Eriksson, B., and Oberg, K. (1999). Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: future outlook. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *10 Suppl 2*, S31–38.

Eriksson, B., Janson, E.T., Bax, N.D., Mignon, M., Morant, R., Opolon, P., Rougier, P., and Oberg, K.E. (1996). The use of new somatostatin analogues, lanreotide and octastatin, in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Digestion* *57 Suppl 1*, 77–80.

Eriksson, B., Oberg, K., and Stridsberg, M. (2000). Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion* *62 Suppl 1*, 33–38.

Evers, B.M., Townsend, C.M., Jr, Upp, J.R., Allen, E., Hurlbut, S.C., Kim, S

W., Rajaraman, S., Singh, P., Reubi, J.C., and Thompson, J.C. (1991). Establishment and characterization of a human carcinoid in nude mice and effect of various agents on tumor growth. *Gastroenterology* *101*, 303–311.

Falk, J., Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., et al. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* *48*, 63–75.

Fantin, A., Schwarz, Q., Davidson, K., Normando, E.M., Denti, L., and Ruhrberg, C. (2011). The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 4185–4191.

Favier, B., Alam, A., Barron, P., Bonnin, J., Laboudie, P., Fons, P., Mandron, M., Herault, J.-P., Neufeld, G., Savi, P., et al. (2006). Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* *108*, 1243–1250.

Fendrich, V., Langer, P., Celik, I., Bartsch, D.K., Zielke, A., Ramaswamy, A., and Rothmund, M. (2006). An aggressive surgical approach leads to long-term survival in patients with pancreatic endocrine tumors. *Ann. Surg.* *244*, 845–851; discussion 852–853.

Fendrich, V., Maschuw, K., Rehm, J., Buchholz, M., Holler, J.P., Slater, E.P., Bartsch, D.K., and Waldmann, J. (2012). Sorafenib inhibits tumor growth and improves survival in a transgenic mouse model of pancreatic islet cell tumors. *ScientificWorldJournal* *2012*, 529151.

Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and



the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* *67*, 3043–3053.

Fiebrich, H.-B., Siemerink, E.J.M., Brouwers, A.H., Links, T.P., Remkes, W.S., Hospers, G.A.P., and de Vries, E.G.E. (2011). Everolimus induces rapid plasma glucose normalization in insulinoma patients by effects on tumor as well as normal tissues. *The Oncologist* *16*, 783–787.

Fjällskog, M.-L., Hessman, O., Eriksson, B., and Janson, E.T. (2007). Upregulated expression of PDGF receptor beta in endocrine pancreatic tumors and metastases compared to normal endocrine pancreas. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *46*, 741–746.

Flock, G., Cao, X., and Drucker, D.J. (2005). Pdx-1 is not sufficient for repression of proglucagon gene transcription in islet or enteroendocrine cells. *Endocrinology* *146*, 441–449.

Flodgren, E., Olde, B., Meidute-Abaraviciene, S., Winzell, M.S., Ahrén, B., and Salehi, A. (2007). GPR40 is expressed in glucagon producing cells and affects glucagon secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *354*, 240–245.

Fraedrich, K., Schrader, J., Ittrich, H., Keller, G., Gontarewicz, A., Matzat, V., Kromminga, A., Pace, A., Moll, J., Bläker, M., et al. (2012). Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *18*, 4621–4632.

Francis, J.M., Kiezun, A., Ramos, A.H., Serra, S., Peadamallu, C.S., Qian, Z.R., Banck, M.S., Kanwar, R., Kulkarni, A.A., Karpathakis, A., et al. (2013). Somatic mutation of CDKN1B in small intestine neuroendocrine tumors. *Nat. Genet.* *45*, 1483–1486.

Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr. Biol. CB* *16*, 1865–1870.

Fukata, Y., Itoh, T.J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., Watanabe, H., Inagaki, N., Iwamatsu, A., Hotani, H., et al. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat. Cell Biol.* *4*, 583–591.

Funakoshi, A., Tateishi, K., Tsuru, M., Jimi, A., Wakasugi, H., Ikeda, Y., and Kono, A. (1990). Pancreastatin producing cell line from human pancreatic islet cell tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *168*, 741–746.

Furukawa, M., Raffeld, M., Mateo, C., Sakamoto, A., Moody, T.W., Ito, T., Venzon, D.J., Serrano, J., and Jensen, R.T. (2005). Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 3233–3242.

Futamura, M., Kamino, H., Miyamoto, Y., Kitamura, N., Nakamura, Y., Ohnishi, S., Masuda, Y., and Arakawa, H. (2007). Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis suppression. *Cancer Res.* *67*, 1451–1460.

Gaboriaud, C., Gregory-Pauron, L., Teillet, F., Thielens, N.M., Bally, I., and Arlaud, G.J. (2011). Structure and properties of the Ca(2+)-binding CUB domain, a widespread ligand-recognition unit involved in major biological functions. *Biochem. J.* *439*, 185–193.

- Gagnon, M.L., Bielenberg, D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 2573–2578.
- Galván, J.A., Astudillo, A., Vallina, A., Fonseca, P.J., Gómez-Izquierdo, L., García-Carbonero, R., and González, M.V. (2013). Epithelial-mesenchymal transition markers in the differential diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* *140*, 61–72.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* *284*, 12297–12305.
- Gaur, P., Sceusi, E.L., Samuel, S., Xia, L., Fan, F., Zhou, Y., Lu, J., Tozzi, F., Lopez-Berestein, G., Vivas-Mejia, P., et al. (2011). Identification of cancer stem cells in human gastrointestinal carcinoid and neuroendocrine tumors. *Gastroenterology* *141*, 1728–1737.
- Gazdar, A.F., Chick, W.L., Oie, H.K., Sims, H.L., King, D.L., Weir, G.C., and Lauris, V. (1980). Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 3519–3523.
- Geretti, E., van Meeteren, L.A., Shimizu, A., Dudley, A.C., Claesson-Welsh, L., and Klagsbrun, M. (2010). A mutated soluble neuropilin-2 B domain antagonizes vascular endothelial growth factor bioactivity and inhibits tumor progression. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 1063–1073.
- Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamlele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G., and Butler, P.J.G. (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 12039–12044.
- Giacobini, P., Messina, A., Morello, F., Ferraris, N., Corso, S., Penachioni, J., Giordano, S., Tamagnone, L., and Fasolo, A. (2008). Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1-Met complex. *J. Cell Biol.* *183*, 555–566.
- Gilbert, J.A., Adhikari, L.J., Lloyd, R.V., Rubin, J., Haluska, P., Carboni, J.M., Gottardis, M.M., and Ames, M.M. (2010). Molecular markers for novel therapies in neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Endocr. Relat. Cancer* *17*, 623–636.
- Gloesenkamp, C., Nitzsche, B., Lim, A.R., Normant, E., Vosburgh, E., Schrader, M., Ocker, M., Scherübl, H., and Höpfner, M. (2012a). Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Int. J. Oncol.* *40*, 1659–1667.
- Gloesenkamp, C.R., Nitzsche, B., Ocker, M., Di Fazio, P., Quint, K., Hoffmann, B., Scherübl, H., and Höpfner, M. (2012b). AKT inhibition by triciribine alone or as combination therapy for growth control of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int. J. Oncol.* *40*, 876–888.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M., and Neufeld, G. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J. Biol. Chem.* *276*, 18688–18694.
- Goel, S., Wong, A.H.-K., and Jain, R.K. (2012). Vascular normalization as a therapeutic strategy for malignant and nonmalignant disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006486.
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., and Strittmatter, S.M. (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* *376*, 509–514.

- Góth, M.I., Hubina, E., Raptis, S., Nagy, G.M., and Tóth, B.E. (2003). Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Microsc. Res. Tech.* 60, 98–106.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., and Guillemot, F. (2000). neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1607–1611.
- Graf, N., McLean, M., Capellino, S., Schölmerich, J., Murray, G.I., El-Omar, E.M., and Straub, R.H. (2012). Loss of sensory and noradrenergic innervation in benign colorectal adenomatous polyps—a putative role of semaphorins 3F and 3A. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 24, 120–128, e83.
- Gagnoli, C. (2008). The CM cell line derived from liver metastasis of malignant human insulinoma is not a valid beta cell model for in vitro studies. *J. Cell. Physiol.* 216, 569–570.
- Grandclement, C., and Borg, C. (2011). Neuropilins: a new target for cancer therapy. *Cancers* 3, 1899–1928.
- Grandclement, C., Pallandre, J.R., Valmary Degano, S., Viel, E., Bouard, A., Balland, J., Rémy-Martin, J.-P., Simon, B., Rouleau, A., Boireau, W., et al. (2011). Neuropilin-2 expression promotes TGF- $\beta$ 1-mediated epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *PLoS One* 6, e20444.
- Grant, S.G., Seidman, I., Hanahan, D., and Bautch, V.L. (1991). Early invasiveness characterizes metastatic carcinoid tumors in transgenic mice. *Cancer Res.* 51, 4917–4923.
- Grantham, J., Brackley, K.I., and Willison, K.R. (2006). Substantial CCT activity is required for cell cycle progression and cytoskeletal organization in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2309–2324.
- Gray, M.J., Van Buren, G., Dallas, N.A., Xia, L., Wang, X., Yang, A.D., Somcio, R.J., Lin, Y.G., Lim, S., Fan, F., et al. (2008). Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 109–120.
- Grozinsky-Glasberg, S., Franchi, G., Teng, M., Leontiou, C.A., Ribeiro de Oliveira, A., Dalino, P., Salahuddin, N., Korbonits, M., and Grossman, A.B. (2008). Octreotide and the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in a neuroendocrine tumour cell line. *Neuroendocrinology* 87, 168–181.
- Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, G.B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2002). Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J. Biol. Chem.* 277, 18069–18076.
- Gunning, P., O'Neill, G., and Hardeman, E. (2008). Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol. Rev.* 88, 1–35.
- Guo, H.-F., Li, X., Parker, M.W., Waltenberger, J., Becker, P.M., and Vander Kooi, C.W. (2013). Mechanistic Basis for the Potent Anti-angiogenic Activity of Semaphorin 3F. *Biochemistry (Mosc.)*.
- Guttmann-Raviv, N., Shraga-Heled, N., Varshavsky, A., Guimaraes-Sternberg, C., Kessler, O., and Neufeld, G. (2007). Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 282, 26294–26305.

- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 30, 214–226.
- Hager, J.H., and Hanahan, D. (1999). Tumor cells utilize multiple pathways to down-modulate apoptosis. Lessons from a mouse model of islet cell carcinogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 887, 150–163.
- Hainsworth, J.D., Spigel, D.R., Litchy, S., and Greco, F.A. (2006). Phase II trial of paclitaxel, carboplatin, and etoposide in advanced poorly differentiated neuroendocrine carcinoma: a Minnie Pearl Cancer Research Network Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24, 3548–3554.
- Hall, K.T., Boumsell, L., Schultze, J.L., Boussiotis, V.A., Dorfman, D.M., Cardoso, A.A., Bensussan, A., Nadler, L.M., and Freeman, G.J. (1996). Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 11780–11785.
- Hamaguchi, K., and Leiter, E.H. (1990). Comparison of cytokine effects on mouse pancreatic alpha-cell and beta-cell lines. Viability, secretory function, and MHC antigen expression. *Diabetes* 39, 415–425.
- Hanahan, D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 315, 115–122.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., et al. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8862–8877.
- Hara, K., Yonezawa, K., Weng, Q.P., Kozlowski, M.T., Belham, C., and Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J. Biol. Chem.* 273, 14484–14494.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177–189.
- Haruta, T., Uno, T., Kawahara, J., Takano, A., Egawa, K., Sharma, P.M., Olefsky, J.M., and Kobayashi, M. (2000). A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 14, 783–794.
- Haugen, M., Dammen, R., Svejda, B., Gustafsson, B.I., Pfragner, R., Modlin, I., and Kidd, M. (2012). Differential signal pathway activation and 5-HT function: the role of gut enterochromaffin cells as oxygen sensors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G1164–1173.
- He, Q., Li, X., Zhang, Z., Zhang, Q., Xu, F., Yang, L., Tao, Y., and Liu, Y. (2010). Overexpression of IGF-IR in malignant clonal cells in bone marrow of myelodysplastic syndromes. *Cancer Invest.* 28, 983–988.
- Hellman, P., Andersson, M., Rastad, J., Juhlin, C., Karacagil, S., Eriksson, B., Skogseid, B., and Akerström, G. (2000). Surgical strategy for large or malignant endocrine pancreatic tumors. *World J. Surg.* 24, 1353–1360.
- Herman, J.G., and Meadows, G.G. (2007). Increased class 3 semaphorin expression modulates the invasive and adhesive properties of prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* 30, 1231–1238.

Hervieu, V., Lepinasse, F., Gouysse, G., Guillaud, O., Barel, C., Chambonniere, M.-L., Bringuier, P.-P., Poncet, G., Lombard-Bohas, C., Partensky, C., et al. (2006). Expression of beta-catenin in gastroenteropancreatic endocrine tumours: a study of 229 cases. *J. Clin. Pathol.* *59*, 1300–1304.

Hinck, L. (2004). The versatile roles of “axon guidance” cues in tissue morphogenesis. *Dev. Cell* *7*, 783–793.

Hiroshima, Y., Nakamura, F., Miyamoto, H., Mori, R., Taniguchi, K., Matsuyama, R., Akiyama, H., Tanaka, K., Ichikawa, Y., Kato, S., et al. (2012). Collapsin Response Mediator Protein 4 Expression is Associated with Liver Metastasis and Poor Survival in Pancreatic Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*

Hoffmann, R.T., Paprottka, P., Jakobs, T.F., Trumm, C.G., and Reiser, M.F. (2011). Arterial therapies of non-colorectal cancer metastases to the liver (from chemoembolization to radioembolization). *Abdom. Imaging* *36*, 671–676.

Hofland, L.J., and Lamberts, S.W. (2001). Somatostatin receptor subtype expression in human tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *12 Suppl 2*, S31–36.

Holmes, S., Downs, A.M., Fosberry, A., Hayes, P.D., Michalovich, D., Murdoch, P., Moores, K., Fox, J., Deen, K., Pettman, G., et al. (2002). Sema7A is a potent monocyte stimulator. *Scand. J. Immunol.* *56*, 270–275.

Höpfner, M., Sutter, A.P., Gerst, B., Zeitz, M., and Scherübl, H. (2003). A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. Targeting the epidermal growth factor receptor by gefitinib (ZD1839). *Br. J. Cancer* *89*, 1766–1775.

Höpfner, M., Sutter, A.P., Huether, A., Ahnert-Hilger, G., and Scherübl, H. (2004). A novel approach in the treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumors: additive antiproliferative effects of interferon-gamma and meta-iodobenzylguanidine. *BMC Cancer* *4*, 23.

Höpfner, M., Baradari, V., Huether, A., Schöfl, C., and Scherübl, H. (2006). The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 135–149.

Höpfner, M., Schuppan, D., and Scherübl, H. (2008). Treatment of gastrointestinal neuroendocrine tumors with inhibitors of growth factor receptors and their signaling pathways: recent advances and future perspectives. *World J. Gastroenterol. WJG* *14*, 2461–2473.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1981–1991.

Huang, H.-Y., Cheng, Y.-Y., Liao, W.-C., Tien, Y.-W., Yang, C.-H.J., Hsu, S.-M., and Huang, P.-H. (2012). SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer. *PLoS One* *7*, e48637.

Hudson, C.C., Liu, M., Chiang, G.G., Otterness, D.M., Loomis, D.C., Kaper, F., Giaccia, A.J., and Abraham, R.T. (2002). Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7004–7014.

Hung, R.-J., and Terman, J.R. (2011). Extracellular inhibitors, repellents, and semaphorin/plexin/MICAL-mediated actin filament disassembly. *Cytoskeleton. Hoboken NJ* *68*, 415–433.

- Ichiki, S., Kuroki, M., Matsunaga, A., Kuroki, M., and Matsuoka, Y. (1986). Production of immunoreactive calcitonin and some other tumor markers by established human carcinoma cell lines. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 77, 270–275.
- Iguchi, H., Hayashi, I., and Kono, A. (1990). A somatostatin-secreting cell line established from a human pancreatic islet cell carcinoma (somatostatinoma): release experiment and immunohistochemical study. *Cancer Res.* 50, 3691–3693.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., et al. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126, 955–968.
- Ishihara, H., Asano, T., Tsukuda, K., Katagiri, H., Inukai, K., Anai, M., Kikuchi, M., Yazaki, Y., Miyazaki, J.I., and Oka, Y. (1993). Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36, 1139–1145.
- Isla, A., Arbuckle, J.D., Kekis, P.B., Lim, A., Jackson, J.E., Todd, J.F., and Lynn, J. (2009). Laparoscopic management of insulinomas. *Br. J. Surg.* 96, 185–190.
- Ito, T., Igarashi, H., and Jensen, R.T. (2012). Pancreatic neuroendocrine tumors: clinical features, diagnosis and medical treatment: advances. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 26, 737–753.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.* 6, 1122–1128.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125–137.
- Jann, H., Roll, S., Couvelard, A., Hentic, O., Pavel, M., Müller-Nordhorn, J., Koch, M., Röcken, C., Rindi, G., Ruzsniowski, P., et al. (2011). Neuroendocrine tumors of midgut and hindgut origin: tumor-node-metastasis classification determines clinical outcome. *Cancer* 117, 3332–3341.
- Janson, E.T., and Oberg, K. (2003). Neuroendocrine tumors--somatostatin receptor expression and somatostatin analog treatment. *Cancer Chemother. Biol. Response Modif.* 21, 535–546.
- Janssen, B.J.C., Malinauskas, T., Weir, G.A., Cader, M.Z., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2012). Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1293–1299.
- Jensen, R.T., Niederle, B., Mitry, E., Ramage, J.K., Steinmuller, T., Lewington, V., Scarpa, A., Sundin, A., Perren, A., Gross, D., et al. (2006). Gastrinoma (duodenal and pancreatic). *Neuroendocrinology* 84, 173–182.
- Jessop, N., and Hay, R. (1980). Characteristics of two rat pancreatic exocrine cell lines derived from transplantable tumors. *In Vitro* 212.

Jiao, Y., Shi, C., Edil, B.H., de Wilde, R.F., Klimstra, D.S., Maitra, A., Schulick, R.D., Tang, L.H., Wolfgang, C.L., Choti, M.A., et al. (2011). DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 331, 1199–1203.

Johannessen, C.M., Reczek, E.E., James, M.F., Brems, H., Legius, E., and Cichowski, K. (2005). The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8573–8578.

Joseph, D., Ho, S.-M., and Syed, V. (2010). Hormonal regulation and distinct functions of semaphorin-3B and semaphorin-3F in ovarian cancer. *Mol. Cancer Ther.* 9, 499–509.

Jubb, A.M., Sa, S.M., Ratti, N., Strickland, L.A., Schmidt, M., Callahan, C.A., and Koeppen, H. (2012). Neuropilin-2 expression in cancer. *Histopathology* 61, 340–349.

Juergens, H., Daw, N.C., Geoerger, B., Ferrari, S., Villarroel, M., Aerts, I., Whelan, J., Dirksen, U., Hixon, M.L., Yin, D., et al. (2011). Preliminary efficacy of the anti-insulin-like growth factor type 1 receptor antibody figitumumab in patients with refractory Ewing sarcoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 4534–4540.

Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1287–1295.

Kaelin, W.G., Jr (2002). Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat. Rev. Cancer* 2, 673–682.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, 15–25.

Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S.-I., Natsume, T., and Mizushima, N. (2010). Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J. Biol. Chem.* 285, 20109–20116.

Kaku, M., Nishiyama, T., Yagawa, K., and Abe, M. (1980). Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gann Gan* 71, 596–601.

Kaltsas, G., Mukherjee, J.J., Plowman, P.N., and Grossman, A.B. (2001). The role of chemotherapy in the nonsurgical management of malignant neuroendocrine tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 55, 575–587.

Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507–1513.

Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol. Cell Biol.* 25, 7239–7248.

Kantidakis, T., Ramsbottom, B.A., Birch, J.L., Dowding, S.N., and White, R.J. (2010). mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11823–11828.

Kärpänen, T., Heckman, C.A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., and Alitalo, K. (2006). Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1462–1472.

- Kasahara, K., Goto, H., Izawa, I., Kiyono, T., Watanabe, N., Elowe, S., Nigg, E.A., and Inagaki, M. (2013). PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3 $\gamma$  and is required for metaphase-anaphase transition. *Nat. Commun.* **4**, 1882.
- Kasajima, A., Pavel, M., Darb-Esfahani, S., Noske, A., Stenzinger, A., Sasano, H., Dietel, M., Denkert, C., Röcken, C., Wiedenmann, B., et al. (2011). mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, 181–192.
- Kato, S., Kubota, K., Shimamura, T., Shinohara, Y., Kobayashi, N., Watanabe, S., Yoneda, M., Inamori, M., Nakamura, F., Ishiguro, H., et al. (2011). Semaphorin 4D, a lymphocyte semaphorin, enhances tumor cell motility through binding its receptor, plexinB1, in pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **102**, 2029–2037.
- Katoh, M. (2002). GIPC gene family (Review). *Int. J. Mol. Med.* **9**, 585–589.
- Kawano, Y., Yoshimura, T., Tsuboi, D., Kawabata, S., Kaneko-Kawano, T., Shirataki, H., Takenawa, T., and Kaibuchi, K. (2005). CRMP-2 is involved in kinesin-1-dependent transport of the Sra-1/WAVE1 complex and axon formation. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9920–9935.
- Kayani, I., Bomanji, J.B., Groves, A., Conway, G., Gacinovic, S., Win, T., Dickson, J., Caplin, M., and Ell, P.J. (2008). Functional imaging of neuroendocrine tumors with combined PET/CT using 68Ga-DOTATATE (DOTA-DPhe1,Tyr3-octreotate) and 18F-FDG. *Cancer* **112**, 2447–2455.
- Kidd, M., Eick, G.N., Modlin, I.M., Pfragner, R., Champaneria, M.C., and Murren, J. (2007). Further delineation of the continuous human neoplastic enterochromaffin cell line, KRJ-I, and the inhibitory effects of lanreotide and rapamycin. *J. Mol. Endocrinol.* **38**, 181–192.
- Kiedziarska, A., Smietana, K., Czepczynska, H., and Otlewski, J. (2007). Structural similarities and functional diversity of eukaryotic discoidin-like domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 1069–1078.
- Kieffer, T.J., Huang, Z., McIntosh, C.H., Buchan, A.M., Brown, J.C., and Pederson, R.A. (1995). Gastric inhibitory polypeptide release from a tumor-derived cell line. *Am. J. Physiol.* **269**, E316–322.
- Kim, J.E., and Chen, J. (2004). regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes* **53**, 2748–2756.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.-L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* **10**, 935–945.
- Koga, T., Takahashi, K., Sato, K., Kikuchi, I., Okazaki, Y., Miura, T., Katsuta, M., and Narita, T. (2002). The effect of colonisation by *Helicobacter pylori* in *Praomys (Mastomys) natalensis* on the incidence of carcinoids. *J. Med. Microbiol.* **51**, 777–785.
- Kölby, L., Bernhardt, P., Ahlman, H., Wängberg, B., Johanson, V., Wigander, A., Forssell-Aronsson, E., Karlsson, S., Ahrén, B., Stenman, G., et al. (2001). A transplantable human carcinoid as model for somatostatin receptor-mediated and amine transporter-mediated radionuclide uptake. *Am. J. Pathol.* **158**, 745–755.
- Kölby, L., Persson, G., Franzén, S., and Ahrén, B. (2003). Randomized clinical trial of the effect of interferon alpha on survival in patients with disseminated midgut carcinoid tumours. *Br. J. Surg.* **90**, 687–693.



- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., O'Connor, T.P., Patel, N.H., Admon, A., Bentley, D., and Goodman, C.S. (1992). Fasciclin IV: sequence, expression, and function during growth cone guidance in the grasshopper embryo. *Neuron* 9, 831–845.
- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* 75, 1389–1399.
- Kong-Beltran, M., Stamos, J., and Wickramasinghe, D. (2004). The Sema domain of Met is necessary for receptor dimerization and activation. *Cancer Cell* 6, 75–84.
- Koppel, A.M., Feiner, L., Kobayashi, H., and Raper, J.A. (1997). A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* 19, 531–537.
- Kos-Kudła, B., O'Toole, D., Falconi, M., Gross, D., Klöppel, G., Sundin, A., Ramage, J., Oberg, K., Wiedenmann, B., Komminoth, P., et al. (2010). ENETS consensus guidelines for the management of bone and lung metastases from neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 91, 341–350.
- Kozlov, G., Perreault, A., Schrag, J.D., Park, M., Cygler, M., Gehring, K., and Ekiel, I. (2004). Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 234–240.
- Krenning, E.P., Kooij, P.P., Bakker, W.H., Breeman, W.A., Postema, P.T., Kwekkeboom, D.J., Oei, H.Y., de Jong, M., Visser, T.J., and Reijs, A.E. (1994). Radiotherapy with a radiolabeled somatostatin analogue, [<sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe<sup>1</sup>]-octreotide. A case history. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 733, 496–506.
- Kristof, A.S., Marks-Konczalik, J., Billings, E., and Moss, J. (2003). Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin. *J. Biol. Chem.* 278, 33637–33644.
- Kulke, M.H., Bergsland, E.K., and Yao, J.C. (2009). Glycemic control in patients with insulinoma treated with everolimus. *N. Engl. J. Med.* 360, 195–197.
- Kumanogoh, A., Watanabe, C., Lee, I., Wang, X., Shi, W., Araki, H., Hirata, H., Iwahori, K., Uchida, J., Yasui, T., et al. (2000). Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling. *Immunity* 13, 621–631.
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., et al. (2002). Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* 419, 629–633.
- Kumanogoh, A., Shikina, T., Suzuki, K., Uematsu, S., Yukawa, K., Kashiwamura, S.-I., Tsutsui, H., Yamamoto, M., Takamatsu, H., Ko-Mitamura, E.P., et al. (2005). Nonredundant roles of Sema4A in the immune system: defective T cell priming and Th1/Th2 regulation in Sema4A-deficient mice. *Immunity* 22, 305–316.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585–596.
- Kusy, S., Nasarre, P., Chan, D., Potiron, V., Meyronet, D., Gemmill, R.M., Constantin, B., Drabkin, H.A., and Roche, J. (2005a). Selective suppression of in vivo tumorigenicity by semaphorin SEMA3F in lung cancer cells. *Neoplasia* N. Y. N 7, 457–465.

- Kusy, S., Potiron, V., Zeng, C., Franklin, W., Brambilla, E., Minna, J., Drabkin, H.A., and Roche, J. (2005b). Promoter characterization of Semaphorin SEMA3F, a tumor suppressor gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1730, 66–76.
- L'Amoreaux, W.J., Cuttitta, C., Santora, A., Blaize, J.F., Tachjadi, J., and El Idrissi, A. (2010). Taurine regulates insulin release from pancreatic beta cell lines. *J. Biomed. Sci.* 17 Suppl 1, S11.
- La, P., Silva, A.C., Hou, Z., Wang, H., Schnepf, R.W., Yan, N., Shi, Y., and Hua, X. (2004). Direct binding of DNA by tumor suppressor menin. *J. Biol. Chem.* 279, 49045–49054.
- La, P., Desmond, A., Hou, Z., Silva, A.C., Schnepf, R.W., and Hua, X. (2006). Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression. *Oncogene* 25, 3537–3546.
- Lanahan, A., Zhang, X., Fantin, A., Zhuang, Z., Rivera-Molina, F., Speichinger, K., Prahst, C., Zhang, J., Wang, Y., Davis, G., et al. (2013). The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis. *Dev. Cell* 25, 156–168.
- Lantuéjoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J., and Brambilla, E. (2003). Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J. Pathol.* 200, 336–347.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., and Semenza, G.L. (2001). HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3995–4004.
- Lee, D.-F., Kuo, H.-P., Chen, C.-T., Hsu, J.-M., Chou, C.-K., Wei, Y., Sun, H.-L., Li, L.-Y., Ping, B., Huang, W.-C., et al. (2007). IKK beta suppression of TSC1 links inflammation and tumor angiogenesis via the mTOR pathway. *Cell* 130, 440–455.
- Lees, J.G., Bach, C.T.T., and O'Neill, G.M. (2011). Interior decoration: tropomyosin in actin dynamics and cell migration. *Cell Adhes. Migr.* 5, 181–186.
- Lepage, C., Bouvier, A.M., Phelip, J.M., Hatem, C., Vernet, C., and Faivre, J. (2004). Incidence and management of malignant digestive endocrine tumours in a well defined French population. *Gut* 53, 549–553.
- Lepage, C., Ciccolallo, L., De Angelis, R., Bouvier, A.M., Faivre, J., Gatta, G., and EUROCORE working group (2010). European disparities in malignant digestive endocrine tumours survival. *Int. J. Cancer* 126, 2928–2934.
- Leung, T., Ng, Y., Cheong, A., Ng, C.H., Tan, I., Hall, C., and Lim, L. (2002). p80 ROKalpha binding protein is a novel splice variant of CRMP-1 which associates with CRMP-2 and modulates RhoA-induced neuronal morphology. *FEBS Lett.* 532, 445–449.
- Libutti, S.K., Crabtree, J.S., Lorang, D., Burns, A.L., Mazzanti, C., Hewitt, S.M., O'Connor, S., Ward, J.M., Emmert-Buck, M.R., Remaley, A., et al. (2003). Parathyroid gland-specific deletion of the mouse Men1 gene results in parathyroid neoplasia and hypercalcemic hyperparathyroidism. *Cancer Res.* 63, 8022–8028.
- Lima, M.J., Docherty, H.M., Chen, Y., and Docherty, K. (2012). Efficient differentiation of AR42J cells towards insulin-producing cells using pancreatic transcription factors in combination with growth factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 358, 69–80.

- Lin, J.-C., Yan, Y.-T., Hsieh, W.-K., Peng, P.-J., Su, C.-H., and Tarn, W.-Y. (2013a). RBM4 promotes pancreas cell differentiation and insulin expression. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 319–327.
- Lin, L.-Z., Li, P., Chen, H.-R., and Pang, L.-J. (2013b). Sunitinib malate as first-line treatment for an advanced, poorly differentiated pancreatic neuroendocrine tumor. *Future Oncol. Lond. Engl.* *9*, 909–913.
- Lindholm, D.P., Eriksson, B., and Granberg, D. (2012). Response to temozolomide and bevacizumab in a patient with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *29*, 301–303.
- Llorca, O., Martín-Benito, J., Grantham, J., Ritco-Vonsovici, M., Willison, K.R., Carrascosa, J.L., and Valpuesta, J.M. (2001). The “sequential allosteric ring” mechanism in the eukaryotic chaperonin-assisted folding of actin and tubulin. *EMBO J.* *20*, 4065–4075.
- Löllgen, R.M., Hessman, O., Szabo, E., Westin, G., and Akerström, G. (2001). Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *92*, 812–815.
- Lopez-Egido, J.R., Wang, Y., Grönberg, M., Grimfjärd, P., Wang, S., Stålberg, P., and Skogseid, B. (2009). Differentially regulated genes in MEN1-transfected BON cells using RT-differential display and oligonucleotide microarrays. *Anticancer Res.* *29*, 1859–1866.
- Lu, T.-P., Tsai, M.-H., Lee, J.-M., Hsu, C.-P., Chen, P.-C., Lin, C.-W., Shih, J.-Y., Yang, P.-C., Hsiao, C.K., Lai, L.-C., et al. (2010). Identification of a novel biomarker, SEMA5A, for non-small cell lung carcinoma in nonsmoking women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* *19*, 2590–2597.
- Lundqvist, M., Mark, J., Funa, K., Heldin, N.E., Morstyn, G., Wedell, B., Layton, J., and Oberg, K. (1991). Characterisation of a cell line (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *27*, 1663–1668.
- Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* *75*, 217–227.
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., Bonner, P., Bernardi, R., Franz, D.N., Witte, D., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2007). Identification of S664 TSC2 phosphorylation as a marker for extracellular signal-regulated kinase mediated mTOR activation in tuberous sclerosis and human cancer. *Cancer Res.* *67*, 7106–7112.
- Madoff, D.C., Gupta, S., Ahrar, K., Murthy, R., and Yao, J.C. (2006). Update on the management of neuroendocrine hepatic metastases. *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR* *17*, 1235–1249; quiz 1250.
- Maione, F., Molla, F., Meda, C., Latini, R., Zentilin, L., Giacca, M., Seano, G., Serini, G., Bussolino, F., and Giraudo, E. (2009). Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J. Clin. Invest.* *119*, 3356–3372.
- Maione, F., Capano, S., Regano, D., Zentilin, L., Giacca, M., Casanovas, O., Bussolino, F., Serini, G., and Giraudo, E. (2012). Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *J. Clin. Invest.*

- Maira, S.-M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chène, P., De Pover, A., Schoemaker, K., et al. (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1851–1863.
- Mangel, A.W., Snow, N.D., Misukonis, M.A., Basavappa, S., Middleton, J.P., Fitz, J.G., and Liddle, R.A. (1993). Calcium-dependent regulation of cholecystokinin secretion and potassium currents in STC-1 cells. *Am. J. Physiol.* 264, G1031–1036.
- Manning, B.D. (2004). Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J. Cell Biol.* 167, 399–403.
- Marín, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* 293, 872–875.
- Marion-Audibert, A.-M., Barel, C., Gouysse, G., Dumortier, J., Pilleul, F., Pourreyron, C., Hervieu, V., Poncet, G., Lombard-Bohas, C., Chayvialle, J.-A., et al. (2003). Low microvessel density is an unfavorable histoprognotic factor in pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* 125, 1094–1104.
- Mashima, H., Ohnishi, H., Wakabayashi, K., Mine, T., Miyagawa, J., Hanafusa, T., Seno, M., Yamada, H., and Kojima, I. (1996). Betacellulin and activin A coordinately convert amylase-secreting pancreatic AR42J cells into insulin-secreting cells. *J. Clin. Invest.* 97, 1647–1654.
- Massironi, S., Conte, D., Sciola, V., Spampatti, M.P., Ciafardini, C., Valenti, L., Rossi, R.E., and Peracchi, M. (2010). Plasma chromogranin A response to octreotide test: prognostic value for clinical outcome in endocrine digestive tumors. *Am. J. Gastroenterol.* 105, 2072–2078.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 18, 423–434.
- Mazzaglia, P.J., Berber, E., Milas, M., and Siperstein, A.E. (2007). Laparoscopic radiofrequency ablation of neuroendocrine liver metastases: a 10-year experience evaluating predictors of survival. *Surgery* 142, 10–19.
- McCollum, A.D., Kulke, M.H., Ryan, D.P., Clark, J.W., Shulman, L.N., Mayer, R.J., Bartel, S., and Fuchs, C.S. (2004). Lack of efficacy of streptozocin and doxorubicin in patients with advanced pancreatic endocrine tumors. *Am. J. Clin. Oncol.* 27, 485–488.
- Menon, S., and Manning, B.D. (2008). Common corruption of the mTOR signaling network in human tumors. *Oncogene* 27 *Suppl 2*, S43–51.
- Meyronet, D., Massoma, P., Thivolet, F., Chalabreysse, L., Rogemond, V., Schlama, A., Honnorat, J., and Thomasset, N. (2008). Extensive expression of collapsin response mediator protein 5 (CRMP5) is a specific marker of high-grade lung neuroendocrine carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 32, 1699–1708.
- Minturn, J.E., Fryer, H.J., Geschwind, D.H., and Hockfield, S. (1995). TOAD-64, a gene expressed early in neuronal differentiation in the rat, is related to unc-33, a *C. elegans* gene involved in axon outgrowth. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 6757–6766.
- Missiaglia, E., Dalai, I., Barbi, S., Beghelli, S., Falconi, M., della Peruta, M., Piemonti, L., Capurso, G., Di Florio, A., delle Fave, G., et al. (2010). Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 245–255.

- Mitry, E., Baudin, E., Ducreux, M., Sabourin, J.C., Rufié, P., Aparicio, T., Aparicio, T., Lasser, P., Elias, D., Duvillard, P., et al. (1999). Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br. J. Cancer* *81*, 1351–1355.
- Mitsui, N., Inatome, R., Takahashi, S., Goshima, Y., Yamamura, H., and Yanagi, S. (2002). Involvement of Fes/Fps tyrosine kinase in semaphorin3A signaling. *EMBO J.* *21*, 3274–3285.
- Miyazaki, J., Araki, K., Yamato, E., Ikegami, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Oka, Y., and Yamamura, K. (1990). Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* *127*, 126–132.
- Modlin, I.M., Kidd, M., Latich, I., Zikusoka, M.N., and Shapiro, M.D. (2005). Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* *128*, 1717–1751.
- Modlin, I.M., Kidd, M., Pfragner, R., Eick, G.N., and Champaneria, M.C. (2006). The functional characterization of normal and neoplastic human enterochromaffin cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *91*, 2340–2348.
- Modlin, I.M., Oberg, K., Chung, D.C., Jensen, R.T., de Herder, W.W., Thakker, R.V., Caplin, M., Delle Fave, G., Kaltsas, G.A., Krenning, E.P., et al. (2008). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol.* *9*, 61–72.
- Moertel, C.G., Kvols, L.K., O’Connell, M.J., and Rubin, J. (1991). Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms. *Cancer* *68*, 227–232.
- Montuenga, L.M., Guembe, L., Burrell, M.A., Bodegas, M.E., Calvo, A., Sola, J.J., Sesma, P., and Villaro, A.C. (2003). The diffuse endocrine system: from embryogenesis to carcinogenesis. *Prog. Histochem. Cytochem.* *38*, 155–272.
- Moreira, J.M.A., Shen, T., Ohlsson, G., Gromov, P., Gromova, I., and Celis, J.E. (2008). A combined proteome and ultrastructural localization analysis of 14-3-3 proteins in transformed human amnion (AMA) cells: definition of a framework to study isoform-specific differences. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *7*, 1225–1240.
- Moreno, A., Akcakanat, A., Munsell, M.F., Soni, A., Yao, J.C., and Meric-Bernstam, F. (2008). Antitumor activity of rapamycin and octreotide as single agents or in combination in neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* *15*, 257–266.
- Morgan-Fisher, M., Couchman, J.R., and Yoneda, A. (2013). Phosphorylation and mRNA Splicing of Collapsin Response Mediator Protein-2 Determine Inhibition of Rho-Associated Protein Kinase (ROCK)-II Function in Carcinoma Cell Migration and Invasion. *J. Biol. Chem.*
- Mulherin, A.J., Oh, A.H., Kim, H., Grieco, A., Lauffer, L.M., and Brubaker, P.L. (2011). Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology* *152*, 4610–4619.
- Muscarella, P., Melvin, W.S., Fisher, W.E., Foor, J., Ellison, E.C., Herman, J.G., Schirmer, W.J., Hitchcock, C.L., DeYoung, B.R., and Weghorst, C.M. (1998). Genetic alterations in gastrinomas and nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors: an analysis of p16/MTS1 tumor suppressor gene inactivation. *Cancer Res.* *58*, 237–240.

- Musunuru, S., Carpenter, J.E., Sippel, R.S., Kunnimalaiyaan, M., and Chen, H. (2005). A mouse model of carcinoid syndrome and heart disease. *J. Surg. Res.* *126*, 102–105.
- Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R.G., and Strittmatter, S.M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* *21*, 1093–1100.
- Nakashima, K., Kanda, Y., Hirokawa, Y., Kawasaki, F., Matsuki, M., and Kaku, K. (2009). MIN6 is not a pure beta cell line but a mixed cell line with other pancreatic endocrine hormones. *Endocr. J.* *56*, 45–53.
- Nasarre, P., Constantin, B., Rouhaud, L., Harnois, T., Raymond, G., Drabkin, H.A., Bourmeyster, N., and Roche, J. (2003). Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia N. Y. N* *5*, 83–92.
- Nasarre, P., Kusy, S., Constantin, B., Castellani, V., Drabkin, H.A., Bagnard, D., and Roche, J. (2005). Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion. *Neoplasia N. Y. N* *7*, 180–189.
- Nasarre, P., Gemmill, R.M., Potiron, V.A., Roche, J., Lu, X., Baron, A.E., Korch, C., Garrett-Mayer, E., Lagana, A., Howe, P.H., et al. (2013). Neuropilin-2 is upregulated in lung cancer cells during TGF $\beta$ 1-induced epithelialmesenchymal transition. *Cancer Res.*
- Newton, J.N., Swerdlow, A.J., dos Santos Silva, I.M., Vessey, M.P., Grahame-Smith, D.G., Primatesta, P., and Reynolds, D.J. (1994). The epidemiology of carcinoid tumours in England and Scotland. *Br. J. Cancer* *70*, 939–942.
- Nguyen, H., Ivanova, V.S., Kavandi, L., Rodriguez, G.C., Maxwell, G.L., and Syed, V. (2011). Progesterone and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibit endometrial cancer cell growth by upregulating semaphorin 3B and semaphorin 3F. *Mol. Cancer Res. MCR* *9*, 1479–1492.
- Nikiforova, M.N., Nikiforov, Y.E., Biddinger, P., Gnepp, D.R., Grosebacher, L.A., Wajchenberg, B.L., Fagin, J.A., and Cohen, R.M. (1999). Frequent loss of heterozygosity at chromosome 3p14.2-3p21 in human pancreatic islet cell tumours. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *51*, 27–33.
- Nilsson, O., Kölby, L., Bernhardt, P., Forssell-Aronsson, E., Johanson, V., and Ahlman, H. (2004). GOT1 xenografted to nude mice: a unique model for in vivo studies on SSTR-mediated radiation therapy of carcinoid tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1014*, 275–279.
- Norton, J.A., Fraker, D.L., Alexander, H.R., Gibril, F., Liewehr, D.J., Venzon, D.J., and Jensen, R.T. (2006). Surgery increases survival in patients with gastrinoma. *Ann. Surg.* *244*, 410–419.
- Nyfeler, B., Bergman, P., Triantafellow, E., Wilson, C.J., Zhu, Y., Radetich, B., Finan, P.M., Klionsky, D.J., and Murphy, L.O. (2011). Relieving autophagy and 4EBP1 from rapamycin resistance. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 2867–2876.
- O’Driscoll, L., Gammell, P., McKiernan, E., Ryan, E., Jeppesen, P.B., Rani, S., and Clynes, M. (2006). Phenotypic and global gene expression profile changes between low passage and high passage MIN-6 cells. *J. Endocrinol.* *191*, 665–676.
- O’Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.-B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., et al. (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res.* *66*, 1500–1508.

Oberg, K. (2012). Neuroendocrine tumors of the digestive tract: impact of new classifications and new agents on therapeutic approaches. *Curr. Opin. Oncol.* *24*, 433–440.

Oddstig, J., Bernhardt, P., Lizana, H., Nilsson, O., Ahlman, H., Kölby, L., and Forssell-Aronsson, E. (2012). Inhomogeneous activity distribution of <sup>177</sup>Lu-DOTA0-Tyr3-octreotate and effects on somatostatin receptor expression in human carcinoid GOT1 tumors in nude mice. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *33*, 229–239.

OETTLE, A.G. (1957). Spontaneous carcinoma of the glandular stomach in *Rattus (mastomys) natalensis*, an African rodent. *Br. J. Cancer* *11*, 415–433.

Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* *305*, 862–865.

Oinuma, I., Ito, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2010). Semaphorin 4D/Plexin-B1 stimulates PTEN activity through R-Ras GTPase-activating protein activity, inducing growth cone collapse in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* *285*, 28200–28209.

Okamoto, K., Iwasaki, N., Doi, K., Noiri, E., Iwamoto, Y., Uchigata, Y., Fujita, T., and Tokunaga, K. (2012). Inhibition of glucose-stimulated insulin secretion by KCNJ15, a newly identified susceptibility gene for type 2 diabetes. *Diabetes* *61*, 1734–1741.

Oliemuller, E., Peláez, R., Garasa, S., Pajares, M.J., Agorreta, J., Pío, R., Montuenga, L.M., Teijeira, A., Llanos, S., and Rouzaut, A. (2012). Phosphorylated tubulin adaptor protein CRMP-2 as prognostic marker and candidate therapeutic target for NSCLC. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.*

Olsen, I.H., Langer, S.W., Jepsen, I., Assens, M., Federspiel, B., Hasselby, J.P., Hansen, C.P., Kjaer, A., and Knigge, U. (2012). First-line treatment of patients with disseminated poorly differentiated neuroendocrine carcinomas with carboplatin, etoposide, and vincristine: a single institution experience. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* *51*, 97–100.

Oneyama, C., Ikeda, J., Okuzaki, D., Suzuki, K., Kanou, T., Shintani, Y., Morii, E., Okumura, M., Aozasa, K., and Okada, M. (2011). MicroRNA-mediated downregulation of mTOR/FGFR3 controls tumor growth induced by Src-related oncogenic pathways. *Oncogene* *30*, 3489–3501.

Ozawa, H., and Takata, K. (1995). The granin family--its role in sorting and secretory granule formation. *Cell Struct. Funct.* *20*, 415–420.

Pan, H., Wanami, L.S., Dissanayake, T.R., and Bachelder, R.E. (2009). Autocrine semaphorin3A stimulates alpha2 beta1 integrin expression/function in breast tumor cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *118*, 197–205.

Pan, S.-H., Chao, Y.-C., Chen, H.-Y., Hung, P.-F., Lin, P.-Y., Lin, C.-W., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Lee, Y.-C., Yang, S.-C., et al. (2010). Long form collapsin response mediator protein-1 (LCRMP-1) expression is associated with clinical outcome and lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer Amst. Neth.* *67*, 93–100.

Pan, S.-H., Chao, Y.-C., Hung, P.-F., Chen, H.-Y., Yang, S.-C., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Chang, C.-C., Wang, W.-L., Chan, W.-K., et al. (2011). The ability of LCRMP-1 to promote cancer invasion by enhancing filopodia formation is antagonized by CRMP-1. *J. Clin. Invest.* *121*, 3189–3205.

Panzuto, F., Severi, C., Cannizzaro, R., Falconi, M., Angeletti, S., Pasquali, A., Corleto, V.D., Annibale, B., Buonadonna, A., Pederzoli, P., et al. (2004). Utility of combined use of plasma levels of

chromogranin A and pancreatic polypeptide in the diagnosis of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. *J. Endocrinol. Invest.* **27**, 6–11.

Panzuto, F., Di Fonzo, M., Iannicelli, E., Sciuto, R., Maini, C.L., Capurso, G., Milione, M., Cattaruzza, M.S., Falconi, M., David, V., et al. (2006). Long-term clinical outcome of somatostatin analogues for treatment of progressive, metastatic, well-differentiated entero-pancreatic endocrine carcinoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **17**, 461–466.

Parekh, D., Ishizuka, J., Townsend, C.M., Jr, Haber, B., Beauchamp, R.D., Karp, G., Kim, S.W., Rajaraman, S., Greeley, G., Jr, and Thompson, J.C. (1994). Characterization of a human pancreatic carcinoid in vitro: morphology, amine and peptide storage, and secretion. *Pancreas* **9**, 83–90.

Parker, M.W., Xu, P., Guo, H.-F., and Vander Kooi, C.W. (2012). Mechanism of selective VEGF-A binding by neuropilin-1 reveals a basis for specific ligand inhibition. *PLoS One* **7**, e49177.

Pasterkamp, R.J., and Giger, R.J. (2009). Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **19**, 263–274.

Pavel, M., Grossman, A., Arnold, R., Perren, A., Kaltsas, G., Steinmüller, T., de Herder, W., Nikou, G., Plöckinger, U., Lopes, J.M., et al. (2010). ENETS consensus guidelines for the management of brain, cardiac and ovarian metastases from neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* **91**, 326–332.

Pavel, M., Baudin, E., Couvelard, A., Krenning, E., Öberg, K., Steinmüller, T., Anlauf, M., Wiedenmann, B., Salazar, R., and Barcelona Consensus Conference participants (2012). ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology* **95**, 157–176.

Pavel, M.E., Hainsworth, J.D., Baudin, E., Peeters, M., Hörsch, D., Winkler, R.E., Klimovsky, J., Lebwohl, D., Jehl, V., Wolin, E.M., et al. (2011). Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* **378**, 2005–2012.

Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F.M., Gourlay, R., Magnuson, M.A., and Alessi, D.R. (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem. J.* **405**, 513–522.

Pearce, L.R., Sommer, E.M., Sakamoto, K., Wullschleger, S., and Alessi, D.R. (2011). Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochem. J.* **436**, 169–179.

Peghini, P.L., Iwamoto, M., Raffeld, M., Chen, Y.-J., Goebel, S.U., Serrano, J., and Jensen, R.T. (2002). Overexpression of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor receptors in a proportion of gastrinomas correlates with aggressive growth and lower curability. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **8**, 2273–2285.

Bar-Peled, L., Chantranupong, L., Cherniack, A.D., Chen, W.W., Ottina, K.A., Grabiner, B.C., Spear, E.D., Carter, S.L., Meyerson, M., and Sabatini, D.M. (2013). A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* **340**, 1100–1106.

Pellet-Many, C., Frankel, P., Jia, H., and Zachary, I. (2008). Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem. J.* **411**, 211–226.



- Peng, T., Golub, T.R., and Sabatini, D.M. (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5575–5584.
- Peracchi, M., Conte, D., Gebbia, C., Penati, C., Pizzinelli, S., Arosio, M., Corbetta, S., and Spada, A. (2003). Plasma chromogranin A in patients with sporadic gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors or multiple endocrine neoplasia type 1. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* *148*, 39–43.
- Perrot, V., Vazquez-Prado, J., and Gutkind, J.S. (2002). Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J. Biol. Chem.* *277*, 43115–43120.
- Peterson, R.T., Beal, P.A., Comb, M.J., and Schreiber, S.L. (2000). FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J. Biol. Chem.* *275*, 7416–7423.
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* *137*, 873–886.
- Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N., et al. (2011). mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell* *146*, 408–420.
- Pfragner, R., Behmel, A., Höger, H., Beham, A., Ingolic, E., Stelzer, I., Svejda, B., Moser, V.A., Obenauf, A.C., Siegl, V., et al. (2009). Establishment and characterization of three novel cell lines - P-STC, L-STC, H-STC - derived from a human metastatic midgut carcinoid. *Anticancer Res.* *29*, 1951–1961.
- Pietras, K., and Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose “chemo-switch” regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 939–952.
- Pitt, S.C., Knuth, J., Keily, J.M., McDermott, J.C., Weber, S.M., Chen, H., Rilling, W.S., Quebbeman, E.J., Agarwal, D.M., and Pitt, H.A. (2008). Hepatic neuroendocrine metastases: chemo- or bland embolization? *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* *12*, 1951–1960.
- Pizzi, S., Azzoni, C., Tamburini, E., Bottarelli, L., Campanini, N., D’Adda, T., Fellegara, G., Luong, T.V., Pasquali, C., Rossi, G., et al. (2008). Adenomatous polyposis coli alteration in digestive endocrine tumours: correlation with nuclear translocation of beta-catenin and chromosomal instability. *Endocr. Relat. Cancer* *15*, 1013–1024.
- Polleux, F., Morrow, T., and Ghosh, A. (2000). Semaphorin 3A is a chemoattractant for cortical apical dendrites. *Nature* *404*, 567–573.
- Poncet, G., Villaume, K., Walter, T., Pourreyron, C., Theillaumas, A., Lépinasse, F., Hervieu, V., Cordier-Bussat, M., Scoazec, J.-Y., and Roche, C. (2009). Angiogenesis and tumor progression in neuroendocrine digestive tumors. *J. Surg. Res.* *154*, 68–77.
- Potiron, V.A., Sharma, G., Nasarre, P., Clarhaut, J.A., Augustin, H.G., Gemmill, R.M., Roche, J., and Drabkin, H.A. (2007). Semaphorin SEMA3F affects multiple signaling pathways in lung cancer cells. *Cancer Res.* *67*, 8708–8715.

- Pourreyron, C., Poncet, G., Roche, C., Gouysse, G., Nejjari, M., Walter, T., Villaume, K., Jacquier, M.-F., Bernard, C., Dumortier, J., et al. (2008). The role of angiogenesis in endocrine liver metastases: an experimental study. *J. Surg. Res.* *144*, 64–73.
- Prud'homme, G.J., and Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* *3*, 921–939.
- Pullar, C.E., Rizzo, A., and Isseroff, R.R. (2006). beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J. Biol. Chem.* *281*, 21225–21235.
- Püschel, A.W. (2007). GTPases in semaphorin signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* *600*, 12–23.
- Qian, Z.R., Ter-Minassian, M., Chan, J.A., Imamura, Y., Hooshmand, S.M., Kuchiba, A., Morikawa, T., Brais, L.K., Daskalova, A., Heafield, R., et al. (2013). Prognostic Significance of MTOR Pathway Component Expression in Neuroendocrine Tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 3418–3425.
- Raab, S., and Plate, K.H. (2007). Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *113*, 607–626.
- Rachdi, L., Balcazar, N., Osorio-Duque, F., Elghazi, L., Weiss, A., Gould, A., Chang-Chen, K.J., Gambello, M.J., and Bernal-Mizrachi, E. (2008). Disruption of Tsc2 in pancreatic beta cells induces beta cell mass expansion and improved glucose tolerance in a TORC1-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9250–9255.
- Ramella Munhoz, R., de Mendonça Rego, J.F., de Celis Ferrari, A.R., Ignez Braghiroli, M., Mendonça Bariani, G., Marcelo Hoff, P., Perego Costa, F., Eduardo Flesch Pfiffer, T., and Riechelmann, R. (2013). Combination of irinotecan and a platinum agent for poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. *Rare Tumors* *5*, e39.
- Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J.-L., Bang, Y.-J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., Valle, J., Metrakos, P., Smith, D., Vinik, A., et al. (2011). Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* *364*, 501–513.
- Reidy, D.L., Tang, L.H., and Saltz, L.B. (2009). Treatment of advanced disease in patients with well-differentiated neuroendocrine tumors. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* *6*, 143–152.
- Reimann, F., Habib, A.M., Tolhurst, G., Parker, H.E., Rogers, G.J., and Gribble, F.M. (2008). Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* *8*, 532–539.
- Reimer, R.A., Darimont, C., Gremlich, S., Nicolas-Métral, V., Rüegg, U.T., and Macé, K. (2001). A human cellular model for studying the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Endocrinology* *142*, 4522–4528.
- Rey-Gallardo, A., Escribano, C., Delgado-Martín, C., Rodríguez-Fernández, J.L., Gerardy-Schahn, R., Rutishauser, U., Corbi, A.L., and Vega, M.A. (2010). Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology* *20*, 1139–1146.
- Richards, M.L., Thompson, G.B., Farley, D.R., Kendrick, M.L., Service, J.F., Vella, A., and Grant, C.S. (2011). Setting the bar for laparoscopic resection of sporadic insulinoma. *World J. Surg.* *35*, 785–789.

- Rindi, G., Grant, S.G., Yiangou, Y., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Bautch, V.L., Solcia, E., and Polak, J.M. (1990). Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. *Am. J. Pathol.* *136*, 1349–1363.
- Rindi, G., Villanacci, V., and Ubiali, A. (2000). Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion* *62 Suppl 1*, 19–26.
- Rindi, G., Couvelard, A., Scoazec, J.-Y., and Bordi, C. (2005). [Practical notes for the evaluation of malignancy in digestive endocrine tumors]. *Ann. Pathol.* *25*, 487–498.
- Rindi, G., Klöppel, G., Alhman, H., Caplin, M., Couvelard, A., de Herder, W.W., Eriksson, B., Falchetti, A., Falconi, M., Komminoth, P., et al. (2006). TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *449*, 395–401.
- Rindi, G., Klöppel, G., Couvelard, A., Komminoth, P., Körner, M., Lopes, J.M., McNicol, A.-M., Nilsson, O., Perren, A., Scarpa, A., et al. (2007). TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* *451*, 757–762.
- Rindi, G., Klimstra, D.S., Arnold, R., Klöppel, G., Bosman, F.T., Komminoth, P., and Perren, A. (2010). Nomenclature and classification.
- Rinke, A., Müller, H.-H., Schade-Brittinger, C., Klose, K.-J., Barth, P., Wied, M., Mayer, C., Aminossadati, B., Pape, U.-F., Bläker, M., et al. (2009). Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 4656–4663.
- Roche, J., Boldog, F., Robinson, M., Robinson, L., Varella-Garcia, M., Swanton, M., Waggoner, B., Fishel, R., Franklin, W., Gemmill, R., et al. (1996). Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene* *12*, 1289–1297.
- Roe, J.-S., and Youn, H.-D. (2006). The positive regulation of p53 by the tumor suppressor VHL. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 2054–2056.
- Roodink, I., Kats, G., van Kempen, L., Grunberg, M., Maass, C., Verrijp, K., Raats, J., and Leenders, W. (2008). Semaphorin 3E expression correlates inversely with Plexin D1 during tumor progression. *Am. J. Pathol.* *173*, 1873–1881.
- La Rosa, S., Uccella, S., Finzi, G., Albarello, L., Sessa, F., and Capella, C. (2003). Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in digestive endocrine tumors: correlation with microvessel density and clinicopathologic features. *Hum. Pathol.* *34*, 18–27.
- Rosewicz, S., Ahnert-Hilger, G., Haller, H., Riecken, E.O., and Wiedenmann, B. (1994). Rat pancreatic AR42J cells. Amphicrine cells as an in vitro model to study peptide hormone receptor regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *733*, 407–415.
- Rossignol, M., Gagnon, M.L., and Klagsbrun, M. (2000). Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* *70*, 211–222.
- Roth, L., Nasarre, C., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Crémel, G., Hubert, P., and Bagnard, D. (2008). Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol. Biol. Cell* *19*, 646–654.

- Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 13489–13494.
- Rubin, J., Ajani, J., Schirmer, W., Venook, A.P., Bukowski, R., Pommier, R., Saltz, L., Dandona, P., and Anthony, L. (1999). Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *17*, 600–606.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* *19*, 2199–2211.
- Ryschich, E., Schmidt, J., Hämmerling, G.J., Klar, E., and Ganss, R. (2002). Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *97*, 719–725.
- Sabag, A.D., Bode, J., Fink, D., Kigel, B., Kugler, W., and Neufeld, G. (2012). Semaphorin-3D and semaphorin-3E inhibit the development of tumors from glioblastoma cells implanted in the cortex of the brain. *PLoS One* *7*, e42912.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 815–822.
- Sadanandam, A., Varney, M.L., Singh, S., Ashour, A.E., Moniaux, N., Deb, S., Lele, S.M., Batra, S.K., and Singh, R.K. (2010). High gene expression of semaphorin 5A in pancreatic cancer is associated with tumor growth, invasion and metastasis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *127*, 1373–1383.
- Sadanandam, A., Sidhu, S.S., Wullschleger, S., Singh, S., Varney, M.L., Yang, C.-S., Ashour, A.E., Batra, S.K., and Singh, R.K. (2012). Secreted semaphorin 5A suppressed pancreatic tumour burden but increased metastasis and endothelial cell proliferation. *Br. J. Cancer* *107*, 501–507.
- Sahay, A., Molliver, M.E., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2003). Semaphorin 3F is critical for development of limbic system circuitry and is required in neurons for selective CNS axon guidance events. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 6671–6680.
- Saini, K.S., Loi, S., de Azambuja, E., Metzger-Filho, O., Saini, M.L., Ignatiadis, M., Dancey, J.E., and Piccart-Gebhart, M.J. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat. Rev.* *39*, 935–946.
- Sakurai, A., Gavard, J., Annas-Linhares, Y., Basile, J.R., Amornphimoltham, P., Palmby, T.R., Yagi, H., Zhang, F., Randazzo, P.A., Li, X., et al. (2010). Semaphorin 3E initiates antiangiogenic signaling through plexin D1 by regulating Arf6 and R-Ras. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3086–3098.
- Salazar, R., Wiedenmann, B., Rindi, G., and Ruzsniewski, P. (2012). ENETS 2011 Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumors: an update. *Neuroendocrinology* *95*, 71–73.
- Saltz, L., Trochanowski, B., Buckley, M., Heffernan, B., Niedzwiecki, D., Tao, Y., and Kelsen, D. (1993). Octreotide as an antineoplastic agent in the treatment of functional and nonfunctional neuroendocrine tumors. *Cancer* *72*, 244–248.

- Samuels, Y., and Waldman, T. (2010). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *347*, 21–41.
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol. Cell* *25*, 903–915.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* *320*, 1496–1501.
- Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., and Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *69*, 3429–3456.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol. CB* *14*, 1296–1302.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol. Cell* *22*, 159–168.
- Sasaki, Y., Cheng, C., Uchida, Y., Nakajima, O., Ohshima, T., Yagi, T., Taniguchi, M., Nakayama, T., Kishida, R., Kudo, Y., et al. (2002). Fyn and Cdk5 mediate semaphorin-3A signaling, which is involved in regulation of dendrite orientation in cerebral cortex. *Neuron* *35*, 907–920.
- Saveanu, A., Gunz, G., Dufour, H., Caron, P., Fina, F., Ouafik, L., Culler, M.D., Moreau, J.P., Enjalbert, A., and Jaquet, P. (2001). Bim-23244, a somatostatin receptor subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficacy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 140–145.
- Schmidt, E.F., and Strittmatter, S.M. (2007). The CRMP family of proteins and their role in Sema3A signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* *600*, 1–11.
- Schöber, C., Schmoll, E., Schmoll, H.J., Poliwoda, H., Schuppert, F., Stahl, M., Bokemeyer, C., Wilke, H., and Weiss, J. (1992). Antitumour effect and symptomatic control with interferon alpha 2b in patients with endocrine active tumours. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *28A*, 1664–1666.
- Schonhoff, S.E., Giel-Moloney, M., and Leiter, A.B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* *145*, 2639–2644.
- Sekido, Y., Bader, S., Latif, F., Chen, J.Y., Duh, F.M., Wei, M.H., Albanesi, J.P., Lee, C.C., Lerman, M.I., and Minna, J.D. (1996). Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4120–4125.
- Selleri, S., Palazzo, M., Deola, S., Wang, E., Balsari, A., Marincola, F.M., and Rumio, C. (2008). Induction of pro-inflammatory programs in enteroendocrine cells by the Toll-like receptor agonists flagellin and bacterial LPS. *Int. Immunol.* *20*, 961–970.
- Semaphorin Nomenclature committee (1999). Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins. Semaphorin Nomenclature Committee. *Cell* *97*, 551–552.

Senchenko, V., Liu, J., Braga, E., Mazurenko, N., Loginov, W., Seryogin, Y., Bazov, I., Protopopov, A., Kisseljov, F.L., Kashuba, V., et al. (2003). Deletion mapping using quantitative real-time PCR identifies two distinct 3p21.3 regions affected in most cervical carcinomas. *Oncogene* 22, 2984–2992.

Serini, G., Valdembrì, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., et al. (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 424, 391–397.

Serini, G., Bussolino, F., Maione, F., and Giraud, E. (2013). Class 3 semaphorins: physiological vascular normalizing agents for anti-cancer therapy. *J. Intern. Med.* 273, 138–155.

Shaw, R.J. (2009). LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 196, 65–80.

Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430.

Shen, H.-C.J., He, M., Powell, A., Adem, A., Lorang, D., Heller, C., Grover, A.C., Ylaya, K., Hewitt, S.M., Marx, S.J., et al. (2009). Recapitulation of pancreatic neuroendocrine tumors in human multiple endocrine neoplasia type I syndrome via Pdx1-directed inactivation of Men1. *Cancer Res.* 69, 1858–1866.

Shen, H.-C.J., Ylaya, K., Pechhold, K., Wilson, A., Adem, A., Hewitt, S.M., and Libutti, S.K. (2010). Multiple endocrine neoplasia type 1 deletion in pancreatic alpha-cells leads to development of insulinomas in mice. *Endocrinology* 151, 4024–4030.

Shida, T., Kishimoto, T., Furuya, M., Nikaido, T., Koda, K., Takano, S., Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., et al. (2010). Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 889–893.

Shimizu, A., Mammoto, A., Italiano, J.E., Jr, Pravda, E., Dudley, A.C., Ingber, D.E., and Klagsbrun, M. (2008). ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *J. Biol. Chem.* 283, 27230–27238.

Shimon, I., Taylor, J.E., Dong, J.Z., Bitonte, R.A., Kim, S., Morgan, B., Coy, D.H., Culler, M.D., and Melmed, S. (1997). Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J. Clin. Invest.* 99, 789–798.

Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., and Yu, K. (2010). Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285, 15380–15392.

Sierra, J.R., Corso, S., Caione, L., Cepero, V., Conrotto, P., Cignetti, A., Piacibello, W., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Comoglio, P.M., et al. (2008). Tumor angiogenesis and progression are enhanced by Sema4D produced by tumor-associated macrophages. *J. Exp. Med.* 205, 1673–1685.

Simpson, L., and Parsons, R. (2001). PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp. Cell Res.* 264, 29–41.

Snell, K.C., and Stewart, H.L. (1975). Spontaneous diseases in a closed colony of *Praomys* (*Mastomys*) natalensis. *Bull. World Health Organ.* 52, 645–650.

- Sobin, L.H., Gospodarowicz, M., and Witteking, C. (2009). TNM classification of Malignant Tumours. Seventh Edition (UICC International Union Against Cancer: New York: Wiley-Blackwell).
- Solcia, E., and World Health Organization (2000). Histological typing of endocrine tumours (Berlin ; New York: Springer).
- Solcia, E., Fiocca, R., Villani, L., Luinetti, O., and Capella, C. (1995). Hyperplastic, dysplastic, and neoplastic enterochromaffin-like-cell proliferations of the gastric mucosa. Classification and histogenesis. *Am. J. Surg. Pathol.* *19 Suppl 1*, S1–7.
- Song, X., Zhang, W., Zhang, Y., Zhang, H., Fu, Z., Ye, J., Liu, L., Song, X., and Wu, Y. (2012). Expression of semaphorin 3A and neuropilin 1 with clinicopathological features and survival in human tongue cancer. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* *17*, e962–968.
- Starzec, A., Ladam, P., Vassy, R., Badache, S., Bouchemal, N., Navaza, A., du Penhoat, C.H., and Perret, G.Y. (2007). Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides* *28*, 2397–2402.
- Staton, C.A., Shaw, L.A., Valluru, M., Hoh, L., Koay, I., Cross, S.S., Reed, M.W., and Brown, N.J. (2011). Expression of class 3 semaphorins and their receptors in human breast neoplasia. *Histopathology* *59*, 274–282.
- Stehn, J.R., Haass, N.K., Bonello, T., Desouza, M., Kottyan, G., Treutlein, H., Zeng, J., Nascimento, P.R.B.B., Sequeira, V.B., Butler, T.L., et al. (2013). A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. *Cancer Res.* *73*, 5169–5182.
- Stenmark, P., Ogg, D., Flodin, S., Flores, A., Kotenyova, T., Nyman, T., Nordlund, P., and Kursula, P. (2007). The structure of human collapsin response mediator protein 2, a regulator of axonal growth. *J. Neurochem.* *101*, 906–917.
- Stilling, G.A., Zhang, H., Ruebel, K.H., Leontovich, A.A., Jin, L., Tanizaki, Y., Zhang, S., Erickson, L.A., Hobday, T., and Lloyd, R.V. (2007). Characterization of the functional and growth properties of cell lines established from ileal and rectal carcinoid tumors. *Endocr. Pathol.* *18*, 223–232.
- Strongin, A.Y. (2010). Proteolytic and non-proteolytic roles of membrane type-1 matrix metalloproteinase in malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 133–141.
- Sulpice, E., Plouët, J., Bergé, M., Allanic, D., Tobelem, G., and Merkulova-Rainon, T. (2008). Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* *111*, 2036–2045.
- Sun, S.-Y., Rosenberg, L.M., Wang, X., Zhou, Z., Yue, P., Fu, H., and Khuri, F.R. (2005a). Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* *65*, 7052–7058.
- Sun, W., Lipsitz, S., Catalano, P., Mailliard, J.A., Haller, D.G., and Eastern Cooperative Oncology Group (2005b). Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 4897–4904.

- Suzuki, K., Okuno, T., Yamamoto, M., Pasterkamp, R.J., Takegahara, N., Takamatsu, H., Kitao, T., Takagi, J., Rennert, P.D., Kolodkin, A.L., et al. (2007). Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin. *Nature* 446, 680–684.
- Svejda, B., Kidd, M., Kazberouk, A., Lawrence, B., Pfragner, R., and Modlin, I.M. (2011). Limitations in small intestinal neuroendocrine tumor therapy by mTor kinase inhibition reflect growth factor-mediated PI3K feedback loop activation via ERK1/2 and AKT. *Cancer*.
- Swiercz, J.M., Worzfeld, T., and Offermanns, S. (2008). ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1. *J. Biol. Chem.* 283, 1893–1901.
- Syed, S.K., Kauffman, A.L., Beavers, L.S., Alston, J.T., Farb, T.B., Ficorilli, J., Macrelo, M.C., Brenner, M.B., Bokvist, K., Barrett, D.G., et al. (2013). Ectonucleotidase NTPDase3 is abundant in pancreatic  $\beta$  cells and regulates glucose induced insulin secretion. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*
- Tabernero, J., Rojo, F., Calvo, E., Burris, H., Judson, I., Hazell, K., Martinelli, E., Ramon y Cajal, S., Jones, S., Vidal, L., et al. (2008). Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 1603–1610.
- Tajsharghi, H., Ohlsson, M., Palm, L., and Oldfors, A. (2012). Myopathies associated with  $\beta$ -tropomyosin mutations. *Neuromuscul. Disord.* NMD 22, 923–933.
- Takagi, S., Tsuji, T., Amagai, T., Takamatsu, T., and Fujisawa, H. (1987). Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* 122, 90–100.
- Takagi, S., Hirata, T., Agata, K., Mochii, M., Eguchi, G., and Fujisawa, H. (1991). The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron* 7, 295–307.
- Takahashi, Y., Akishima-Fukasawa, Y., Kobayashi, N., Sano, T., Kosuge, T., Nimura, Y., Kanai, Y., and Hiraoka, N. (2007). Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 187–196.
- Takaki, R., Ono, J., Nakamura, M., Yokogawa, Y., Kumae, S., Hiraoka, T., Yamaguchi, K., Hamaguchi, K., and Uchida, S. (1986). Isolation of glucagon-secreting cell lines by cloning insulinoma cells. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* 22, 120–126.
- Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D.V.R., Suzuki, K., et al. (2006). Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* 8, 615–622.
- Tan, M., Ma, S., Huang, Q., Hu, K., Song, B., and Li, M. (2013). GSK-3 $\alpha/\beta$ -mediated phosphorylation of CRMP-2 regulates activity-dependent dendritic growth. *J. Neurochem.* 125, 685–697.
- Tanaka, H., Tanaka, S., Sekine, K., Kita, S., Okamura, A., Takebe, T., Zheng, Y.-W., Ueno, Y., Tanaka, J., and Taniguchi, H. (2013). The generation of pancreatic  $\beta$ -cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials* 34, 5785–5791.
- Tang, H., Hornstein, E., Stolovich, M., Levy, G., Livingstone, M., Templeton, D., Avruch, J., and Meyuhas, O. (2001). Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on



phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 8671–8683.

Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., and Yagi, T. (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* *19*, 519–530.

Taupenot, L., Harper, K.L., and O'Connor, D.T. (2003). The chromogranin-secretogranin family. *N. Engl. J. Med.* *348*, 1134–1149.

Tee, A.R., and Blenis, J. (2005). mTOR, translational control and human disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 29–37.

Tee, A.R., Manning, B.D., Roux, P.P., Cantley, L.C., and Blenis, J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr. Biol. CB* *13*, 1259–1268.

Teesalu, T., Sugahara, K.N., Kotamraju, V.R., and Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16157–16162.

Terris, B., Scoazec, J.Y., Rubbia, L., Bregeaud, L., Pepper, M.S., Ruzniewski, P., Belghiti, J., Fléjou, J., and Degott, C. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology* *32*, 133–138.

Tomizawa, Y., Sekido, Y., Kondo, M., Gao, B., Yokota, J., Roche, J., Drabkin, H., Lerman, M.I., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (2001). Inhibition of lung cancer cell growth and induction of apoptosis after reexpression of 3p21.3 candidate tumor suppressor gene SEMA3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 13954–13959.

Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Yabuki, M., Harada, K., Hori, M., and Kikutani, H. (2004). Guidance of myocardial patterning in cardiac development by Sema6D reverse signalling. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1204–1211.

Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., and Kikutani, H. (2005). FARP2 triggers signals for Sema3A-mediated axonal repulsion. *Nat. Neurosci.* *8*, 1712–1719.

Travis, W.D. (2010). Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* *21 Suppl 7*, vii65–71.

Tzatsos, A., and Kandror, K.V. (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 63–76.

Tzivion, G., and Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *277*, 3061–3064.

Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., et al. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *10*, 165–179.

- Uchida, Y., Ohshima, T., Yamashita, N., Ogawara, M., Sasaki, Y., Nakamura, F., and Goshima, Y. (2009). Semaphorin3A signaling mediated by Fyn-dependent tyrosine phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 at tyrosine 32. *J. Biol. Chem.* *284*, 27393–27401.
- Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* *9*, 316–323.
- Vander Kooi, C.W., Jusino, M.A., Perman, B., Neau, D.B., Bellamy, H.D., and Leahy, D.J. (2007). Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6152–6157.
- Varrin-Doyer, M., Vincent, P., Cavagna, S., Auvergnon, N., Noraz, N., Rogemond, V., Honnorat, J., Moradi-Améli, M., and Giraudon, P. (2009). Phosphorylation of collapsin response mediator protein 2 on Tyr-479 regulates CXCL12-induced T lymphocyte migration. *J. Biol. Chem.* *284*, 13265–13276.
- Villasenor, A., Marty-Santos, L., Dravis, C., Fletcher, P., Henkemeyer, M., and Cleaver, O. (2012). EphB3 marks delaminating endocrine progenitor cells in the developing pancreas. *Dev. Dyn.* *241*, 1008–1019.
- Villaume, K., Blanc, M., Gouysse, G., Walter, T., Couderc, C., Nejari, M., Vercherat, C., Cordier-Bussat, M., Roche, C., and Scoazec, J.-Y. (2010). VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Neuroendocrinology* *91*, 268–278.
- Vogl, T.J., Naguib, N.N.N., Zangos, S., Eichler, K., Hedayati, A., and Nour-Eldin, N.-E.A. (2009). Liver metastases of neuroendocrine carcinomas: interventional treatment via transarterial embolization, chemoembolization and thermal ablation. *Eur. J. Radiol.* *72*, 517–528.
- Wander, S.A., Hennessy, B.T., and Slingerland, J.M. (2011). Next-generation mTOR inhibitors in clinical oncology: how pathway complexity informs therapeutic strategy. *J. Clin. Invest.* *121*, 1231–1241.
- Wang, L.H., and Strittmatter, S.M. (1997). Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase. *J. Neurochem.* *69*, 2261–2269.
- Wang, B.T., Ducker, G.S., Barczak, A.J., Barbeau, R., Erle, D.J., and Shokat, K.M. (2011). The mammalian target of rapamycin regulates cholesterol biosynthetic gene expression and exhibits a rapamycin-resistant transcriptional profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 15201–15206.
- Wang, L., Harris, T.E., Roth, R.A., and Lawrence, J.C., Jr (2007). PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* *282*, 20036–20044.
- Wang, S., Jensen, J.N., Seymour, P.A., Hsu, W., Dor, Y., Sander, M., Magnuson, M.A., Serup, P., and Gu, G. (2009). Sustained Neurog3 expression in hormone-expressing islet cells is required for endocrine maturation and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 9715–9720.
- Wang, W.-L., Hong, T.-M., Chang, Y.-L., Wu, C.-T., Pan, S.-H., and Yang, P.-C. (2012). Phosphorylation of LCRMP-1 by GSK3 $\beta$  promotes filopodia formation, migration and invasion abilities in lung cancer cells. *PLoS One* *7*, e31689.
- Wang, Y., Pascoe, H.G., Brautigam, C.A., He, H., and Zhang, X. (2013). Structural basis for activation and non-canonical catalysis of the Rap GTPase activating protein domain of plexin. *eLife* *2*, e01279.

- Warner, R.R.P. (2005). Enteroendocrine tumors other than carcinoid: a review of clinically significant advances. *Gastroenterology* *128*, 1668–1684.
- Welin, S., Stridsberg, M., Cunningham, J., Granberg, D., Skogseid, B., Oberg, K., Eriksson, B., and Janson, E.T. (2009). Elevated plasma chromogranin A is the first indication of recurrence in radically operated midgut carcinoid tumors. *Neuroendocrinology* *89*, 302–307.
- Welin, S., Sorbye, H., Sebjornsen, S., Knappskog, S., Busch, C., and Oberg, K. (2011). Clinical effect of temozolomide-based chemotherapy in poorly differentiated endocrine carcinoma after progression on first-line chemotherapy. *Cancer* *117*, 4617–4622.
- Welin, S.V., Janson, E.T., Sundin, A., Stridsberg, M., Lavenius, E., Granberg, D., Skogseid, B., Oberg, K.E., and Eriksson, B.K. (2004). High-dose treatment with a long-acting somatostatin analogue in patients with advanced midgut carcinoid tumours. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* *151*, 107–112.
- West, D.C., Rees, C.G., Duchesne, L., Patey, S.J., Terry, C.J., Turnbull, J.E., Delehedde, M., Heegaard, C.W., Allain, F., Vanpouille, C., et al. (2005). Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* *280*, 13457–13464.
- Whitford, K.L., and Ghosh, A. (2001). Plexin signaling via off-track and rho family GTPases. *Neuron* *32*, 1–3.
- Wimmel, A., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2003). Autocrine growth inhibition by transforming growth factor beta-1 (TGFbeta-1) in human neuroendocrine tumour cells. *Gut* *52*, 1308–1316.
- Lai Wing Sun, K., Correia, J.P., and Kennedy, T.E. (2011). Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 2153–2169.
- Wolman, M.A., Liu, Y., Tawarayama, H., Shoji, W., and Halloran, M.C. (2004). Repulsion and attraction of axons by semaphorin3D are mediated by different neuropilins in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 8428–8435.
- Worzfeld, T., Swiercz, J.M., Looso, M., Straub, B.K., Sivaraj, K.K., and Offermanns, S. (2012). ErbB-2 signals through Plexin-B1 to promote breast cancer metastasis. *J. Clin. Invest.* *122*, 1296–1305.
- Wu, F., Zhou, Q., Yang, J., Duan, G., Ou, J., Zhang, R., Pan, F., Peng, Q., Tan, H., Ping, Y., et al. (2011). Endogenous axon guiding chemorepulsant semaphorin-3F inhibits the growth and metastasis of colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 2702–2711.
- Wu, P.-F., Huang, W.-C., Yang, J.C.-H., Lu, Y.-S., Shih, J.-Y., Wu, S.-G., Lin, C.-H., and Cheng, A.-L. (2013). Phosphorylated insulin-like growth factor-1 receptor (pIGF1R) is a poor prognostic factor in brain metastases from lung adenocarcinomas. *J. Neurooncol.*
- Wulbrand, U., Remmert, G., Zöfel, P., Wied, M., Arnold, R., and Fehmann, H.C. (2000). mRNA expression patterns of insulin-like growth factor system components in human neuroendocrine tumours. *Eur. J. Clin. Invest.* *30*, 729–739.
- Xiang, R.H., Hensel, C.H., Garcia, D.K., Carlson, H.C., Kok, K., Daly, M.C., Kerbacher, K., van den Berg, A., Veldhuis, P., Buys, C.H., et al. (1996). Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics* *32*, 39–48.

- Xiong, G., Wang, C., Evers, B.M., Zhou, B.P., and Xu, R. (2012). ROR $\alpha$  suppresses breast tumor invasion by inducing SEMA3F expression. *Cancer Res.* 72, 1728–1739.
- Xu, Y., Yuan, L., Mak, J., Pardanaud, L., Caunt, M., Kasman, I., Larrivée, B., Del Toro, R., Suchting, S., Medvinsky, A., et al. (2010). Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell Biol.* 188, 115–130.
- Yachida, S., Vakiani, E., White, C.M., Zhong, Y., Saunders, T., Morgan, R., de Wilde, R.F., Maitra, A., Hicks, J., Demarzo, A.M., et al. (2012). Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* 36, 173–184.
- Yacoub, M., Coulon, A., Celhay, O., Irani, J., Cussenot, O., and Fromont, G. (2009). Differential expression of the semaphorin 3A pathway in prostatic cancer. *Histopathology* 55, 392–398.
- Yamashita, N., and Goshima, Y. (2012). Collapsin response mediator proteins regulate neuronal development and plasticity by switching their phosphorylation status. *Mol. Neurobiol.* 45, 234–246.
- Yamashita, N., Morita, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Usui, H., Ohshima, T., Taniguchi, M., Honnorat, J., Thomasset, N., Takei, K., et al. (2007). Regulation of spine development by semaphorin3A through cyclin-dependent kinase 5 phosphorylation of collapsin response mediator protein 1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 12546–12554.
- Yao, J.C., Hassan, M., Phan, A., Dagohoy, C., Leary, C., Mares, J.E., Abdalla, E.K., Fleming, J.B., Vauthey, J.-N., Rashid, A., et al. (2008a). One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 3063–3072.
- Yao, J.C., Phan, A., Hoff, P.M., Chen, H.X., Charmsangavej, C., Yeung, S.-C.J., Hess, K., Ng, C., Abbruzzese, J.L., and Ajani, J.A. (2008b). Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 1316–1323.
- Yao, J.C., Pavel, M., Phan, A.T., Kulke, M.H., Hoosen, S., St Peter, J., Cherfi, A., and Öberg, K.E. (2011a). Chromogranin A and neuron-specific enolase as prognostic markers in patients with advanced pNET treated with everolimus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 3741–3749.
- Yao, J.C., Shah, M.H., Ito, T., Bohas, C.L., Wolin, E.M., Van Cutsem, E., Hobday, T.J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E.G.E., et al. (2011b). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N. Engl. J. Med.* 364, 514–523.
- Yao, J.C., Phan, A.T., Jehl, V., Shah, G., and Meric-Bernstam, F. (2013). Everolimus in advanced pancreatic neuroendocrine tumors: the clinical experience. *Cancer Res.* 73, 1449–1453.
- Yoo, S.H., You, S.H., and Huh, Y.H. (2005). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett.* 579, 222–228.
- Yoshimura, T., Kawano, Y., Arimura, N., Kawabata, S., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (2005). GSK-3 $\beta$  regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120, 137–149.
- Zhang, H., Li, W., Wang, Q., Wang, X., Li, F., Zhang, C., Wu, L., Long, H., Liu, Y., Li, X., et al. (2012). Glucose-mediated repression of menin promotes pancreatic  $\beta$ -cell proliferation. *Endocrinology* 153, 602–611.

- Zhao, X.-Y., Chen, L., Xu, Q., and Li, Y.-H. (2006). Expression of semaphorin 6D in gastric carcinoma and its significance. *World J. Gastroenterol. WJG* *12*, 7388–7390.
- Zhao, Y.-P., Zhan, H.-X., Zhang, T.-P., Cong, L., Dai, M.-H., Liao, Q., and Cai, L.-X. (2011). Surgical management of patients with insulinomas: Result of 292 cases in a single institution. *J. Surg. Oncol.* *103*, 169–174.
- Zheng, C., Zhou, Q., Wu, F., Peng, Q., Tang, A., Liang, H., and Zeng, Y. (2009). Semaphorin3F down-regulates the expression of integrin alpha(v)beta3 and sensitizes multicellular tumor spheroids to chemotherapy via the neuropilin-2 receptor in vitro. *Chemotherapy* *55*, 344–352.
- Zhou, H., Yang, Y.-H., Binmadi, N.O., Proia, P., and Basile, J.R. (2012a). The hypoxia-inducible factor-responsive proteins semaphorin 4D and vascular endothelial growth factor promote tumor growth and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Exp. Cell Res.* *318*, 1685–1698.
- Zhou, H., Binmadi, N.O., Yang, Y.-H., Proia, P., and Basile, J.R. (2012b). Semaphorin 4D cooperates with VEGF to promote angiogenesis and tumor progression. *Angiogenesis* *15*, 391–407.
- Zhou, X., Ma, L., Li, J., Gu, J., Shi, Q., and Yu, R. (2012c). Effects of SEMA3G on migration and invasion of glioma cells. *Oncol. Rep.* *28*, 269–275.
- Zhou, Y., Wang, S., Gobl, A., and Oberg, K. (1999). Inhibition of CDK2, CDK4 and cyclin E and increased expression of p27Kip1 during treatment with interferon-alpha in carcinoid tumor cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* *13*, 207–215.
- Zhou, Y., Wang, S., Gobl, A., and Oberg, K. (2001). Interferon alpha induction of Stat1 and Stat2 and their prognostic significance in carcinoid tumors. *Oncology* *60*, 330–338.
- Zhou, Y., Wang, S., Yue, B.-G., Gobl, A., and Oberg, K. (2002). Effects of interferon alpha on the expression of p21cip1/waf1 and cell cycle distribution in carcinoid tumors. *Cancer Invest.* *20*, 348–356.
- Zitzmann, K., De Toni, E.N., Brand, S., Göke, B., Meinecke, J., Spöttl, G., Meyer, H.H.D., and Auernhammer, C.J. (2007). The novel mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) induces antiproliferative effects in human pancreatic neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology* *85*, 54–60.
- Zitzmann, K., Rüden, J. von, Brand, S., Göke, B., Lichtl, J., Spöttl, G., and Auernhammer, C.J. (2010). Compensatory activation of Akt in response to mTOR and Raf inhibitors - a rationale for dual-targeted therapy approaches in neuroendocrine tumor disease. *Cancer Lett.* *295*, 100–109.
- Zumsteg, A., Strittmatter, K., Klewe-Nebenius, D., Antoniadis, H., and Christofori, G. (2010). A bioluminescent mouse model of pancreatic {beta}-cell carcinogenesis. *Carcinogenesis* *31*, 1465–1474.

**Titre :** Tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques (TNE-GEPs) : recherche de nouveaux mécanismes de progression tumorale et de nouvelles cibles thérapeutiques

**Résumé :** Les TNE-GEPs constituent un groupe de tumeurs hétérogènes pour lesquelles il convient d'élargir les approches thérapeutiques. Les thérapies ciblées, particulièrement l'inhibition de la voie mTOR par l'évérolimus, sont la référence pour les TNE-GEPs pancréatiques. Néanmoins, le bénéfice thérapeutique de l'évérolimus n'a pas été évalué dans le sous-groupe des carcinomes neuroendocrines GEPs peu différenciés (pdCNE-GEPs). A travers un modèle préclinique *in vivo*, nous montrons que l'inhibition de mTOR pourrait constituer une option thérapeutique pour les pdCNE-GEPs. Ensuite, une étude protéomique a mis en évidence de nouveaux facteurs impliqués dans la progression de TNE-GEPs. Certaines protéines identifiées présentent un rôle dans la régulation du cytosquelette. Parmi celles-ci, CRMP2 est un acteur clé de la voie de signalisation des sémaphorines de classe 3 (sema3). Un profil d'expression de ces sema3 montre que l'expression de la sema3F est diminuée dans les TNE-GEPs. La ré-expression de ce facteur dans des modèles cellulaires de TNE-GEPs montre que la sema3F induit une baisse de la survie et de la prolifération. *In vivo*, la sema3F permet de ralentir le développement tumoral. Des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de la voie de signalisation de la sema3F dans la progression des TNE-GEPs.

---

**Title:** Defining novel mechanisms of tumor progression and novel therapeutic targets for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs)

**Abstract:** GEP-NETs are heterogeneous tumors for which therapeutic options are limited and must therefore be enlarged. Targeted therapies, and mainly everolimus-directed mTOR inhibition, constitute standard treatments for GEP-NETs of pancreatic origin. Nevertheless, the therapeutic benefits of everolimus have not been evaluated in the poorly-differentiated GEP neuroendocrine carcinomas (pdGEP-NECs) subgroup. By using a preclinical *in vivo* model, we demonstrated that mTOR inhibition could be considered as a therapeutic option for pdGEP-NECs. Then, a proteomic study highlighted novel proteins involved in GEP-NETs progression with all identified factors displaying function in cytoskeleton regulation. Among them, CRMP2 is a key member of class 3 semaphorin (sema3) signaling. An expression profile of sema3 revealed that sema3F expression was decreased in GEP-NETs. The re-expression of this protein in TNE-GEPs cellular models showed that sema3F is responsible of the reduction of cell viability and proliferation. *In vivo*, sema3F hampered tumor development. Further studies are thus needed to better understand the role of the sema3F signaling pathway in the progression of GEP-NETs.

**Travail réalisé au sein du Centre de Recherche de Cancérologie de Lyon - Département « Echappement tumoral » - Equipe 4 « Différenciation endocrine : interaction avec la tumorigenèse et la progression tumorale »**